

AMENAN ROSE KOFFI

VALORISATION COMBINÉE DU LISIER DE PORC ET DU PERMÉAT DE  
LACTOSÉRUM DE FROMAGERIE PAR FERMENTATION AÉROBIE AU  
MOYEN D'UNE CULTURE DE LEVURES

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)

Département des sciences des aliments et de nutrition  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL

Mai 1999

Faculté des études supérieures

De 14<sup>ème</sup> jour du mois de Mai 1999, les personnes soussignées, en leur qualité de membres du jury de la thèse de Mme Rose Ameman Koffi, ont assisté à la soutenance de cette thèse.

| <u>NOMS</u>                | <u>UNIVERSITÉ</u>                                | <u>SIGNATURE</u>           |
|----------------------------|--|----------------------------|
| <u>JENIS GROUVEAU</u>      | <u>Inst. Rech. Biotechnol<br/>(Montréal, Qi)</u> | <u>Denis Juh</u>           |
| <u>CLAUDE P. CHAMPAGNE</u> | <u>CRDA - Agric. CANADA</u>                      | <u>Claude P. Champagne</u> |
| <u>RONALD F. SIMARD</u>    | <u>UNIVERSITÉ LAVAL</u>                          | <u>Ronald F. Simard</u>    |
| <u>GASTON PICARD</u>       | <u>UNIVERSITÉ LAVAL</u>                          | <u>Gaston Picard</u>       |
| <u>JACQUES GOULIET</u>     | <u>UNIVERSITÉ LAVAL</u>                          | <u>Jacques Gouliet</u>     |

[Signature]

SIGNATURE DU PRÉSIDENT DE LA SOUTENANCE

A Berenice...

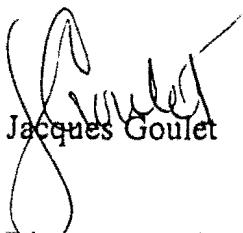
Valorisation combinée du lisier de porc et du perméat de lactosérum de fromagerie par fermentation aérobie au moyen d'une culture de levures

### Résumé

La disposition des fortes quantités de lisier de porcs produites par des élevages intensifs est une réalité et un problème indéniable. En fait, de nombreuses études se sont intéressées depuis des décennies à cette question en proposant divers traitements chimiques et/ou biologiques visant sa décontamination ; les solutions proposées vont de la production de biogaz jusqu'au recyclage alimentaire en passant par l'épandage et le compostage. Toutefois, vu les limites (coûts d'exploitation, etc.) relatives à ces différentes conclusions, il nous est apparu que la voie du recyclage alimentaire était la plus prometteuse. Nos travaux ont porté sur la fermentation combinée du lisier de porc et du perméat de lactosérum de fromagerie avec une culture aérée de levures.

Pour ce faire, nous avons mis au point un milieu composé de lisier de porc et de perméat de lactosérum de fromagerie auquel nous avons ajouté les souches de levures (*Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces sp. Golden cheese*, *Trichosporon cutareum*, *Saccharomyces boulardii*) en compétition. Puis, nous avons soumis le tout à la fermentation aérobie. Nous avons aussi étudié l'impact du ratio C:N sur la prolifération des cellules et le ratio C:N de 10:1 obtenu avec un mélange lisier/perméat de lactosérum de 45%/55% (v/v) s'est révélé comme la plus appropriée à supporter la croissance des levures. Ainsi, après avoir sélectionné la souche de levure (*K. marxianus*) bien adaptée à s'y développer abondamment, nous avons utilisé un bioréacteur qui a permis de minimiser les coûts traditionnellement liés à la fermentation aérobie, c'est à dire le contrôle de la température, la dissolution de l'oxygène et la production de mousse.

Par ailleurs, comme le produit final visé était destiné à l'alimentation des porcs, nous avons travaillé dans les conditions les plus susceptibles de limiter la prolifération de pathogènes (pH 4,5 ou moins) et de réduire les odeurs typiques de lisier. Cette fermentation nous a permis, à une température n'excédant pas 30°C et sous un taux de dilution (D) de 0.11h<sup>-1</sup>, de conserver une concentration en oxygène dissout légèrement supérieure à 0 ppm, d'obtenir une biomasse riche en levures (2.8x10<sup>9</sup>) et en protéines (30%), et d'éliminer les mauvaises odeurs du lisier. En somme, nous avons établi à travers cette nouvelle approche de traitement biologique, qu'il est possible de disposer du lisier de porc en le fermentant à moindre coût, au moyen d'un dispositif simple. Cette approche nécessite une supplémentation en perméat de lactosérum de fromagerie et l'inoculation d'une souche appropriée de levures. Le produit fermenté obtenu est riche en protéines potentiellement utilisables pour l'alimentation des porcs et pourrait aussi servir comme source de probiotiques.



Jacques Goulet

Directeur de thèse



Amenan Rose Koffi

Auteur de la thèse

Valorisation combinée du lisier de porc et du perméat de lactosérum de fromagerie par fermentation aérobie au moyen d'une culture de levures

Résumé court

La présente étude vise à produire, à partir de la fermentation d'un milieu composé de lisier de porc, de perméat de lactosérum de fromagerie et inoculé au moyen d'une levure adaptée, une biomasse microbienne riche en protéines et destinée à l'alimentation des porcs. Pour ce faire, nous avons conçu un dispositif simple et peu coûteux constitué essentiellement d'un bioréacteur à cellules immobilisées. Nous avons travaillé à maintenir des conditions ne favorisant pas la prolifération de pathogènes (pH 4,5 ou moins) et prévenant la formation de mauvaises odeurs. Les résultats obtenus montrent que le produit final issu de la fermentation est effectivement riche en protéines (30%) et présente un profil en acides aminés essentiels comparable à celui de levures commerciales. En somme, il ressort de notre étude qu'il est possible de disposer du lisier de porc en le fermentant à moindre coût, et au moyen d'un dispositif simple, en combinaison avec du perméat de lactosérum de fromagerie et en présence d'une souche appropriée de levures, pour en faire une biomasse levurienne enrichie en protéines que l'on peut destiner à l'alimentation des porcs.



Jacques Goulet

Directeur de thèse



Amenan Rose Koffi

Auteur de la thèse

## AVANT PROPOS

Dans la mesure où il traduit la volonté tant à se transcender qu'à contribuer au développement des connaissances dans son domaine, le doctorat a toujours constitué pour moi un objectif essentiel, et j'ai toujours pensé que sa réalisation serait pour moi une manière de tracer la voie, d'inspirer plusieurs personnes qui ont toujours vu en moi un modèle. Vous comprendrez alors les sentiments de profonde joie et d'innombrables reconnaissances envers le Seigneur que j'éprouve face à ce travail que je viens d'accomplir.

Je remercie tout particulièrement M. Jacques Goulet (mon directeur de thèse) dont le soutien a été capital et décisif pour moi. J'éprouve pour les mêmes raisons un profond sentiment de gratitude à l'égard de mon frère Blaise et de mon conjoint Roger.

Je tiens par ailleurs à remercier ma famille et tous ceux et celles qui d'une manière ou d'une autre, directement ou indirectement m'ont soutenu et aidé dans cette œuvre à la fois exigeante qu'exaltante. Pour terminer, je dédie cette thèse à ma fille Berenice Nevry.

## TABLE DES MATIÈRES

|   |     |
|---|-----|
| RESUMÉ LONG.....  | II  |
| RESUMÉ COURT.....   | IV  |
| AVANT PROPOS.....   | V   |
| TABLE DES MATIÈRES.....   | VI  |
| LISTE DES TABLEAUX.....   | XI  |
| LISTE DES FIGURES.....  | XIV |
| INTRODUCTION.....   | 1   |
| CHAPITRE 1. ÉTAT DES CONNAISSANCES.....   | 7   |
| I : DIVERSES UTILISATIONS DES DÉJECTIONS ANIMALES.....                                      | 8   |
| 1 <i>Les effluents d'élevage porcin</i> .....   | 9   |
| 1.1 Définitions.....  | 9   |
| 1.2 Composition chimique du lisier.....   | 10  |
| 1.2.1 L'eau.....  | 10  |
| 1.2.2 Les éléments minéraux.....  | 10  |
| 1.2.3 La matière organique.....   | 11  |
| 1.2.3.1 La DBO et la DCO.....   | 11  |
| 1.3 Composition microbiologique du lisier de porc.....                                      | 12  |
| 2 <i>Utilisation des déjections animales comme fertilisant</i> .....                        | 13  |
| 2.1 Essor de la production porcine et son impact.....                                       | 14  |
| 2.2 La pollution des eaux.....  | 17  |
| 2.2.1 La pollution organique.....   | 17  |
| 2.2.2 La pollution inorganique.....   | 17  |
| 2.2.3 La pollution bactérienne.....   | 18  |
| 2.2.4 La pollution olfactive.....   | 18  |
| 2.2.4.1 Généralités.....  | 19  |
| 2.2.4.2 Origine des odeurs.....   | 20  |
| 2.2.4.3 L'azote ammoniacal du lisier.....   | 21  |
| 3 <i>Traitements du lisier de porc</i> .....  | 22  |
| 4 <i>Utilisation des déjections dans l'alimentation animale</i> .....                       | 25  |
| 4.1 Recyclage alimentaire.....  | 26  |
| 4.1.1 Recyclage alimentaire de la matière sèche du fumier sans<br>traitement préalable..... | 27  |



|  |           |
|--|-----------|
| 4.1.2 Recyclage alimentaire du lisier de porc (ou du fumier) après traitement aérobic (mésophile et thermophile) ..... | 28        |
| 4.2 Risques potentiels encourus par la pratique du recyclage alimentaire des déjections animales .....                 | 31        |
| 4.2.1 Risques sanitaires .....   | 32        |
| 4.2.2 Risques d'intoxication .....   | 33        |
| 4.2.2.1 Risques d'intoxications liées aux éléments minéraux .....  | 33        |
| 4.2.2.2 Risques liés à l'usage de médicaments .....  | 34        |
| 4.3 Production de protéines microbiennes.....  | 34        |
| 5 Conclusion partielle.....  | 35        |
| <b>II : LE PERMÉAT DE LACTOSÉRUM .....</b>   | <b>36</b> |
| 1 <i>Définition</i> .....  | 36        |
| 2 <i>Composition</i> .....   | 37        |
| 3 <i>Le lactosérum, un polluant</i> .....  | 38        |
| 4 <i>Utilisation du lactosérum et de son perméat</i> .....   | 39        |
| 5 <i>Le lactose du perméat</i> .....   | 40        |
| <b>III : LES LEVURES .....</b>   | <b>42</b> |
| 1 <i>Sélection des souches de levures</i> .....  | 45        |
| 2 <i>Les levures-aliments</i> .....  | 47        |
| 2.1 <i>Généralités</i> .....   | 47        |
| 3. <i>Proportions de lisier et de perméat à associer pour maximiser la croissance des levures.</i> .....               | 49        |
| <b>IV: LA FERMENTATION ET LA PRODUCTION DE BIOMASSE PROTÉIQUE .....</b>  | <b>50</b> |
| 1 <i>Le fermenteur ou bioréacteur</i> .....  | 51        |
| 1.1 Les systèmes fermés .....  | 51        |
| 1.1.1 Les fermentations semi-continues ( <i>fed-batch</i> ).....   | 51        |
| 1.1.2 Les fermentations en discontinu ( <i>batch</i> ).....  | 52        |
| 1.2 Les systèmes ouverts .....   | 52        |
| 1.2.1 Les fermentations continues.....   | 53        |
| 2 <i>Importance de l'aération dans la fermentation</i> .....   | 54        |
| 2.1 Coûts afférents à la fermentation aérobic .....  | 56        |
| <b>BUT ET OBJECTIFS .....</b>  | <b>57</b> |
| <b>CHAPITRE 2. ESSAIS EN LABORATOIRE PRÉALABLES AUX ESSAIS PILOTES .....</b>   | <b>59</b> |
| I INTRODUCTION .....   | 60        |
| II MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES .....   | 61        |
| 1 <i>Matériel</i> .....  | 61        |
| 1.1 Le lisier de porc.....   | 61        |
| 1.2 Le perméat de lactosérum .....   | 61        |
| 1.3 Les souches de levures.....  | 62        |
| 2 <i>Méthodes expérimentales</i> .....   | 62        |

|  |  |           |
|--|--|-----------|
| 2.1  | Caractérisation de la flore indigène du lisier de porc.....  | 62        |
| 2.2  | Caractéristiques physico-chimiques du lisier de porc.....  | 63        |
| 2.3  | Effet de la centrifugation et du chauffage sur la microflore<br>du lisier de porc.....                 | 64        |
| 2.4  | Essais de croissance des levures dans le milieu LP pasteurisé et non<br>pasteurisé.....                | 65        |
| 2.5  | Effet du pH du milieu de culture sur la croissance de <i>K. marxianus</i> .....                        | 66        |
| III  | RÉSULTATS ET DISCUSSION.....   | 67        |
| 1  | <i>Caractéristiques du lisier de porc</i> .....  | 67        |
| 2  | <i>Effet de la centrifugation et du chauffage sur la microflore du lisier de porc</i> .....            | 68        |
| 3  | <i>Essais de croissance des levures dans le milieu lisier/perméat : détermination<br/>du C/N</i> ..... | 69        |
| 4  | <i>Effet du pH du milieu de culture sur la croissance de K. marxianus</i> .....                        | 71        |
| IV   | CONCLUSION PARTIELLE.....  | 76        |
| <b>CHAPITRE 3. MISE À L'ÉCHELLE PILOTE DU PROCÉDÉ DÉVELOPPÉ<br/>EN LABORATOIRE: SÉLECTION ET ÉVALUATION DU BIORÉACTEUR</b> |  | <b>84</b> |
| I  | MATÉRIEL ET MÉTHODES.....  | 85        |
| 1  | <i>Matières premières</i> .....  | 85        |
| 1.1  | Lisier de porc.....  | 85        |
| 1.2  | Perméat de lactosérum.....   | 85        |
| 1.3  | Levures.....   | 86        |
| 1.4  | Neutralisant.....  | 86        |
| 1.5  | Antimousse.....  | 87        |
| 2  | <i>Bioréacteurs</i> .....  | 87        |
| 2.1  | Culture en cuve aérée par microbullage.....  | 87        |
| 2.2  | Culture sur colonne aérée par écoulement en film mince.....  | 88        |
| 2.2.1  | Description et fonctionnement du bioréacteur.....  | 88        |
| 3  | <i>Méthodes</i> .....  | 93        |
| 3.1  | La fermentation.....   | 93        |
| 3.2  | Suivi et contrôle.....   | 94        |
| 3.2.1  | pH.....  | 94        |
| 3.2.2  | Température.....   | 95        |
| 3.2.3  | Oxygène dissout (O <sub>2</sub> D).....  | 95        |
| 3.2.4  | Vitesse d'alimentation du bioréacteur.....   | 97        |
| 3.2.5  | Mousse.....  | 97        |
| 3.3  | Démarrage des fermentations.....   | 98        |
| 3.3.1  | Fermentation en absence de lisier.....   | 98        |
| 3.3.2  | Immobilisation des cellules sur supports.....  | 99        |
| 3.3.3  | Introduction du lisier dans le bioréacteur.....  | 99        |
| II   | RÉSULTATS ET DISCUSSION.....   | 100       |

|   |            |
|---|------------|
| 1 Fermentation en absence de lisier: suivi du pH durant la croissance des levures ..... | 100        |
| 2 Immobilisation des cellules sur supports .....  | 106        |
| 3 Fluctuation du niveau d'oxygène dissout en réponse au débit d'alimentation .....      | 108        |
| 4 Détermination de la vitesse optimale d'alimentation .....                             | 111        |
| III CONCLUSION PARTIELLE .....  | 115        |
| <b>CHAPITRE 4 OPTIMISATION DU PROCÉDÉ DE FERMENTATION ....</b>                          | <b>126</b> |
| I MATÉRIEL ET MÉTHODES .....  | 127        |
| 1 <i>Matières premières</i> .....   | 127        |
| 1.1 Le lisier de porc .....   | 127        |
| 1.2 le perméat de lactosérum .....  | 127        |
| 1.3 Levures .....   | 128        |
| 1.4 Neutralisant .....  | 128        |
| 1.5 Les bioréacteurs .....  | 128        |
| 1.5.1 Description et fonctionnement du bioréacteur sélectionné .....                    | 130        |
| 2 <i>Méthodes</i> .....   | 131        |
| 2.1 La fermentation en continu .....  | 131        |
| 2.1.1 pH .....  | 132        |
| 2.1.2 Aération .....  | 132        |
| 2.1.2.1 Comparaison de l'efficacité de l'aération de trois bioréacteurs .....           | 133        |
| 2.1.3 Le débit d'alimentation du bioréacteur .....                                      | 133        |
| 2.1.4 La mousse .....   | 135        |
| 2.2 Le produit de la fermentation .....   | 136        |
| 2.2.1 Teneur en levures du produit fermenté .....                                       | 136        |
| 2.2.2 Caractéristiques chimiques .....  | 136        |
| II RÉSULTATS ET DISCUSSION .....  | 137        |
| 1 <i>Les paramètres liés à la fermentation</i> .....                                    | 137        |
| 1.1 Bioréacteurs et dissolution d'oxygène : essais avec de l'eau .....                  | 137        |
| 1.2 Débit d'alimentation .....  | 143        |
| 1.3 Le pH .....   | 144        |
| 2 <i>Produit de la fermentation</i> .....   | 149        |
| 2.1 Concentration en levures .....  | 149        |
| 2.2 Rendement et productivité du système .....  | 151        |
| 2.2.3 Rendement .....   | 151        |
| 2.2.4 Productivité .....  | 154        |
| 2.2.5 Efficacité .....  | 154        |
| 2.3 La teneur en protéines et en acides aminés du produit fermenté .....                | 155        |
| III CONCLUSION PARTIELLE .....  | 162        |
| CONCLUSION GENERALE .....   | 180        |
| BIBLIOGRAPHIE .....   | 183        |
| ANNEXES .....   | 204        |

|   |     |
|---|-----|
| ANNEXE A Différents paliers de valorisation des sous-produits industriels ..... | 204 |
| ANNEXE B Calcul du rapport carbone:azote .....                                  | 205 |
| ANNEXE C Schéma d'écoulement actuel du lisier dans les procherries.....         | 208 |
| ANNEXE D Stabilité du bioréacteur .....   | 209 |
| ANNEXE E Principaux composés malodorants du lisier de porc.....                 | 211 |

## LISTE DES TABLEAUX

*Liste des tableaux*

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1.1. Inventaire des techniques de traitement et de recyclage du fumier<br>(Cournoyer et Bernier, 1993; Hédouit <u>et al.</u> , 1978).....                                      | 24 |
| Tableau 1.2. Utilisation alimentaire par le porc de différentes fractions du fumier de<br>porc (Kornegay <u>et al.</u> , 1977).....  | 28 |
| Tableau 1.3. Performance de porcs abreuvés avec de l'eau pure ou du surnageant de<br>fosse aéré (Harmon et Day, 1974).....   | 30 |
| Tableau 1.4. Composition moyenne des sous-produits de l'industrie fromagère<br>(adapté de Jacques, 1993).....  | 37 |
| Tableau 1.5. Caractéristiques naturelles des levures, des bactéries et des moisissures<br>en regard de leur utilisation industrielle et commerciale (Carantino, 1983)...               | 44 |
| Tableau 2.1. Acides organiques à courte chaîne et leur pKa.....  | 73 |
| Tableau 2.2. Composition type du lisier de porc utilisé lors des essais<br>en laboratoire.....   | 77 |
| Tableau 2.3. Effet du chauffage du lisier à 85°C pendant 5-10-30 minutes<br>et de la centrifugation (8000 g, 20 minutes) sur la microflore<br>du lisier de porc.....                   | 77 |
| Tableau 2.4. Dénombrement des levures dans le milieu LP pasteurisé<br>(85°C-30 minutes) et non pasteurisé après 6 jours de croissance à<br>20-23°C, sous une agitation de 250 rpm..... | 78 |
| Tableau 2.5. Proportion de lisier et de perméat utilisée lors des essais<br>en laboratoire.....  | 78 |

|  |     |
|--|-----|
| Tableau 3.1. Évolution du pH, de la population de levures et de la température dans le perméat de lactosérum en fermentation.....  | 116 |
| Tableau 3.2. Détermination des concentrations de levures et de microorganismes immobilisés (dans la colonne) et en suspension (dans le milieu de fermentation) en fonction du temps.....   | 116 |
| Tableau 3.3. Influence d'un contrôle grossier du pH sur la croissance des levures en suspension dans le perméat de lactosérum en fermentation (30L).....   | 210 |
| Tableau 4.1. Taux de dissolution de l'oxygène dans trois types de bioréacteurs avec supports internes verticaux selon la vitesse de recirculation du milieu.....   | 163 |
| Tableau 4.2. Dissolution de l'oxygène dans l'eau selon la température (Atkinson et Mavituna; 1991).....  | 163 |
| Tableau 4.3. Effet de la concentration en lactose du perméat de lactosérum injecté dans le fermenteur contenant 30 L de milieu lisier/perméat en fermentation continue sur la quantité d'acide chlorhydrique 6N nécessaire pour contrôler (pendant 1 heure), le pH à 4.4 et à une vitesse d'alimentation de 1.6 L/h..... | 164 |
| Tableau 4.4. Dénombrement des levures en suspension (dans le produit fermenté et immobilisées (sur les supports de PVC).....   | 164 |
| Tableau 4.5. Dénombrement des microorganismes immobilisés sur les supports de PVC au cours des cinq mois de fermentation.....  | 165 |
| Tableau 4.6. Teneur moyenne en azote du produit fermenté, du lisier et du perméat.....   | 165 |
| Tableau 4.7. Comparaison de la teneur en protéines (TKN x 6.25) du produit fermenté et de quelques céréales communément utilisées en alimentation animale (Adrian et Frangine, 1991).....  | 166 |
| Tableau 4.8. Comparaison de la composition en acides aminés essentiels (g acide aminé pour 16 g N) du produit fermenté, de quelques levures et aliments conventionnels (d'après Senez, 1983).....  | 166 |

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 4.9. Comparaison des profils d'acides aminés du produit fermenté, de celui des levures Bel (Bui et Galzy, 1990) et du lisier aéré (Harmon et Day, 1975).....  | 167 |
| Tableau 4.10. Composition moyenne du produit fermenté obtenu en régime continu stationnaire ( <i>steady state</i> ) à un taux de dilution (D) de $0.11 \text{ h}^{-1}$ .....                                | 167 |
| Tableau 4.11. Comparaison de la composition minérale du produit fermenté à celle du lisier aéré (Harmon et Day., 1975) et au niveau maximum accepté dans l'aliment pour le porc (Church et Pond, 1988)..... | 168 |

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| Figure 1.1. Produits et sous-produits de l'industrie fromagère (adapté de Jacques, 1993).....  | 37 |
| Figure 1.2. Schéma des différentes étapes impliquées dans le transfert de l'oxygène de la bulle de gaz au site de réaction dans les cellules (schéma emprunté de Bailey et Ollis, 1986).....   | 55 |
| Figure 2.1. Performance de croissance de <i>K. marxianus</i> sur une période de 6 jours dans le milieu LP, sous un ratio C/N=10, une température de 20-23°C, des pH de 4,5 et 5,5 ajustés manuellement au moyen de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2N) et NaOH (2N) toutes les 24 heures, sous une agitation de 250 rpm.....   | 79 |
| Figure 2.2. Courbes de croissance de <i>K. marxianus</i> sur une période de 6 jours, sous un ratio C/N=10 à une température de 20-23°C, sous différentes conditions de pH du milieu LP ajusté manuellement au moyen de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2N) et NaOH (2N) toutes les 24 heures, sous une agitation de 250 rpm.....   | 80 |
| Figure 2.3. Utilisation du lactose par <i>K. marxianus</i> sur une période de 6 jours, sous un ratio C/N=10, une température de 20-23°C, sous différentes conditions de pH du milieu LP ajusté manuellement au moyen de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2N) et NaOH (2N) toutes les 24 heures, sous une agitation de 250 rpm.....  | 81 |
| Figure 2.4. Utilisation de l'azote ammoniacal par <i>K. marxianus</i> sur une période de 6 jours, sous un ratio C/N=10, une température de 20-23°C, sous différentes conditions de pH du milieu LP ajusté manuellement au moyen de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2N) et NaOH (2N) toutes les 24 heures, sous une agitation de 250 rpm.....   | 81 |
| Figure 2.5. Évolution des acides lactique, acétique et propionique au cours de la fermentation de <i>K. marxianus</i> dans le milieu LP sur une période de 6 jours, sous un ratio C/N=10, une température de 20-23°C, sous différentes conditions de pH du milieu LP ajusté manuellement au moyen de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2N) et NaOH (2N) toutes les 24 heures, sous une agitation de 250 rpm..... | 82 |



|   |     |
|---|-----|
| Figure 2.6. Apparence du lisier brut (A), du perméat de lactosérum (B), du mélange du lisier/perméat 55:45 et du mélange fermenté par <i>K. marxianus</i> à 22°C dans des flacons agités à 250 rpm (D).....   | 83  |
| Figure 3.1. Schéma du bioréacteur utilisé pour les essais préliminaires à l'échelle pilote.....   | 89  |
| Figure 3.2a. Schéma du bioréacteur utilisé pour les essais à l'échelle pilote.....  | 90  |
| Figure 3.2b. Schéma de fonctionnement du bioréacteur.....   | 91  |
| Figure 3.2c. Forme des supports (7,5 cm de diamètre/1,15 cm de long) de PVC utilisés pour l'immobilisation des levures à l'intérieur du bioréacteur.....  | 92  |
| Figure 3.3a . Effet du perméat de lactosérum ajouté au milieu en circulation dans le bioréacteur à cellules immobilisées opéré en mode <i>batch</i> sur l'évolution du pH et de la température.....   | 117 |
| Figure 3.3b. Effet du sucrose ajouté au milieu en circulation dans le bioréacteur à cellules immobilisées sur l'évolution du pH et de la température.....   | 117 |
| Figure 3.4a. Courbe de variation de la concentration en oxygène dissout du milieu à base de perméat de lactosérum en circulation dans le bioréacteur à cellules immobilisées et de celle du pH, à une température se situant entre 32.3 et 35.7°C.....  | 118 |
| Figure 3.4b. Courbes d'utilisation du lactose et de l'azote ammoniacal du milieu à base de perméat de lactosérum en circulation dans un bioréacteur à cellules immobilisées et de celle du pH, à une température se situant entre 32.3 et 35.7°C.....   | 118 |
| Figure 3.4aa. Courbe de variation de la concentration en oxygène dissout du milieu à base de perméat de lactosérum en circulation dans le bioréacteur à cellules immobilisées et de celle du pH, à une température se situant entre 32.3 et 35.7°C..... | 119 |

- Figure 3.5a. Évolution de l'oxygène dissout et du pH au cours d'une fermentation de type *fed-batch* avec le milieu LP (15 L:15 L) dans le bioréacteur à cellules immobilisées à une température variant entre 30.5 et 32. 2°C.....120
- Figure 3.5b. Évolution de la concentration en lactose et en azote ammoniacal du milieu LP en fermentation dans le bioréacteur à cellules immobilisées, à une température variant entre 30.5 et 32. 2°C.....120
- Figure 3.5aa. Évolution de l'oxygène dissout et du pH au cours d'une fermentation de type *fed-batch* avec le milieu LP (15 L:15 L) dans le bioréacteur à cellules immobilisées à une température variant entre 30.5 et 32. 2°C.....121
- Figure 3.6a. Effet de l'augmentation de la vitesse d'addition du lisier sur la concentration en oxygène dissout du milieu à base de perméat de lactosérum, et de l'évolution de son pH, à une température variant entre 31 et 33°C.....122
- Figure 3.6b. Effet de l'augmentation du débit d'addition du lisier sur l'utilisation du lactose et de l'azote ammoniacal dans le milieu à base de perméat de lactosérum en fermentation, à une température variant entre 31 et 33°C.....122
- Figure 3.6aa. Effet de l'augmentation du débit d'addition du lisier sur la concentration en oxygène dissout du milieu à base de perméat de lactosérum, et de l'évolution de son pH, à une température variant entre 31 et 33°C.....123
- figure 3.7a. Effet de l'augmentation simultanée du débit d'alimentation en lisier et en lactosérum entier sur l'utilisation de l'oxygène dissout et le profil du pH du milieu en fermentation à une température variant entre 28°C et 34°C.....124
- figure 3.7b. Effet de l'augmentation simultanée du débit d'alimentation en lisier et en lactosérum entier sur l'utilisation de l'oxygène dissout et le profil du pH du milieu en fermentation à une température variant entre 28°C et 34°C.....125

- Figure 4.1 . Schéma du bioréacteur et illustration des configurations A, A' et B...129
- Figure 4.2 . Observation microscopique (objectif 400X) des levures en croissance dans le produit fermenté (dilution au 1/100<sup>e</sup>).....151
- Figure 4.3. Courbes de dissolution de l'oxygène dans l'eau (A), dans du perméat de lactosérum (B) et dans le milieu lisier/perméat/levures en fermentation à 25°C.....169
- Figure 4.4a. Courbes d'utilisation de l'oxygène dissout dans le milieu lisier/perméat en fermentation à différents débits d'alimentation du bioréacteur opérant à un taux de recirculation de 20L/mn, (pH 4.7, 25°C). Les 3 courbes ont été enregistrées l'une à la suite de l'autre en ajustant l'alimentation à 0 mn. Le volume total du liquide dans le fermenteur était de 30L.....170
- Figure 4.4b. Courbes d'utilisation de l'oxygène dissout dans le milieu lisier/perméat de lactosérum en fermentation, à différents débits d'alimentation du bioréacteur opérant à un taux de recirculation de 42 L/mn (pH 4.7, 25°C). Les 5 courbes ont été enregistrées l'une à la suite de l'autre en ajustant l'alimentation à 0 mn. Le volume total du liquide dans le fermenteur était de 30L.....170
- Figure 4.5a. Effet de l'augmentation du débit d'alimentation en lisier et en perméat de lactosérum sur l'utilisation de l'oxygène dissout par la culture de levures entre 22 et 27°C, à un pH de 4.4, sous un débit de recirculation de 42L/mn.....171
- Figure 4.5b. Effet de l'augmentation du débit d'alimentation en lisier et en perméat de lactosérum sur l'utilisation de l'oxygène dissout par la culture de levure entre 22 et 27°C, à un pH de 4.4, sous un débit de recirculation de 42L/mn.....172
- Figures 4.6. Variation de la quantité cumulative d'acide HCL 6N requise pour contrôler (en discontinu) le pH du milieu lisier/perméat en fermentation, entre 22 et 27°C, sous un débit de recirculation de 42L/mn.....173

- Figure 4.7. Influence de la concentration en lactose du perméat sur la quantité d'acide HCL 6N nécessaire par heure pour contrôler en continu le pH du milieu en fermentation à 4.4, entre 22 et 27°C, sous un débit de recirculation de 42L/mn et pour un débit d'alimentation de 1.6L/h.....174
- Figure 4.8. Influence de la concentration en lactose du perméat de lactosérum sur l'utilisation de l'oxygène dissout du milieu lisier/perméat de lactosérum en fermentation par une culture de *K. marxianus*, à un taux de dilution (D) de 0.11h<sup>-1</sup>, après environ 30 minutes de sevrage entre l'injection des différentes concentrations dans le bioréacteur. Ce délai permettait la remontée de l'oxygène dissout à un niveau de 5.5-5.8 ppm.....175
- Figure 4.9. Influence de la teneur en lactose du perméat de lactosérum et du débit d'alimentation du milieu lisier/perméat sur la consommation d'oxygène dissout par *K. marxianus*, à 25°C, cultivé en régime continu.....176
- Figure 4.10. Évolution de l'oxygène dissout et de la température du milieu lisier/perméat de lactosérum en fermentation sous un régime continu, différents débits d'alimentation du bioréacteur à cellules immobilisées, à pH 4.4, sous un débit de recirculation de 42L/mn.....177
- Figure 4.10a. Évolution de l'oxygène dissout et de la température du milieu lisier/perméat de lactosérum en fermentation sous un régime continu, à différents débits d'alimentation du bioréacteur à cellules immobilisées, à pH 4.4, sous un débit de recirculation de 42L/mn.....178
- Figure 4.11. Procédé global d'écoulement du lisier de porc suggéré.....179

## INTRODUCTION

Encore aujourd'hui, à une époque que nous pouvons qualifier de postindustrielle, les élevages d'animaux continuent de jouer un rôle important. C'est par millions de par le monde que les porcs, les bœufs, les moutons, les poulets, etc. sont produits et abattus chaque jour pour se retrouver dans les supermarchés. L'élevage porcin figure toutefois parmi les productions agricoles considérées comme les plus agressives contre l'environnement. En effet, la demande de plus en plus forte pour la viande de porc combinée à la rareté des espaces disponibles et la haute compétitivité internationale n'ont pas manqué de pousser les éleveurs à opter pour l'intensif en lieu et place de l'extensif. Ainsi, c'est par milliers que les porcs se retrouvent dans des enclos et aires d'élevage. C'est donc chaque année des volumes considérables de lisier (25 millions de m<sup>3</sup> au Canada) qui sont ainsi produits et dont il faut disposer ; ce qui est de plus en plus difficile dans les zones où il n'existe pas assez de surfaces disponibles pour recevoir toute cette charge organique. En outre, l'épandage qui est le moyen de disposition le plus commun a atteint ses limites à cause de la forte charge polluante du lisier ( $DBO_5 = 19\ 000\text{mg/L}$ ) qui occasionne des pollutions olfactives (air), aquatiques (eutrophisation des rivières) et pédologiques (contamination de la nappe phréatique), sans omettre les coûts faramineux liés à l'épandage et sans compter l'hostilité sans cesse grandissante des populations riveraines. C'est dire que la disposition du lisier de porc compte parmi les principaux problèmes agricoles que doit affronter le Québec et le Canada tout autant que le reste de la planète. Il n'est donc pas surprenant que des chercheurs aient réfléchi sur la manière de le traiter et d'en disposer en respectant l'environnement.

Parmi les nombreuses études consacrées à la disposition du lisier de porc, certaines visaient divers traitements (chimiques et/ou biologiques) en vue de sa décontamination, ou le développement de méthodes permettant de réduire la charge organique du lisier (les différents paliers de valorisation des sous-produits industriels sont présentés en annexe A). Elles voulaient donc rendre moins polluant et moins odorant le lisier par une digestion aérobie. Malheureusement, c'est une approche qui s'avéra coûteuse en pratique puisqu'elle nécessitait des apports considérables d'énergie. (Burton et Farrent, 1995 ; Ginnivan et al., 1981 ; Doyle et De La Noüe 1987). D'autres se sont orientées vers la possibilité de produire du biogaz, tentant ainsi de faire du lisier une source d'énergie par digestion anaérobie (Evans et al., 1982 ; Lin et al., 1997). Cette approche ne présentait toutefois que peu d'intérêt dans les endroits où sont concentrés les élevages intensifs de porcs (les pays occidentaux). En effet, la disponibilité de l'énergie ne constitue pas un véritable problème pour ces contrées, d'où le peu d'intérêt que peut offrir la production de biogaz (Massé et al., 1995). C'est par exemple le cas du Canada, des USA, de la Grande-Bretagne etc.

On peut également faire état d'études sur le compostage (compost et litières biomaîtrisées) à partir du lisier de porc (Tiquia et al., 1997 ; Percheron et al., 1997), ou le recyclage alimentaire du lisier (Harmon et Day, 1974 ; Bhattacharia et Taylor, 1975 ; Smith et Calvert, 1976 ; Fontenot et Webb, 1975). En effet, la littérature rapporte que le lisier de porc possède un potentiel sur le plan nutritif (Westerman et al., 1985). C'est dire que cet effluent polluant est un sous-produit qui peut être utilisé autrement que pour la fertilisation tout en évitant la pollution environnementale. La technique consistait soit à inclure directement le produit du séchage du lisier dans la ration alimentaire des porcs, ou encore, à donner à boire aux porcs (Diggs et al., 1965), du lisier ayant séjourné dans une fosse aérée. (annexe A) C'est dans cette voie de recyclage alimentaire du lisier de porc que s'inscrit notre démarche, notre thèse.

En fait, notre préoccupation est de savoir s'il est possible de recycler le lisier de porc en une biomasse levurienne, exempte de pathogènes, qu'on peut destiner à l'alimentation des porcs ? Une approche analogue a été décrite dans un brevet américain datant d'une trentaine d'année (Roger, 1970) montrant que le lisier de porc a été fermenté au moyen d'une source carbonée (la mélasse) et de la levure *Candida albicans*. Toutefois, le développement commercial de cette technologie semble avoir été handicapé tant par des considérations économiques (prix de la mélasse) que techniques (conception du bioréacteur aéré).

Il ne s'agit donc pas, comme dans les études précédentes, de simplement sécher ou désodoriser le lisier pour le donner ensuite à consommer aux porcs. Si nous savons que le lisier peut être recyclé comme aliment pour le porc, nous savons aussi qu'il est relativement riche en azote ammoniacal (2-4g/L), principal élément polluant du lisier par rapport aux autres nutriments tels que le carbone qui est facilement assimilable par les micro-organismes. Or, nous nous sommes fixés pour objectif de faire en sorte que le recyclage alimentaire du lisier de porc aboutisse à un produit qui soit enrichi en protéines (biomasse protéique). Il fallait donc trouver le type de micro-organismes capable de fixer efficacement l'azote contenu dans le lisier et de le transformer en protéines de bonne valeur nutritive. Le choix s'est ainsi porté sur les levures. Ces dernières sont en effet bien connues pour leur innocuité alimentaire et la plupart d'entre elles se prêtent bien à l'exploitation industrielle. Ainsi sont-elles régulièrement utilisées dans la panification et diverses fermentations alcooliques pour la production de vin, de cidre, de bière, de spiritueux (Barnett et al., 1990).

Cependant, les levures ne peuvent utiliser efficacement l'azote du lisier que si elles trouvent dans le milieu de culture, une source de carbone facilement assimilable pouvant fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et à la synthèse protéique visée.

Pour satisfaire ce besoin, nous nous sommes donc tournés vers le perméat de lactosérum, un substrat riche en carbone fermentescible, mais surtout un effluent produit en quantité ( $145 \times 10^6$  t par année au monde) comparable au lisier et qui tout comme ce dernier porte une charge polluante très élevée (DBO= 30 000 à 50 000 mg/L). Rappelons que le lactosérum contient des protéines de haute valeur nutritive qui peuvent être récupérées pour l'alimentation humaine ; mais le perméat étant un dérivé déprotéiné du lactosérum a une valeur commerciale quasi nulle. La levure pourra utiliser et l'azote (contenu dans le lisier) et le lactose du perméat de lactosérum pour proliférer et donner la biomasse recherchée.

Mais il ne suffit pas de mélanger du lisier, du perméat de lactosérum et des levures pour obtenir spontanément une biomasse riche en protéines. C'est en ayant cette préoccupation à l'esprit que nous avons cherché et déterminé la méthode permettant d'atteindre ce résultat, à savoir la fermentation aérobie. En fait, au lieu d'entreposer le lisier et l'épandre par la suite pour fertiliser des plantes qui convertiront l'azote ammoniacal en protéines végétales destinées à l'alimentation animale, notre démarche consiste à donner directement le lisier à des micro-organismes (les levures) qui, tout en fixant l'azote ammoniacal, le transforment également en protéines mais par le truchement d'une fermentation aérobie. En somme, en combinant du lisier, du perméat de lactosérum et des levures, nous comptons utiliser la fermentation aérobie pour produire une biomasse protéique destinée à l'alimentation des porcs.

Concrètement, cette étude fera l'objet de quatre chapitres. Dans un premier temps, le point sur l'état des connaissances sera effectué (chapitre I). Dans un deuxième mouvement, nous tenterons de définir un milieu de culture à faible coût de nature à permettre la production de protéines microbiennes utilisables à une plus grande échelle, par les producteurs de porcs.



Il s'agira plus précisément d'essais à l'échelle de laboratoire (chapitre II) qui permettront de fournir les prérequis pour une plus grande échelle, c'est à dire s'assurer que les levures sont capables de se développer abondamment dans un mélange lisier/perméat. Ce sera l'occasion de déterminer dans quelle proportion il convient de combiner le lisier et le perméat pour obtenir un bon développement des différentes souches de levures dans un milieu constitué de lisier de porc enrichi de perméat de lactosérum, et de manière à sélectionner ces levures pour ne retenir que la plus performante. Il faudra aussi déterminer dans quels rapports l'utilisation d'une telle levure permettrait d'obtenir un milieu apte à assurer une croissance maximale tout en évitant la prolifération des pathogènes.

Quant au troisième chapitre, nous y ferons état de notre démarche expérimentale à l'échelle pilote. Nous nous attacherons à vérifier un certain nombre de paramètres qui nous permettront d'être efficaces et proches de la réalité, ainsi que les résultats obtenus qui nous ont permis de sélectionner le bioréacteur avec lequel nous avons travaillé pour la suite des essais. Enfin, le chapitre IV sera consacré à l'optimisation des résultats obtenus au chapitre III. Il s'agira plus précisément d'améliorer la performance du bioréacteur et de vérifier un certain nombre d'éléments nécessaires pour évaluer au plan nutritionnel le produit issu de la fermentation.

Soulignons que nos expériences (après une période d'essais de faisabilité en laboratoire) se sont essentiellement effectuées à l'échelle pilote de manière à ce que les conclusions ne risquent pas d'être en déphasage avec la réalité. Elles ont conduit à des conclusions qui figurent dans nos différents chapitres et qui sont le résultat d'expériences plusieurs fois répétées dans les mêmes conditions mais avec des substrats industriels dont la composition pouvait varier légèrement dans le temps.

Les différentes expériences réalisées au cours de ce projet nous ont permis d'observer que les résultats étaient chaque fois semblables. Par ailleurs, notre préoccupation était d'obtenir un produit final qui ne sente pas, qui soit exempt de pathogènes et qui soit riche en protéines. Ce sont là des points que nous considérons comme critiques. Au cours de nos expériences, nous nous sommes par conséquent employés à les maîtriser, notamment en contrôlant entre autres, le niveau d'oxygène dissout dans le milieu et le pH.

## CHAPITRE I

### Etat des connaissances

Nous allons utiliser un certain nombre d'éléments dans la présente étude : les effluents d'élevage porcin qui appartiennent à la catégorie des déjections animales, le perméat de lactosérum de fromagerie et la levure *Kluyveromyces marxianus*. L'étude consiste à soumettre le lisier de porc additionné de perméat de lactosérum de fromagerie et de levures à une fermentation aérobie pour en faire un produit alimentaire destiné aux porcs.

Dans ce premier chapitre consacré à une revue de littérature, nous porterons successivement notre attention sur ce que nous avons appelé les éléments de base de notre étude à savoir, les déjections animales (I), le perméat de lactosérum (II) et *Kluyveromyces marxianus* (III). Ces éléments devant être soumis à un processus de fermentation, ce point sera également abordé par la revue de littérature (IV).

### *I : Diverses utilisations des déjections animales*

L'utilisation des déjections animales commande une meilleure connaissance de leur nature et de leur composition. Les déjections animales peuvent être définies comme les matières fécales excrétées par les animaux. Dans cette partie de notre étude, nous mettrons d'abord l'accent sur le lisier de porc, puis suivront l'utilisation des déjections animales comme fertilisant ou autre et comme supplément alimentaire pour les animaux.

## 1 Les effluents d'élevage porcin

Bien que le lisier de porc soit le matériel central dans cette étude, il est nécessaire de définir certains termes rattachés aux déjections animales de façon générale afin de lever toute équivoque. En effet, ces déjections peuvent être stockées sous des formes différentes représentant chacune un milieu de propagation des micro-organismes. C'est pourquoi, il convient d'entrée de jeu d'en préciser la signification et de donner la composition du lisier de porc.

### 1.1 Définitions

Le terme *fumiers* est souvent utilisé pour désigner à la fois le fumier (solide), le lisier et le purin. Le fumier est le mélange des déjections (féces et urine) et de la litière. Le purin est le liquide noirâtre qui s'écoule des amas de fumier solide. Bien qu'il existe plusieurs variantes de la définition du lisier de porc (Heduit et al., 1978; De Waele et al., 1974), nous retenons que ce dernier se compose d'un mélange liquide des urines, des déjections animales, d'eau et de débris alimentaires.

Les effluents d'élevage porcin sont très variables tant du point de vue apparence que du point de vue composition physico-chimique; avant d'envisager quelque traitement de valorisation que ce soit, nous devons prendre en considération la composition chimique et microbiologique de ce sous-produit d'élevage.

## 1.2 Composition chimique du lisier

La composition exacte est complexe et varie selon les conduites d'élevage, l'espèce animale, les rations alimentaires, la durée et le mode de conservation, l'âge et la fonction des animaux. On peut donc considérer chaque lisier comme un cas d'espèce (Pearce, 1975; Williams et Evans, 1981). Les rations alimentaires sont constituées d'hydrates de carbone, de protéines, de nutriments inorganiques (N, P, K), et de beaucoup d'éléments mineurs. On y trouve aussi des additifs tels que les antibiotiques, le cuivre et le zinc (Cluis et Couture, 1987).

### 1.2.1 L'eau

Le lisier de porc constitue un produit qui, sous sa forme naturelle, contient une importante proportion d'eau, des minéraux et des matières organiques (Lemelin et al., 1992 ; Hédut et al., 1978; Burton, 1992; Cluis et Couture, 1987). Cet excrément liquide contient environ 92 à 95% d'eau mais est fortement odorant et hautement polluant. Le principal constituant du fumier et du lisier est donc l'eau ( $H_2O$ ) qui provient essentiellement de l'urine, du débordement des abreuvoirs, du lavage des installations et des précipitations liées au climat.

### 1.2.2 Les éléments minéraux

Les trois éléments fertilisants majeurs du lisier sont le phosphore ( $P_2O_5$ ), le potassium ( $K_2O$ ) et l'azote (N); ce dernier se trouve aussi bien sous forme ammoniacale qu'organique. En moyenne 80% du phosphore et 87% du potassium de la ration alimentaire ne sont pas retenus par l'animal (Hédut et al., 1978 ; Cluis et Couture, 1987). Le phosphore est à 90% excrété dans les fèces. L'excrétion du potassium se fait à 80% dans les urines.

Le potassium est donc sous forme soluble dans le lisier et sa disponibilité est aussi grande que dans les engrais inorganiques. Les autres éléments minéraux sont apportés par les fèces à l'exception du sodium excrété au 2/3 dans l'urine, et sont moins facilement assimilables par les plantes. Le cuivre et le zinc se retrouvent en concentrations relativement élevées dans le lisier parce que ce sont des additifs alimentaires utilisés comme facteurs de croissance.

### 1.2.3 La matière organique

Les principaux composés organiques retrouvés dans le lisier de porc sont essentiellement les protéines, les glucides, les lipides, la cellulose et l'hémicellulose, la lignine, les acides aminés et les acides organiques dont les constituants chimiques les plus importants sont le carbone, l'oxygène, l'azote et le soufre (Anderson et al., 1987).

#### 1.2.3.1 La DBO et la DCO

La charge polluante d'un effluent est déterminée par trois paramètres qui sont la DBO (demande biochimique en oxygène), la DCO (demande chimique en oxygène), et les MES (matières en suspension). La fraction des composés organiques facilement biodégradables (digestibles) par les micro-organismes aérobies du milieu est désignée par la DBO<sub>5</sub> (demande biochimique en oxygène sur 5 jours). La DCO correspond à la fraction oxydable par un oxydant chimique, le bichromate de potassium (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Selon Burton (1992), seulement un peu plus de la partie représentant la DBO est métabolisable par activité microbienne. Le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> représente la biodégradabilité d'un effluent et donc son aptitude à être dégradé par voie biologique.

Si ce rapport est supérieur à 3, l'effluent est difficilement biodégradable (Burton, 1992; Hédouit et al. 1978). (Ce rapport est d'environ 3,4 pour le lisier).

Le lisier contient en plus de cet ensemble complexe d'éléments, une importante flore microbienne, constituée de tous les germes des matières fécales, y compris à l'occasion des germes pathogènes (Boutin et al., 1988; Bisailon et al., 1984; Bhattacharya et Taylor, 1975; De Waele et al., 1974 De Waele et al., 1974;). C'est ce que nous allons voir à travers sa composition microbiologique. À cause de sa grande concentration en micro-organismes et en matières organiques, le lisier requiert pour sa décomposition, une quantité importante d'oxygène (Boutin et al., 1988).

### 1.3 Composition microbiologique du lisier de porc

Le lisier de porc entreposé contient des micro-organismes qui proviennent de l'intestin des animaux et du milieu environnant (Bisailon et al., 1984). C'est un milieu nutritif qui favorise la prolifération d'une flore complexe pouvant y satisfaire ses besoins nutritifs. Il représente ainsi un milieu de culture propice à la propagation d'un grand nombre de micro-organismes, notamment psychrotropes, mésophiles, thermophiles, coliformes, aérobies, anaérobies, levures et moisissures, protozoaires, virus etc. (Bisailon et al., 1984). Cette flore sécrète des exoenzymes qui attaquent les molécules complexes, et les lysent pour les réduire en matériaux simples assimilables. Cette forte présence de micro-organismes dans le lisier pourrait, dans une certaine mesure, gêner la croissance souhaitée des levures par compétition pour le substrat. En outre, la présence de pathogènes peut constituer une entrave quant à la possibilité de recycler le produit fermenté dans l'alimentation des porcs.



Les transformations du lisier en cours de conservation diffèrent suivant les conditions d'oxydoréduction existantes (De Waele et al., 1974). La décomposition est dite aérobie ou anaérobie selon qu'elle s'effectue en présence ou non d'oxygène. Le procédé anaérobie produit des quantités importantes de gaz responsables de l'odeur typique du lisier entreposé. En condition aérobie, les micro-organismes trouvent suffisamment d'oxygène pour couvrir leurs besoins énergétiques en oxydant les glucides et les lipides principalement. Ces composés complexes sont alors transformés en des produits volatiles, en nitrite, nitrate et sulfate (De Waele et al., 1974).

## 2 Utilisation des déjections animales comme fertilisant

La fertilisation d'un sol consiste à améliorer l'aptitude de ce dernier à supporter le développement et la croissance des plantes en lui apportant des éléments organiques ou minéraux limitants. Cette technique est connue sous le terme d'épandage, qui peut être défini comme l'action d'étendre en dispersant sur ou dans le sol. Appliqué au lisier, la notion de répartition est doublée d'un but de fertilisation : rapporter aux sols, les éléments fertilisants utilisés par les plantes de la culture précédente. De façon générale, le fumier a toujours été apporté sur les champs, alors que le lisier a longtemps été considéré comme un sous-produit dont il fallait se débarrasser, surtout par déversement dans les cours d'eau (Anonyme, 1984).

Traditionnellement donc, les déjections animales ont été appliquées aux sols soit pour fournir des éléments nutritifs nécessaires aux cultures, soit comme amendement du sol, ou tout simplement pour se débarrasser d'un sous produit plutôt embarrassant. Le lisier fournit au sol une certaine quantité des principaux éléments fertilisants enlevés par les récoltes.

Quoiqu'il en soit, ces excréments jouent un rôle important dans l'entretien de la fertilité du sol et la production végétale compte tenu de ses teneurs en azote (N), phosphore (P) et potassium (K).

## 2.1 Essor de la production porcine et son impact

Les productions porcines ont connu un essor particulièrement remarquable au cours des dernières années. Selon l'organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la demande mondiale de viande de porc est telle qu'il faudrait doubler sa production. L'enjeu est donc important pour le Québec pour qui l'industrie porcine serait la plus rentable de tout le secteur agricole mais aussi la plus polluante. En effet, le porc représentait un chiffre d'affaires de 700 millions de dollars en 1996 et assurait 5000 emplois dans les fermes (Nadeau, 1996). Cette industrie génère malheureusement des sous-produits indésirables.

Les régions où la production porcine s'est fortement développée ne sont généralement pas productrices de céréales à paille ou de tout autre culture susceptible de fournir un substrat pouvant servir de litière pour les animaux. Cette situation a eu pour résultat, l'augmentation de la population animale sur des surfaces restreintes (Burton, 1992). La conception des bâtiments a ainsi évolué vers un équipement permettant de diminuer la main d'œuvre et de supprimer la litière (Heduit et al., 1978). Ainsi, le caillebotis a remplacé la litière et les déjections n'ont plus été collectées sous forme de fumier mais sous forme liquide.

C'est principalement cette présentation liquide qui est à l'origine des problèmes liés au lisier de porc aujourd'hui (Donhan et al., 1985; Williams et Evans, 1981; Hédut et al., 1978). Au Québec, l'élevage de porcs génère des volumes importants de lisier (25 millions de mètres cubes par année) entraînant des difficultés énormes de disposition. De ce fait, l'élimination du lisier de porc constitue une préoccupation environnementale de premier plan. Le schéma de disposition typique comporte trois étapes qui peuvent se résumer comme suit :

- 1 le lisier est d'abord recueilli sous le plancher de la porcherie
  - 2 il est dirigé par gravité vers la préfosse
  - 3 il est ensuite pompé dans une fosse généralement extérieure et non couverte.
- Compte tenu des volumes énormes générés mais aussi de sa valeur fertilisante, la seule technique disponible présentement pour éliminer efficacement ce sous-produit est l'épandage (Laguë et al., 1994).

D'ailleurs, pour beaucoup de producteurs de porcs, l'épandage sur champ est le mode de disposition le plus rationnel et le plus économique. Cependant, ce type de gestion des rejets d'élevage porcin présente certains aléas. La concentration des éleveurs dans certaines régions a engendré toute la problématique actuelle liée à la gestion de cet effluent. En effet, l'épandage ne répond pas aux exigences de l'environnement parce qu'il n'existe simplement pas assez de terres disponibles dans le voisinage des porcheries. En fait, c'est lorsqu'il faut se déplacer pour aller épandre à distance dans un rayon généralement supérieur à deux kilomètres que la situation devient problématique (Nadeau, 1996; Gangbazo et Buteau, 1985).

Par ailleurs, les coûts faramineux liés à l'épandage (équipements, transport) sont difficilement supportables par le producteur, sans omettre le facteur climatique et la capacité insuffisante de certains réservoirs à lisier. Aussi, parce que le lisier ne peut être épandu sur un sol gelé, les éleveurs canadiens par exemple doivent se munir d'une fosse étanche capable de maintenir des volumes de lisier correspondant à au moins 250 jours de production (Burton, 1992 ; Nadeau, 1996).

L'épandage, seul mode de recyclage agronomique du lisier, est soumis à de nombreuses contraintes liées à la nature du produit, aux équipements d'épandage, au climat et à l'insuffisance de capacité de stockage. Il arrive alors qu'on surcharge les sols par un épandage abusif ou qu'on laisse simplement l'excédent de lisier s'écouler vers les cours d'eau (Aquatech, 1983).

Le lisier est donc considéré comme un fléau dans les localités où sont concentrées les grandes exploitations porcines telles que les bassins versants des rivières Yamaska, Chaudière et l'Assomption où les excédents de fumier peuvent être évalués à environ 300 à 500 tonnes par année (Gangbazo et Buteau, 1985; Cluis et Couture, 1987). Le problème de fond, c'est la densité du cheptel dans une région donnée.

Malgré les avantages liés à l'épandage, la disposition massive du lisier a des impacts négatifs. Ces conséquences tiennent dans le fait que le déversement de grands volumes de lisier dans les cours d'eau est eutrophisant sans compter que le lisier est toxique en plus de générer beaucoup de désagréments olfactifs pour les populations riveraines. Enfin, le lisier pouvant être porteur de micro-organismes pathogènes, on comprendra aisément les risques élevés de pollution de l'eau. On comprendra également qu'il puisse compromettre la santé et la sécurité tant des humains que des animaux (Anonyme, 1984 ; Donhan et al., 1985 ; Gangbazo et al., 1992).

## 2.2 La pollution des eaux

Les pratiques d'élevage intensif occasionnent généralement trois formes de pollution des eaux, à savoir une pollution organique, inorganique et microbienne.

### 2.2.1 La pollution organique

La pollution dans ces conditions résulte de la demande en oxygène du lisier. L'épandage est responsable d'écoulements considérables de nutriments dans ces milieux et les matières nutritives accélèrent la croissance des algues et l'eutrophisation des cours d'eau. Ces matières inorganiques et organiques favorisent aussi la prolifération des micro-organismes qui utilisent l'oxygène de l'eau pour leur croissance. Cette activité de biodégradation absorbe beaucoup d'oxygène ( $DBO_5$ ) et peut dans certains cas épuiser l'oxygène dissous dans l'eau, contribuant ainsi à la disparition des populations de poissons et de la faune aquatique (Gangbazo et al., 1992; Burton, 1992).

### 2.2.2 La pollution inorganique

La pollution inorganique occasionne, quant à elle, une contamination des eaux souterraines et des sols (Spoelstra 1980). En effet, l'azote du lisier peut conduire à la nitrification de sels d'ammonium dans le sol conduisant à la production de nitrates qui contamineront la nappe phréatique; par ailleurs l'accumulation de phosphore ( $P_2O_5$ ) dans le sol conduit par un phénomène de lessivage à l'eutrophisation des eaux de surface (Lenis, 1991; Burton, 1992; Aarmink et al., 1995; Sylvestre et Blais, 1986).

L'élevage porcin s'est aussi développé dans plusieurs pays d'Europe notamment, l'Angleterre, les Pays Bas, la France, etc... Certaines régions de la France dont la Bretagne, la vallée de la Loire, l'Aquitaine (Heduit et al., 1978) sont aux prises avec la gestion du lisier de porc. La Bretagne constitue la région de France où la contamination de la nappe phréatique est la plus marquée.

### 2.2.3 La pollution bactérienne

La contamination des eaux de surface par les lixiviats de fumier ou de lisier s'accompagne généralement d'un taux élevé de bactéries coliformes ainsi que d'autres bactéries dont certains peuvent être pathogènes (exemple : salmonelles, *Campylobacter*). Elle constitue un danger pour les humains et les animaux des municipalités concernées qui consomment ces eaux (Gangbazo et Buteau, 1985).

### 2.2.4 La pollution olfactive

Le problème relatif à l'émanation d'odeurs se situe à deux niveaux : celui des bâtiments (en raison de l'entreposage et de la manutention) et celui de l'épandage. Ce dernier constitue d'ailleurs le problème principal (Burton, 1992). De ce fait, nous allons nous y intéresser plus en détail.

L'épandage de lisier présente les caractéristiques d'une nuisance olfactive qui peut se définir comme un phénomène jugé désagréable par les individus qui y sont confrontés. Il est alors considéré comme une atteinte à leur bien-être. La nuisance incommode généralement d'une manière épisodique et n'a pas d'effet destructif ou toxique documenté (Lefèvre et al., 1978).

#### 2.2.4.1 Généralités

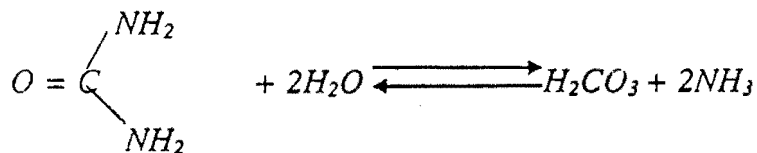
L'odeur des lisiers est souvent la première caractéristique que les gens associent à la pollution agricole. C'est aussi un inconvénient qui rebute certains producteurs agricoles à accepter les lisiers à titre de fertilisants; ils préfèrent alors utiliser des engrais chimiques pour maintenir de bonnes relations avec le voisinage (Caouette et al., 1993). Réduire le problème des odeurs pourrait donc améliorer la qualité de vie en milieu rural ainsi que l'image de la production porcine. Cela pourrait également accroître la demande des lisiers comme fertilisants, permettant ainsi d'améliorer la situation pour les régions aux prises avec des surplus de lisier.

Le contrôle des odeurs est donc devenu une priorité pour l'industrie porcine puisque la pollution environnementale est aujourd'hui une préoccupation majeure dans le monde entier. Les populations vivant aux alentours des porcheries tolèrent de moins en moins les odeurs. Cette réalité se traduit par les nombreuses poursuites judiciaires contre les éleveurs (Arogo et al., 1995; Ritter, 1989; Williams et Evans, 1981)

Il convient cependant de mentionner que le problème des odeurs occasionnées par l'élevage de porcs n'est pas nouveau. C'est une situation qui s'est tout simplement aggravée au fil des années. En effet l'un des premiers exemples de jugement rendu en matière de pollution de l'air remonte à 1611 avec la condamnation par un tribunal anglais d'un accusé qui avait construit sa porcherie si près de la maison du plaignant que l'air en était "corrompu" (Lefèvre et al., 1978). L'odeur étant devenu un facteur limitant à l'expansion de l'industrie porcine (Davidson et al., 1995), il convient de comprendre son origine afin de mieux cerner le processus de production et de suggérer les correctifs appropriés.

#### 2.2.4.2 Origine des odeurs

Dans les conditions habituelles de stockage, le lisier subit naturellement une fermentation anaérobie compte tenu de sa forte charge organique. La décomposition anaérobie étant décrite comme un processus au cours duquel les protéines et les glucides sont progressivement convertis en des molécules plus simples (Burton, 1992; Spoelstra, 1980) et ultimement, en méthane (CH<sub>4</sub>) et en gaz carbonique (CO<sub>2</sub>). Cette transformation peut également se faire par voie enzymatique telle que l'hydrolyse de l'urée en NH<sub>3</sub> et en CO<sub>2</sub> qui est un processus rapide (Spoelstra, 1980).



Urée

Cette fermentation produit donc plusieurs composés intermédiaires odorants (acides organiques, azote ammoniacal), et des gaz toxiques dont l'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) et le méthane (CH<sub>4</sub>). C'est dire que la fermentation anaérobie produit de hautes concentrations de composés volatils et malodorants (acides gras volatils, mercaptan, p-crésol, phénol, scatol, indole amines,...) (annexe E). La dégradation microbiologique se poursuit aussi longtemps que les conditions environnementales le permettent (Elliot *et al.*, 1978).

L'azote ammoniacal, en tant qu'élément polluant majeur du lisier de porc, a fortement motivé notre choix d'utiliser ce dernier comme support (représentant un coût nul) pour la croissance de levures, dans un procédé de fermentation aéré. Nous nous y attacherons donc de façon plus particulière.



#### 2.2.4.3 L'azote ammoniacal du lisier

Les activités agricoles sont la source principale d'émission d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) (Groenestein et Van Faassen, 1996; Andersson, 1996).

D'ailleurs, les émissions de  $\text{NH}_3$  issues des lisiers et fumiers représentent la plus grande source (80%) de  $\text{NH}_3$  atmosphérique en Europe (Moal, 1994). Le lisier produit annuellement en Bretagne par l'élevage porcin renferme environ 50 000 tonnes d'azote sous forme ammoniacale ( $\text{N-NH}_4^+$ ) (Aarmink, *et al.*, 1995).

Rappelons que de tous les composés odorants du lisier de porc, le  $\text{NH}_3$  cause le plus de problèmes. En effet, l'ammoniac peut contribuer à la détérioration de l'atmosphère de façon significative. Il contribue à l'enrichissement du sol et des eaux en azote (Andersson, 1996). Il peut même contribuer à la dégénérescence de la forêt et à l'extinction de certaines plantes sauvages. Une concentration élevée à l'intérieur de la porcherie peut influencer la productivité voire la santé des animaux. L'azote ammoniacal ( $\text{NH}_3$ ) est un produit issu de la transformation des composés azotés (urée, protéines et acides aminés, etc.) des déjections animales qui se volatilisent au contact de l'air. L'azote est à 30% excrété dans les fèces et à 70% dans les urines. L'azote urinaire est sous forme uréique et ammoniacale biodégradable alors que l'azote fécal est sous forme organique complexe et donc plus lentement dégradé (Jongbloed et Lenis, 1992 ; Lenis, 1991). En début de stockage, l'azote ammoniacal représente jusqu'à 75% de l'azote total Kjeldhal ( $\text{N}$  organique +  $\text{NH}_3$ ). Chez le porc, la totalité de l'azote soluble est sous forme ammoniacale. Au cours de l'entreposage, au contact de l'urine et des fèces, l'urée est converti (comme ci-dessus décrit) rapidement en ammoniac et en gaz carbonique par l'uréase (enzyme produite par la microflore dans les fèces).

En fait, environ 85 % de l'ammoniac provient de l'urée et les 15 % restant, de la décomposition des protéines non digérées dans les fèces (Lenis, 1991 ; Spoelstra, 1980).

Le lisier apporte donc principalement les nutriments azotés à la levure qui en a absolument besoin pour sa croissance. En fixant l'azote du lisier sous des conditions aérobies, pour la synthèse des protéines par exemple, les levures lui enlèvent un polluant majeur ( $\text{NH}_3$ ) et contribuent ainsi à sa valorisation.

En opérant de la sorte, le procédé que nous envisageons pourra générer une biomasse protéique tout en atténuant les problèmes d'odeur. D'où l'intérêt de l'utilisation du lisier de porc comme support de croissance microbienne dans ce travail.

### 3 Traitements du lisier de porc

De nombreux chercheurs préoccupés par la valorisation du lisier de porc et/ou l'élimination des odeurs ont orienté leurs efforts vers les traitements par bioconversions aérobies ou anaérobies. L'objectif de ces approches est de réduire la charge organique du lisier par la dégradation de ses composés organiques. La digestion anaérobie conduit à la production de biogaz tandis que la digestion aérobie permet une stabilisation biochimique du lisier en éliminant les odeurs nauséabondes (Ginnivan, 1982; Ginnivan et al., 1981 ; Doyle et De La Noüe, 1987 ; Hédut et al., 1978.; Evans et al., 1982; Burton et Farrent, 1995). Malgré les avantages de l'oxydation sur la digestion anaérobie, le problème principal reste le coût de l'énergie.

De façon générale, les ingénieurs jugent l'aération forcée trop coûteuse pour être utilisée; par ailleurs, la fermentation anaérobie n'est pas appropriée au contexte climatique, énergétique et économique du Canada; de plus, elle ne résout que partiellement les problèmes liés au pouvoir polluant du lisier (Bernier et Bruneau, 1982).

Les limites des systèmes biologiques de traitement des déchets sont largement connues (Ginnivan et al., 1981) et sont attribuées fondamentalement à l'incapacité de la microflore indigène à digérer rapidement et de façon extensive la matière organique dans les conditions environnementales requises.

La technique de la litière biomâtrisée, connue au Japon et en Europe depuis plus d'une décennie, semble retenir l'attention au Canada depuis quelques années.

Elle consiste à maintenir des porcs sur une litière épaisse qui se transforme progressivement en compost. C'est donc une technique de compostage *in situ* des déjections. Ce procédé conduit à la production de CO<sub>2</sub>, d'H<sub>2</sub>O, et de matières minérale et organique.

Tableau 1.1. Inventaire des techniques de traitement et de recyclage du fumier  
(Cournoyer et Bernier, 1993; Hédut, *et al.*, 1978)

| Techniques  | Description   |
|---|---|
| <b>Traitement avec retour au sol du lisier traité</b>                         |   |
| <i>Techniques de séparation</i>   | Consiste à séparer les solides du liquide   |
| Séparation gravitaire →   | Est une décantation naturelle   |
| Tamisage →  | Permet d'obtenir un liquide à plus faible viscosité   |
| Centrifugation →  | la séparation solides-liquide s'effectue par décantation centrifuge   |
| Osmose inverse →  | le liquide passe dans le sens du gradient de concentration sous pression  |
| <i>Désodorisation</i>   | Permet de limiter l'intensité ou de modifier les odeurs de lisier soit par adjonction de substance chimique, soit par introduction d'oxygène au sein du liquide.                    |
| Désodorisation chimique →   |   |
| Désodorisation par aération →   |   |
| <i>Compostage</i> →   | Est un type de fermentation aérobie où la matière organique est transformée en CO <sub>2</sub> et H <sub>2</sub> O ; le compost est utilisé comme amendement organique pour le sol. |
| <i>Traitement anaérobie</i>   | Consiste à stabiliser la matière organique avec production de biogaz. On entend par traitement anaérobie la fermentation méthanique   |
| <b>Traitement sans retour au sol du lisier</b>                                |   |
| <i>Traitements aérobies</i>   | La biotechnologie aérobie est principalement utilisée pour réduire la charge organique du fumier.   |
| Digestion aérobie →   | Des micro-organismes stabilisent la matière organique   |
| boues activées →  | Réduction marquée des odeurs associées au fumier. Consiste en une digestion aérobie suivie d'une décantation.   |
| lagunage aéré →   | Consiste à laisser séjourner longtemps l'effluent dans une fosse où un aérateur flottant incorpore continuellement de l'air.  |
| fosse d'oxydation →   | le vent permet l'aération de la fosses  |
| <b>Techniques de recyclage</b>  | Elles mènent à un produit ou un sous-produit utilisable.  |
| Production de protéines unicellulaires<br>recyclage alimentaire<br>compostage | le lisier seul ou mélangé avec d'autres ingrédients peut nécessiter un traitement préalable afin de changer la nature du substrat et de détruire les pathogènes.                    |

Au terme de cette partie concernant la gestion du lisier de porc, nous constatons que l'épandage qui était exclusivement la seule avenue du lisier de porc autrefois, constitue encore aujourd'hui un mode privilégié de disposition, de ce sous-produit même si d'autres manières d'en disposer, comme la digestion aérobie ou anaérobie, le compostage et la litière biomâtrisée par exemple, ont fait leur apparition depuis. Il est à noter qu'actuellement on a toujours recours au compostage et à la fermentation anaérobie (Zhang et al., 1997; Percheron et al., 1997; Tiquia et al., 1997; Lin et al., 1997 ; Vartak et al., 1997; Kuroda et al., 1996 ). Une avenue déjà proposée et explorée de recyclage de ces déchets dans l'alimentation des animaux mérite néanmoins une attention particulière.

#### 4 Utilisation des déjections dans l'alimentation animale

La consommation de déjections par les animaux n'est pas une pratique nouvelle puisque la coprophagie existe dans le règne animal depuis bien longtemps. Le recyclage alimentaire du fumier est une pratique naturelle chez les oiseaux et les animaux sauvages et parfois même chez les animaux domestiques (Robert et al., 1975). On l'observe en particulier chez le lapin.

La première utilisation de déjections animales pour alimenter des animaux domestiques remonte au début des années 1900 avec l'élevage de porcs dans l'ouest des Etats-Unis (Council, 1978). Cette alternative de recyclage du fumier fut précisément reconnue en 1916. Sur le plan expérimental, ce n'est qu'au début des années 1940 que des essais documentés de recyclage alimentaire ont débuté avec l'évaluation du potentiel nutritif des fumiers (Council, 1978).

Depuis ce temps, les recherches se sont multipliées. Ainsi, plusieurs producteurs ont eu à recycler une partie de leur fumier dans l'alimentation des animaux (Robert et al., 1975). L'intérêt de cette pratique s'est intensifié surtout pendant les périodes où le coût des aliments était élevé comparativement au prix des animaux et des produits animaux. C'est ainsi qu'en 1976, Smith et Calvert ont nourri des bovins avec des fientes de poulet. En 1971, Flegal et Zindet ont nourri des poulets avec leurs propres excréments. En 1975, Pearce a inclus du lisier de porc dans la diète de ruminants. Quant à Harmon et ses collaborateurs (1972), ils ont étudié la valeur nutritive du lisier de porc en vue de son utilisation comme source liquide d'abreuvement pour les porcs.

#### 4.1 Recyclage alimentaire

Le recyclage alimentaire du fumier a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche (Smith, 1973; Bhattacharya et Taylor, 1975 ; Fontenot et Webb, 1975 ; Harmon et Day, 1974). Pour Robert et al., (1975), de tous les concepts développés pour l'utilisation du fumier, seul le recyclage alimentaire des éléments nutritifs pourrait être plus valorisant sans le développement d'une nouvelle technologie. Aussi, Bhattacharya et Taylor (1975) ont trouvé les déjections animales suffisamment riches en nutriments assimilables pour que l'on considère leur utilisation dans la composition des rations alimentaires animales. Cette éventualité pourrait permettre d'abaisser les coûts de production des animaux tout en diminuant les problèmes de pollution causés par certains types de fumier (Ginnivan et al., 1980).

Les déjections animales ont une valeur nutritionnelle non négligeable. La performance de croissance des animaux nourris avec des rations dans lesquelles la fiente de poulet a remplacé d'autres ingrédients n'est pas altérée de façon substantielle si ces rations contiennent des quantités équivalentes de ces nutriments (Council, 1978). Selon Smith et Wheeler (1979), le fumier est une ressource alimentaire dont le potentiel nutritif et économique est actuellement encore sous exploité. Chez les ruminants, la valeur économique du fumier serait 3 à 10 fois supérieure à leur valeur comme source d'éléments fertilisants pour les plantes lorsqu'il est utilisé comme supplément alimentaire dans une diète bien équilibrée. D'ailleurs, chez ces derniers, la productivité (lait, performance de croissance, etc.) est équivalente à celle des ruminants nourris avec la diète conventionnelle. Les grains de céréales sont naturellement faibles en minéraux et en protéines brutes. On pourrait donc améliorer la valeur nutritionnelle de ces céréales et équilibrer la ration alimentaire en y ajoutant du fumier.

#### 4.1.1 Recyclage alimentaire de la matière sèche du fumier sans traitement préalable

Diggs et al., (1965) ont observé, en incorporant 15% de lisier de porc séché à la ration alimentaire des porcs à l'engraissement, des gains de poids journaliers et des taux de conversion alimentaire équivalents à ceux d'une ration conventionnelle à base de maïs et de soya. Par contre, l'incorporation de 30% de lisier de porc séché à la ration en diminue la valeur alimentaire. Allant dans le même sens, les travaux de Kornegay et al., (1977) ont montré que la valeur alimentaire de rations utilisant 21,7 et 37,3% de fumier séché de porc à l'engraissement est moins grande que celle des rations conventionnelles à base de soya et de maïs. Le tableau 1.2 indique le pourcentage d'utilisation par le porc de différentes fractions du fumier.

Tableau 1.2. Utilisation alimentaire par le porc, de différentes fractions du fumier de porc (Kornegay et al., 1977)

|                             | Utilisation<br>(%) |
|-----------------------------|--------------------|
| Matière sèche               | 48,0               |
| Énergie                     | 46,7               |
| Cendres                     | 31,6               |
| Fibres brutes               | 40,9               |
| Composés extraits à l'éther | 54,1               |
| Protéines brutes            | 60,1               |
| Protéines vraies            | 51,4               |
| Composés azotés libres      | 45,9               |

#### 4.1.2 Recyclage alimentaire du lisier de porc (ou du fumier) après traitement aérobie (mésophile et thermophile)

Du lisier aéré dans une fosse d'oxydation a été utilisé avec succès par Harmon et Day (1974) à des fins de recyclage alimentaire. Au cours de cette expérience, le surnageant de cette fosse oxygénée dite *oxidation ditch* a été servi à un groupe de porcs par inclusion dans la ration sous forme de liquide d'abreuvement et comme seul apport de liquide.



Comparé à un groupe témoin de porcs recevant de l'eau comme seul liquide d'abreuvement, ces chercheurs ont constaté que les porcs abreuvés avec le surnageant aéré croissaient plus rapidement que le groupe témoin avec en plus, un meilleur taux de conversion alimentaire si l'aération du lisier était adéquate. Dans le cas où l'aération s'avérait insuffisante, ils observaient l'effet contraire.

D'ailleurs, une étude menée par l'équipe de (Harmon et Day, 1974) indique que le lisier aéré possède une bonne valeur nutritive. En effet, selon ces derniers, en plus des protéines, le surnageant contient d'autres nutriments tels que des vitamines, des minéraux et quelques facteurs de croissance non identifiés. Les protéines issues d'un tel système pourrait remplacer le tiers ou la moitié des protéines de soja ou de la caséine et supporter un gain de poids adéquat.

Cependant, ce gain pourrait décroître si le supplément constituait plus de la moitié de la ration. Ces mêmes auteurs ont indiqué que le produit inodore obtenu après ce système d'aération n'a pas un goût dissuasif pour son utilisation en alimentation animale

Tableau 1.3. Performance de porcs abreuvés avec de l'eau pure ou du surnageant de fosse aéré (Harmon et Day, 1974)

| Essais  | Gain journalier (Kg) |            | Conversion alimentaire<br>(Kg gain/Kg aliment ingéré) |            |
|---------|----------------------|------------|---|------------|
|         | Eau                  | Surnageant | Eau   | Surnageant |
| 1       | 0,61                 | 0,63       | 0,303   | 0,308      |
| 2       | 0,66                 | 0,70       | 0,296   | 0,297      |
| 3       | 0,77                 | 0,90       | 0,244   | 0,343      |
| 4       | 0,60                 | 0,72       | 0,230   | 0,278      |
| 5       | 0,58                 | 0,66       | 0,260   | 0,263      |
| 6       | 0,71                 | 0,79       | 0,309   | 0,338      |
| Moyenne | 0,66                 | 0,73       | 0,274   | 0,304      |

Des travaux effectués par Ginnivan *et al.*, (1981) et portant sur le traitement aérobie thermophile du lisier à 55°C indiquent que la digestion thermophile a l'avantage d'éliminer les pathogènes et les parasites. Les aspects économiques d'un tel traitement ne semblent toutefois pas avoir été exposés en profondeur

Comme la plupart des activités humaines, l'utilisation du fumier dans l'alimentation animale présente des risques et des avantages. Cependant si cette pratique d'alimentation se fait dans les conditions adéquates, les inconvénients peuvent être atténués alors que les avantages pour les producteurs et les consommateurs sont considérables (Council, 1978).

#### 4.2 Risques potentiels encourus par la pratique du recyclage alimentaire des déjections animales

Les principales inquiétudes dans ce domaine sont les risques de transmission de maladies, la possibilité d'un effet nuisible des résidus de médicaments, de certains minéraux et diverses toxines incluant les résidus de pesticides. Diverses formes de fumier ont été recyclées dans l'alimentation de plusieurs espèces d'animaux sans effets adverses sur l'animal ou sur des produits comestibles indiquant que l'on peut obtenir des produits de qualité et sans risque pour la santé (Robert et al., 1975).

D'ailleurs, pour McCaskey et Anthony, (1979), il ne faut pas s'attendre à ce que des rations formulées avec du fumier soient exemptes de micro-organismes d'autant plus que les aliments conventionnels en renferment des quantités importantes.

Selon Fontenot et Webb (1975), les risques liés au recyclage alimentaire des déchets ne sont pas encore établis. En effet, il n'existe aucun document relatant une épidémie ou une maladie quelconque à la suite de la consommation de déjections animales. Les conclusions de ces auteurs sont corroborées par un avis de la FDA (Food and Drug Administration) qui stipule qu'aucun problème de santé lié à l'alimentation de déjections animales n'a été rapporté (Council, 1978).

Cependant, bien qu'aucun problème n'ait été rapporté, le fumier nécessite des traitements ou des transformations avant son utilisation en alimentation animale dans le but de réduire les risques potentiels. En outre, le fumier doit provenir d'animaux en bonne santé pour minimiser les risques de transmission des agents pathogènes qui pourraient s'y trouver.

#### 4.2.1 Risques sanitaires

Plusieurs organismes pathogènes (bactéries, virus, champignons et parasites) capables de causer des maladies chez l'humain, le bétail et la volaille ont déjà été isolés des fumiers animaux (Bhattacharya et Taylor, 1975).

Il existe des preuves selon lesquelles le fumier pourrait, à des moments bien précis, contenir des pathogènes. Ces agents peuvent provenir non seulement d'animaux malades mais aussi, de ceux qui ne présentent aucun symptôme (porteurs sains). Cependant, aucune source d'épidémie ou de maladie n'a été rapportée à ce sujet. L'absence de maladies résultant de cette pratique peut être due en partie à deux facteurs (Anonyme, 1972):

- 1 les pathogènes des humains et des animaux survivent difficilement en dehors de leur hôte. Dans ces conditions, ils sont soumis à des stress environnementaux et à des compétitions avec une microflore mieux adaptée
- 2 les défenses immunitaires naturelles protègent le corps contre les agents infectieux.

L'animal est protégé des pathogènes auxquels il pourrait être exposé en consommant du fumier par plusieurs mécanismes. Ce sont notamment, le tapissement du système digestif par des couches cellulaires contiguës, empêchant l'entrée des pathogènes dans les tissus à moins qu'il n'y ait des blessures. Les enzymes digestives et les variations de pH de l'appareil digestif et les sécrétions biliaires sont létales pour plusieurs pathogènes. Le système immunitaire de l'animal est généralement efficace contre les pathogènes provenant du fumier produit par les mêmes espèces et pourrait même contribuer à fournir très tôt une immunité acquise aux animaux (Anonyme, 1972).

Si le fumier d'un groupe d'animaux est utilisé par le même troupeau et que l'un de ces animaux excrète un pathogène, il est improbable que chacun des animaux concernés ingère une dose infectieuse de ce pathogène en particulier. Il est tout aussi improbable que ce pathogène prolifère de façon importante dans un substrat et sous des conditions moins favorables à ses exigences physiologiques (Anonyme, 1972).

#### 4.2.2 Risques d'intoxication

Plusieurs types de suppléments sont généralement utilisés pour équilibrer la diète des porcs. Une partie de ces éléments se retrouve inévitablement dans les déjections et peut constituer des risques dans le recyclage alimentaire en circuit fermé.

##### 4.2.2.1 Risques d'intoxications liées aux éléments minéraux

Beaucoup d'appréhensions ont été exprimées au sujet des risques liés à l'accumulation de métaux lourds et autres minéraux dans le fumier. À ce jour, le seul minéral pour lequel des niveaux de toxicité ont été rapportés est le cuivre (accumulation dans le foie) dans l'alimentation de brebis nourries avec des fientes de poulet. Cependant, cette observation ne constitue pas un problème pour d'autres espèces animales puisqu'elles sont moins sensibles que les moutons à des niveaux élevés de cuivre. Des diètes contenant du cuivre jusqu'à 900 ppm ont été servies à des veaux sans effets nocifs sur leur santé et leurs performances de croissance (Felsman et al., 1973). Fontenot et al., (1971) ont rapporté des cas d'avortement chez des vaches nourries à de faibles niveaux de déchets de volaille (ces déchets contenaient une certaine activité oestrogénique provenant de l'alimentation des oiseaux avec de l'acétate de dienestrol).

Cependant, l'utilisation de l'hormone diethylstilbestrol à des niveaux plus élevés que l'oestrogène dans les précédents travaux n'a jamais causé d'avortement (Fontenot et al.; 1971). Les déjections de volailles ou de mammifères sont encore utilisées par plusieurs producteurs de bouvillons d'engraissement au Québec comme ailleurs dans le monde sans incidents répertoriés (Charmley et O'Keilly, 1997).

D'autre part, il n'y a pas de raison particulière de croire selon le FDA, que la présence de mycotoxines dans le fumier constituerait plus de problèmes que sa présence dans les aliments traditionnels qui en contiendraient d'ailleurs des quantités équivalentes (Council, 1978).

#### 4.2.2.2 Risques liés à l'usage de médicaments

Plusieurs sortes de médicaments sont utilisées en production animale pour améliorer la valeur alimentaire et stimuler la croissance. Une partie de ces substances est excrétée dans les déjections et les préoccupations qui en résultent ne se situent pas tant au niveau des résidus du fumier que des résidus potentiels qu'on peut retrouver dans les tissus comestibles destinés à la consommation humaine. Les résultats de certains travaux n'ont heureusement décelé aucun problème sérieux de résidus dans les tissus animaux (Webb et Fontenot, 1975).

#### 4.3 Production de protéines microbiennes

Selon des travaux rapportés par Harmon et Day (1974), le fumier liquide traité dans une fosse aérée peut être utilisé comme un liquide d'abreuvement riche en nutriments. Le conditionnement par fermentation aérobie convertit en effet une partie de la matière organique en protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.).

Ces auteurs ont réduit de 15% la teneur en protéine de la ration des porcs en remplaçant l'eau par le produit fermenté contenant les P.C.U et provenant de la fosse aérée. Cette méthode peut être utilisée pour la supplémentation des aliments pour porcs et volailles, étant donné que les monogastriques sont incapables d'utiliser l'azote non protéique contenu dans le lisier.

Comme nous venons de le voir, le lisier peut renfermer des micro-organismes pathogènes qui constituent une entrave dans le cadre d'un recyclage alimentaire. Pour cette raison, on doit prendre les précautions nécessaires pour les éliminer ou, à la limite, réduire leur nombre à des niveaux ne présentant pas de danger d'infections.

Les micro-organismes indésirables peuvent être détruits par la chaleur, la fermentation, des moyens chimiques, etc. Ainsi, l'ensilage, divers traitements chimiques et thermiques, le compostage, la déshydratation, le traitement aérobie dans des fosses aérées et la production de protéines d'organismes unicellulaires ont été utilisés pour traiter les fumiers destinés à l'alimentation animale (Cournoyer et Bernier, 1993).

## 5 Conclusion partielle

Les problèmes de pollution tels qu'on en rencontre aujourd'hui nécessitent des solutions innovatrices, capables de minimiser les pertes d'éléments minéraux et les charges polluantes de l'environnement. Au terme de cette revue de littérature sur le lisier de porc, il apparaît que cet effluent possède un potentiel de valorisation puisqu'il présente une valeur nutritive exploitable. Le lisier de porc pourrait être utilisé seul dans la production de biomasse levurienne s'il était à la fois riche en azote et en glucides fermentescibles. Notre préoccupation étant de le rendre propice à la croissance des levures, il s'imposait de le compléter avec un substrat carboné facilement utilisable par les levures.

Toutefois, il demeure évident qu'un tel choix dépend de la nature et de la disponibilité des matières premières nécessaires à la culture de ces micro-organismes.

Ainsi et dans le but de rendre économiquement viable le produit généré par la fermentation du mélange lisier/substrat carboné, il est important d'utiliser une source de carbone peu coûteuse et disponible en grande quantité. Dans ce contexte, une série de sous-produits utilisés pour la production de protéines alimentaires a été envisagée. Ce sont notamment le perméat de lactosérum de fromagerie, le lactosérum entier et la mélasse. Cependant, compte tenu du coût de la mélasse et des différentes techniques de valorisation du lactosérum entier, nous avons opté pour le perméat de lactosérum. Ce choix s'explique par l'abondance de ce dernier. C'est aussi un matériel peu coûteux mais difficile à éliminer à cause de sa charge organique élevée; il pose donc un problème majeur pour l'environnement. Lui trouver une fonction utilitaire, telle que nous l'envisageons ici, contribuera à solutionner un ensemble de problèmes à peu de frais et à favoriser dans certains cas le développement de certaines industries laitières.

## *II : Le perméat de lactosérum*

### 1 Définition

Le lactosérum ou petit lait de fromagerie est le liquide jaunâtre qui se sépare du caillé lors de la fabrication du fromage. Le perméat de lactosérum peut quant à lui être défini comme le sous-produit laitier provenant de la production de concentrés de protéines sériques par ultrafiltration, à partir du petit-lait de fromage (Gonzalez Siso, 1996). Il représente environ 85-95% du volume du lait et retient 55% des nutriments du lait dont le lactose, les protéines, les lipides et les sels minéraux.



Ces protéines de très haute valeur alimentaire sont récupérées pour être réincorporées dans d'autres produits destinés aux humains (Horton 1995 ; Jacques, 1993).

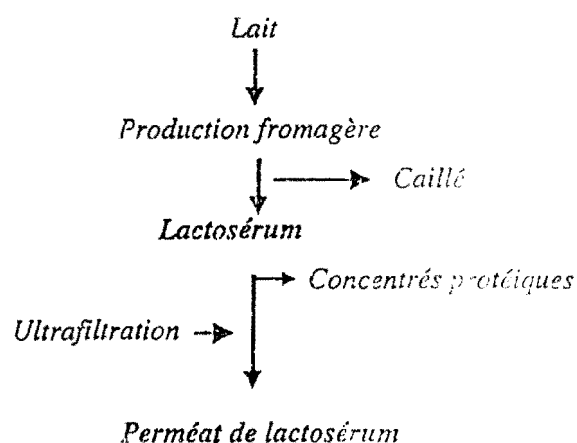


Figure 1.1. Produits et sous-produits de l'industrie fromagère (adaptée de Jacques, 1993).

## 2 Composition

Tableau 1.4. Composition moyenne des sous-produits de l'industrie fromagère (adapté de Jacques, 1993)

| Constituant           | Lactosérum doux<br>(fromage cheddar) | Lactosérum acide<br>(fromage cottage et de<br>spécialité) | Perméat de<br>Lactosérum |
|-----------------------|--------------------------------------|---|--------------------------|
| Solides totaux (%)    | 6-7                                  | 6-7   | 6-7                      |
| Lactose (%)           | 4,8                                  | 4,6   | 4,8                      |
| Acides organiques (%) | 0,2                                  | 0,6   | 0,2                      |
| Protéines (%)         | 0,8                                  | 0,8   | 0,2                      |
| Gras (%)              | 0,02                                 | 0,1   | 0,1                      |
| Minéraux (%)          | 0,6                                  | 0,8   | 0,8                      |

Les principaux constituants du lactosérum et du perméat sont résumés dans le tableau 1.4. La composition du lactosérum varie surtout selon la technique de fabrication et le type de fromage. Les lactosérums doux (pH 6-7) et acide (pH<5) sont les deux principales variétés de lactosérum. Le lactosérum acide a plus de cendres et une plus faible teneur en protéines et en lactose que le lactosérum doux (Gonzalez Siso, 1996). Au moins la moitié des solides du lait se retrouvent dans le lactosérum (Horton, 1995). Ce dernier et son perméat contiennent des minéraux et la plupart des vitamines nécessaires à la croissance de jeunes mammifères.

### 3 Le lactosérum, un polluant

Les effluents produits par l'industrie fromagère sont caractérisés par leur volume et leur charge polluante élevés (Roig *et al.*, 1993). La production de fromage au Canada et au Québec en particulier est en constante croissance. Cette activité génère des milliers de tonnes de lactosérum. Il est important de noter que la production d'un kilogramme de fromage (cheddar par exemple) génère 9 litres de lactosérum (Kosikowski, 1979) et que la production annuelle (mondiale) dépasse  $145 \times 10^6$  t de lactosérum par année et environ  $6 \times 10^6$  t de lactose (Castillo, 1990). Au Québec, les volumes de perméat sont de l'ordre de 400 millions de litres par année (Jacques, 1993).

Bien qu'il existe des possibilités pour la valorisation du lactosérum depuis une cinquantaine d'années (alimentation animale), approximativement la moitié de la production mondiale n'est pas exploitée mais rejetée comme un effluent (Gonzalez Siso, 1996). Dans ces conditions, le lactosérum représente un problème environnemental très important à cause des volumes considérables générés et de sa teneur élevée en matière organique.

Sa DBO<sub>5</sub> est de 30 000 à 50 000 ppm et sa DCO de 60 000 à 80 000 ppm (Mawson, 1994). Le lait entier aurait une DBO de l'ordre de 110000 mg/L (Roig et al., 1993). Cette valeur élevée de la DBO provient principalement du lactose que l'on retrouve à des concentrations entre 4,5 et 5%, représentant approximativement 70% des solides du lactosérum et 80% de ceux de son perméat. Le principal problème lié à la valorisation du lactosérum entier ou du perméat est que les quantités produites dans les petites fromageries sont généralement insuffisantes pour garantir les coûts d'une valorisation par fractionnement et/ou par séchage (Roig et al., 1993). Par ailleurs, les nouveaux règlements sur la pollution de l'environnement ont amené les industries fromagères à se pencher sur de nouvelles façons de disposer des sous produits qu'elles génèrent.

#### 4 Utilisation du lactosérum et de son perméat

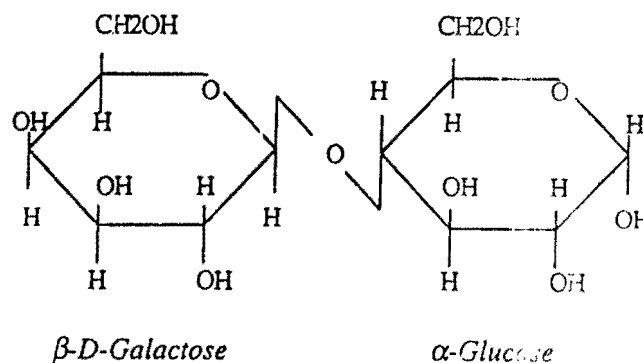
Le lactosérum était considéré au départ comme un sous-produit gênant dont il fallait se débarrasser. Il était utilisé par certains producteurs de lait ou de porcs pour l'alimentation animale. L'augmentation de la taille des industries fromagères et la nécessité de réduire la charge polluante de ce sous-produit ont encouragé les producteurs à chercher de nouveaux moyens d'utilisation du lactosérum (Moulin et Galzy, 1984).

Comme nous l'avons souligné précédemment, environ 50% de la production mondiale de lactosérum est transformée et utilisée sous diverses formes de produits alimentaires destinés aux humains et aux animaux (Gonzalez Siso, 1996). Une bonne partie par ailleurs est utilisée telle quelle sous forme liquide dans l'alimentation animale. Cependant les frais de transport sont très élevés et constituent un facteur limitant pour cette pratique (Kosikowski, 1979).

Sur le plan nutritionnel, le perméat est considéré comme un produit déséquilibré de par sa teneur élevée en minéraux et en lactose et sa pauvreté en azote. Toutefois, la haute qualité nutritionnelle des protéines sériques du lactosérum a suscité le développement et l'adaptation de technologies permettant de les concentrer et de les isoler. C'est en fait à partir des années 1970 que ces nouvelles technologies ont été mises en œuvre à l'échelle industrielle. L'ultrafiltration en particulier a connu une percée fulgurante et continue aujourd'hui de dominer les technologies de valorisation du lactosérum. Cette technique a eu pour conséquence la production de volumes importants de perméat, qui à son tour a nécessité la mise au point de nouvelles technologies de valorisation.

### 5 Le lactose du perméat

Le lactose (4-O- $\beta$ -D galactopyranosyl-D-glucose) est un disaccharide composé d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose liées en position  $\beta$ 1-4, et constitue le seul sucre du lait (Ryder, 1988 ; Visser *et al.*, 1988).



### *Lactose*

Le problème du traitement du lactosérum et de son perméat nécessite des solutions simples et économiques, étant donné les contraintes environnementales et

concurrentielles auxquelles doivent faire face les industries fromagères. Une des alternatives les plus intéressantes pour la valorisation du perméat semble donc être la fermentation du lactose (Champagne et Goulet, 1988; Mawson, 1994). Le lactosérum et son perméat peuvent être utilisés directement comme substrat de croissance pour les levures (Boze et al., 1992) dans le but d'obtenir des biomasses riches en protéines, de l'éthanol, des enzymes, des huiles, etc. (Castillo, 1990; Moulin et Galzy, 1984). La production de levures par la fermentation du lactose du lactosérum a été le sujet de plusieurs travaux de recherches. C'est ainsi que Mahmoud et Kosikowski (1978) ont utilisé du perméat de lactosérum concentré pour produire des protéines d'organismes unicellulaires et de l'alcool à partir de cinq souches de *Kluyveromyces*.

Les micro-organismes capables d'utiliser directement le lactose sont en nombre relativement limité. On a en effet souvent recours à l'hydrolyse par voie chimique (acide) ou enzymatique (Gonsalez Siso, 1996; Shukla, 1975) pour en faciliter la fermentation. Cette dernière se réalise par la lactase ou  $\beta$ -galactosidase que l'on retrouve aussi bien chez les animaux, les plantes, les bactéries, les levures que les moisissures (Gonsalez Siso, 1996 ; Ryder, 1988).

Toutefois, certains genres de levures comme les *Kluyveromyces* sont capables d'utiliser très efficacement le lactose pour leur croissance (Solomons, 1983; Boze et al., 1992 ; Sturley et Young, 1988; Bui et Galzy., 1990; Perera et al., 1993) et l'espèce la plus fréquemment citée pour son aptitude à croître sur le lactosérum est *K. marxianus* (Boze et al., 1992; Perera et al., 1993; Bui et Galzy, 1990 ). Elle est donc celle qui a retenu notre attention.

Ainsi, nous comptons associer deux polluants difficiles à éliminer dans le but de résoudre deux problèmes majeurs autant pour le Québec et le Canada que pour la plupart des pays qui font face à ces difficultés. Cependant, nous ne pourrions atteindre notre objectif qu'en sélectionnant les micro-organismes les plus aptes à accomplir ce travail en utilisant aussi bien l'azote du lisier que le lactose du perméat de lactosérum. Le choix de ces micro-organismes est une étape critique qui dépend d'une kyrielle de critères. Non seulement ces micro-organismes doivent-ils être capables d'utiliser rapidement la source de carbone disponible, ils doivent également répondre à des critères d'ordre nutritionnel (teneur en protéines par exemple), technologique (facilité de culture par rapport aux besoins nutritionnels) et toxicologique (Vasey et Powell., 1984).

### *III : Les levures*

Les levures sont des micro-organismes capables de croître ou de survivre aussi bien sous des conditions aérobies qu'anaérobies dans des milieux comportant des sources métabolisables de glucide, d'azote, de minéraux, et de vitamines. D'une manière générale, elles se développent en milieu acide. Il existe plus de 500 espèces regroupées en 60 genres (Kreger-van Rij, 1984).

Leur optimum de pH se situe entre 4,5 et 6,5, mais elles sont capables de tolérer des valeurs entre 2,5 et 8,0 (Krisop, 1988; Boze et al., 1992 ; Barnett et al., 1990). Bien qu'elles soient des mésophiles, les levures tolèrent une large gamme de températures: elles ne croissent généralement pas à des températures supérieures à 40°C (Boze et al., 1992; Rose et Harrison, 1987) et leur optimum de température se situe généralement entre 25 et 30° C. En présence d'oxygène, la plupart peuvent oxyder les sucres simples en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O en libérant de l'énergie.

Cette énergie permet à la cellule de croître et de se multiplier très rapidement et de pouvoir aussi convertir des glucides simples en matériel de réserve (glycogène et tréhalose) (Simard, 1992).

Rappelons que les levures, organismes unicellulaires, se reproduisent surtout par bourgeonnement, et ont des exigences nutritionnelles très réduites. Rappelons aussi que ce sont des "usines à protéines" en ce sens qu'à partir d'une solution d'azote ammoniacal, de phosphates et de sucres fermentescibles, elles élaborent une masse importante de protéines. Il ne faut cependant pas perdre de vue que la levure n'est pas seule à avoir ces capacités. Au demeurant, elle les partage avec plusieurs bactéries et moisissures qui présentent toutes des avantages et des inconvénients lorsqu'il s'agit de les utiliser en alimentation (Senez, 1983; Boze et al., 1992 ; Carantino, 1983).

Dans l'industrie alimentaire, la levure trouve de multiples usages (Barnett et al., 1990 ; Bui et Galzy, 1990; Rose et Harrison, 1987). Elles sont appréciées pour leur absence de toxicité (Barnett et al., 1990), la possibilité de les cultiver à pH acide (ce qui réduit les risques de contamination par les bactéries) (Barnett et al., 1990, Rose et Harrison, 1987), et la possibilité de les utiliser sans traitement particulier. Leur principal inconvénient du point de vue nutritif est leur pauvreté en acides aminés soufrés (Bui et Galzy, 1990). Cela ne constitue cependant pas un impact négatif pour cette étude puisque le produit final que nous envisageons ne remplacera pas une source de protéine dans la moulée mais servira plutôt de supplément protéique. En effet, les céréales contiennent des acides aminés soufrés mais sont pauvres en lysine et en thréonine, acides aminés non limitants chez les levures.

Tableau 1.5. Caractéristiques naturelles des levures, des bactéries et des moisissures en regard de leur utilisation industrielle et commerciale (Carantino, 1983)

|                    | Éléments favorables  | Éléments défavorables  |
|--------------------|--|--|
| <b>Levures</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• plus anciennement connues</li> <li>• les mieux étudiées</li> <li>• rarement toxiques ou pathogènes</li> <li>• développent à pH acide sélectif</li> <li>• teneur élevée en lysine (6-9%) et thréonine et faciles à récupérer</li> <li>• riches en vitamines</li> <li>• faible teneur en acides nucléiques (4-10%)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• croissance relativement lente par rapport aux bactéries</li> <li>• pauvres en acides aminés soufrés</li> <li>• choix limité d'espèces</li> </ul>  |
| <b>Bactéries</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• croissance rapide</li> <li>• spectre d'acides aminés souvent favorables</li> <li>• choix d'espèces presque illimité</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• difficilement acceptées (risques non négligeables sur le plan innocuité)</li> <li>• pH de culture rarement sélectif</li> <li>• problèmes de récupération (taille réduite)</li> <li>• teneurs en acides nucléiques assez élevées (10-16%)</li> </ul> |
| <b>Moisissures</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• connues depuis très longtemps</li> <li>• croissance sur une grande variété de substrat</li> <li>• récupération facile</li> <li>• bon équilibre en acides aminés</li> <li>• bonne teneur en acides nucléiques (3-5%)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• temps de génération très long (5-12 heures)</li> </ul>  |

Ce tableau ne présente naturellement pas une vue exhaustive mais il donne une bonne idée des caractéristiques des différents groupes de micro-organismes. Il ressort clairement que les bactéries contiennent beaucoup trop d'acides nucléiques par rapport à leur masse cellulaire.



Bien que leur croissance soit plus rapide, elles sont difficilement utilisables en nutrition car elles présentent des risques non négligeables sur le plan de l'innocuité (substances membranaires). Les moisissures par ailleurs se multiplient beaucoup trop lentement (Carantino, 1983). Elles sont néanmoins utilisées en Angleterre pour produire des simili viandes.

Notre choix s'est donc porté sur les levures. C'est un truisme de dire que l'une des raisons qui motivent l'utilisation des levures est la production d'une biomasse déjà bien acceptée comme protéine alimentaire (Vriens et al., 1989 ; Barnett et al., 1990). C'est pour des raisons de fiabilité (tests), de notoriété (connue), et de simplicité de culture entre autres que nous avons opté pour les levures. Mais parmi ces dernières, lesquelles offrent le meilleur potentiel de croissance dans le lisier et le lactosérum?

### 1 Sélection des souches de levures

Le développement d'une procédure de production de levures est basée avant tout sur la relation entre la souche de levure et le substrat carboné (Boze et al., 1992). L'idée est de retenir des souches de levures aptes à utiliser de façon efficiente et rapide le substrat carboné contenu dans le milieu. En effet, la vitesse d'entrée du substrat dans la cellule ne doit pas être un facteur limitant (Boze et al., 1992). Les espèces de levures sont donc choisies en fonction du substrat carboné. L'objectif ultime ici est la sélection des levures capables d'utiliser le lactose, principal source de carbone du lactosérum. Il existe au moins 98 espèces de levures appartenant à 19 genres capables d'utiliser le lactose. Parmi ces espèces, les plus utilisées en alimentation appartiennent aux genres *Kluyveromyces* et *Trichosporon* (Castillo, 1990; Boze et al., 1992).

Il convient de signaler qu'outre l'azote ammoniacal, ces levures utilisent uniquement les acides aminés libres et certains peptides courts; elles sont incapables d'utiliser les protéines puisqu'elles n'ont pas de protéases (Castillo, 1990).

La majorité des études relatives à la production de levures ont été réalisées à l'aide de levures capables d'utiliser le lactose et principalement le genre *Kluyveromyces* qui offre l'avantage d'une bonne croissance en plus d'être accepté comme micro-organisme sans risque pour la santé humaine et animale.

La levure *K. marxianus* qui a retenu notre intérêt est de forme ovoïde plus ou moins allongée, et appartient à la classe des ascomycètes. Cette espèce possède un bourgeonnement de type multilatéral et est capable de former du pseudomycélium. Elle est omniprésente dans la nature, mais on la retrouve surtout concentrée en surface des fruits et des céréales, et dans les environnements plutôt acides. Elle est responsable de la fermentation spontanée de produits comme les jus de fruits, le miel, de même que certains produits laitiers comme le kéfir et quelques variétés de fromages (Kurtzman, 1988).

Il convient de souligner ici que de par leur appartenance aux eucaryotes, les levures sont insensibles aux antibiotiques usuels et ne sont donc pas affectées par des produits antibactériens qui pourraient se retrouver dans le lisier.

## 2 Les levures-aliments

### 2.1 Généralités

L'idée d'utiliser des levures comme source de protéines alimentaires remonte au début de ce siècle (1910) en Allemagne : des milliers de tonnes d'une espèce nommée *Candida utilis* ont ainsi été consommées comme substituts de protéines, en remplacement de la viande, au cours des deux dernières grandes guerres mondiales (Carantino, 1983; Solomons, 1983). Une entreprise fromagère française, Bel Industrie, mettait en marché une levure dite "lactique", produite à partir de lactosérum de fromagerie; ce produit était essentiellement destiné à l'alimentation animale. Le groupe pétrolier BP (British Petroleum) a introduit la production de levure à partir de la fraction n-paraffine du pétrole brut mais le projet fut plus tard abandonné (Carantino, 1983; Solomons, 1983) pour des raisons non documentées.

La croissance de la population mondiale est l'un des problèmes les plus graves auquel est confronté l'humanité, en particulier dans les nations les moins développées industriellement. L'agriculture conventionnelle ne peut pas satisfaire complètement la demande en aliments de la population et en particulier la demande en protéines (Kosaric et Velayudhan, 1991; Tomoo, 1989). Au delà des protéines végétales bien connues, l'utilisation de biomasses protéiques a connu beaucoup d'intérêt (Roig et al., 1993; Tomoo, 1989).

Le terme "SCP" indique une substance constituée de cellules généralement mortes et sèches utilisées pour l'alimentation animale et humaine. La Commission internationale de l'union de la chimie pure et appliquée (I.U.P.A.C., 1974) recommande l'utilisation du terme "Single Cell Biomass" (SCB) pour désigner la biomasse. Le mot protéine devrait être réservé pour la protéine en tant que telle et les concentrés protéiques (Boze et al., 1992).

Les concentrés protéiques issus d'organismes unicellulaires (principalement des levures) sont employés aujourd'hui pour l'alimentation animale surtout et pour l'alimentation humaine en particulier (sauces, potages, charcuterie, arômes, aliments pour nourrissons). Les tests d'alimentation et de digestibilité effectués sur des animaux avec un aliment commercial à base d'organismes unicellulaires ont mis en évidence la haute qualité des protéines issues des levures, de valeur nutritionnelle similaire ou même supérieure à celle de sources protéiques conventionnelles (Hitzman, 1986).

En somme, l'objectif de notre démarche est de produire une biomasse de levures (SCB) vivantes possédant des propriétés probiotiques, qui serait recyclée en suspension comme liquide d'abreuvement pour les porcs. Toutefois, il est important de mentionner que la valeur nutritive de levures cultivées sur du lisier seul (Shay et Weggner, 1986; Kilara et Patel, 1992; Oleszkiewicz et al., 1979; Miskiewicz et al., 1982) ou sur du perméat seul (Bui et Galzy, 1990) est connue.

Toutefois, à notre connaissance, il n'y a pas d'informations relatives à la composition (qualité nutritive) de levures cultivées sur du lisier enrichi de perméat de lactosérum. Cette thèse va tenter d'apporter quelques éléments de réponse de nature à combler cette lacune.

Maintenant que tous les éléments de base ont été abordés, il est important de dire un mot sur le ratio carbone/azote. Ce ratio étant un des paramètres clés pour la croissance des levures dans un milieu où la source de carbone et la source d'azote sont d'origines différentes.

### 3. Proportions de lisier et de perméat à associer pour maximiser la croissance des levures.

L'atteinte de nos objectifs ne nécessite pas seulement la sélection d'une souche de levures hautement performante. Il est également nécessaire de définir ses conditions optimales de culture afin de maximiser la croissance cellulaire. Le milieu de propagation devant contenir tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance, il est indispensable que ces derniers soient apportés à des concentrations optimales.

En somme, il s'agit de préciser ici les proportions de lisier et de perméat qu'il faut combiner pour obtenir un mélange permettant de supporter une croissance abondante, en se basant sur le fait que les micro-organismes sont constitués d'environ 50% de carbone et 5% d'azote. Ce qui signifie que le carbone fermentescible (métabolisable) devrait être le premier élément en importance dans ce milieu de culture suivi de l'azote.

Les sources carbonées sont en effet d'une grande importance dans un milieu de culture puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques etc., et leur oxydation fournit l'énergie nécessaire au métabolisme et à l'anabolisme cellulaire (Botton, 1991; Rivière, 1975).

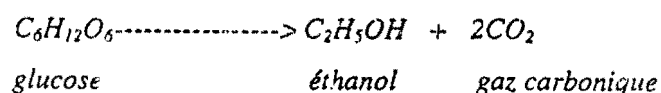
Quant à l'azote, il joue un rôle capital dans le métabolisme cellulaire. Il entre dans la constitution de molécules simples (les acides aminés, les sucres aminés, les nucléotides, les coenzymes, les vitamines) et des macromolécules (telles que les protéines, les acides nucléiques) essentielles au fonctionnement cellulaire. C'est dire que le ratio carbone/azote (C/N) d'un milieu de culture est un paramètre important pour la croissance des levures.

En outre, la littérature rapporte que lorsqu'on cultive des micro-organismes, les proportions relatives en protéines, lipides ou polysaccharides dépendent principalement du ratio C/N du milieu (Vriens *et al.*, 1989). Un ratio élevé en C/N est favorable à une synthèse lipidique mais défavorable à la synthèse protéique. Cependant, lorsque l'apport en carbone est moins élevé mais suffisant, pratiquement tout l'azote du milieu peut être incorporé dans la biomasse (Vriens *et al.*, 1989).

Rappelons que selon la logique de notre étude, les éléments de base (lisier, perméat, etc.) dont nous venons de faire état doivent être soumis à un processus de fermentation. De tous les moyens utilisés pour traiter le lisier de porc et minimiser ou enrayer les risques liés à la présence de pathogènes, c'est en effet la fermentation qui a retenu notre attention parce que c'est un procédé relativement peu coûteux et bien éprouvé pour la valorisation de produits ou sous-produits de l'industrie (yogourt, fromage, "SCP", "SCB", etc.).

#### *IV: La fermentation et la production de biomasse protéique*

La fermentation alcoolique est la plus ancienne et de loin la plus étudiée des fermentations industrielles alimentaires. Par ce procédé, les levures convertissent les sucres fermentescibles en alcool et en gaz carbonique. Cette réaction peut être décrite stoechiométriquement comme suit :



## 1 Le fermenteur ou bioréacteur

Au cours de leur croissance, les micro-organismes altèrent les propriétés du milieu dans lequel ils se développent. En particulier, le pH et la concentration en oxygène dissout varient lorsqu'un micro-organisme se développe en culture submergée. Certains équipements périphériques sont utilisés pour contrôler ces variations, et prolonger ainsi la croissance du micro-organisme.

Le fermenteur et ses périphériques permettent le maintien du pH ou de certains autres paramètres (oxygène dissout, potentiel redox,...) aux valeurs désirées pour une performance optimale de croissance ou de production de métabolites. Pour obtenir ces conditions, il faut que le milieu contienne au départ une source d'énergie et divers autres nutriments capables de satisfaire les besoins des cellules. Il faut également un bon inoculum et l'absence d'inhibiteurs dans le milieu. Il existe deux grandes catégories de systèmes de fermentation: les systèmes fermés et les systèmes ouverts.

### 1.1 Les systèmes fermés

Les systèmes fermés impliquent que les nutriments et les cellules sont ajoutés au début du processus de fermentation. On y distingue les fermentations semi-continues et en discontinu.

#### 1.1.1 Les fermentations semi-continues (*fed-batch*)

Les fermentations semi-continues sont aussi désignées par le terme *fed-batch*. Dans ces systèmes, le substrat est introduit de façon continue (ou non) dans le bioréacteur sans soutirage simultané du milieu.

La fermentation de type *fed-batch* est décrite (Owen, 1989) comme le type de système où le substrat (nutriment) est ajouté quand sa concentration descend en dessous d'un certain point. L'ajout du substrat de façon séquentielle permet d'éviter l'inhibition de la croissance cellulaire par répression des enzymes de la chaîne respiratoire. Fort heureusement, la levure *K. marxianus* est *Crabtree* négative (Hendrik et al., 1989). Ce qui signifie que même en présence d'un excès de sucre, elle ne produit pas d'alcool. Le système reste après tout fermé puisqu'il n'y a pas un flux de sortie continu.

### 1.1.2 Les fermentations en discontinu (*batch*)

Les fermentations en discontinu, dites en *batch*, sont les plus répandues pour la production de biomasses sous conditions aseptiques. Le substrat et les micro-organismes sont introduits initialement ; à la fin de la transformation, l'ensemble est soutiré. Le processus de fermentation s'effectue jusqu'à l'épuisement du ou des substrats ou jusqu'à l'accumulation de substances inhibitrices dans le milieu. Dans ces milieux non renouvelés, la phase exponentielle ne dure que quelques heures.

## 1.2 Les systèmes ouverts

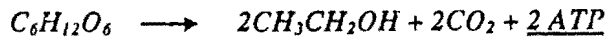
Dans un système ouvert contrairement aux systèmes fermés ci-dessus décrits, les micro-organismes et les nutriments entrent et quittent le fermenteur continuellement.



### 1.2.1 Les fermentations continues

On désigne par "fermentation continue", les procédés dans lesquels un milieu est pompé dans un réacteur où il est soumis à une action microbienne, et où le substrat est continuellement renouvelé par un retrait du milieu fermenté au même rythme que l'introduction de milieu neuf. Les méthodes de culture en continu permettent notamment de s'affranchir des problèmes liés aux substrats limitant la croissance en culture non renouvelée (Bailey et Ollis, 1986, Rose and Harrison, 1987). Par rapport aux cultures discontinues, les fermentations continues permettent une meilleure uniformité de la production, des économies de fonctionnement et une adaptation plus aisée à l'automatisation. En contrepartie, elles nécessitent un personnel spécialisé, soumis aux contraintes du travail en continu.

De façon générale, la fermentation est utilisée pour produire des métabolites ou une biomasse de micro-organismes. C'est justement, cette deuxième option qui a retenu notre attention dans ce travail en tenant compte du but que nous poursuivons qui est de produire une biomasse de levures à partir d'un mélange de lisier et de perméat. Il est à noter que seule la fermentation aérobie est susceptible de produire une importante biomasse de micro-organismes. En effet, en présence d'oxygène et d'une source d'azote, la levure peut oxyder le sucre en produisant de la biomasse, du  $\text{CO}_2$  et de l' $\text{H}_2\text{O}$  en utilisant au maximum, grâce au cycle de Krebs, l'énergie qu'il contient. Cette énergie permet à la levure de croître et de se multiplier rapidement. En condition anaérobie par contre, les levures peuvent se multiplier tout aussi rapidement, mais elles sont beaucoup moins efficaces à convertir l'énergie des substrats fermentescibles.

*Fermentation aérobie**Fermentation anaérobie*

## 2 Importance de l'aération dans la fermentation

Dans le métabolisme aérobie, l'oxygène agit comme accepteur final des électrons produits par les réactions d'oxydation. Les procédés aérobie sont reconnus pour leur efficacité dans la lutte contre la pollution liée au lisier de porc (Burton et Farrent, 1998; Cumby 1987). Ces procédés sont généralement utilisés pour oxyder les composés organiques de haute énergie en des produits d'énergie moindre (Burton et Farrent, 1998 ).

L'air fournit l'oxygène nécessaire à une combustion (production de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O) et une transformation efficace de tous les éléments volatils et malodorants du lisier (acides organiques, NH<sub>3</sub>) en biomasse microbienne. Cette technique a en plus l'avantage de réduire les odeurs nauséabondes du lisier de porc.

Les procédés de fermentation sont donc des réactions d'oxydoréduction avec addition d'oxygène (fermentation aérobie) ou perte d'hydrogène ou d'électrons (respiration anaérobie). En général, les électrons provenant du donneur sont transférés par une série d'enzymes respiratoires à une substance réductible telle l'oxygène, l'accepteur final d'électrons.

L'aération sert à combler non seulement les besoins en oxygène de la levure mais aussi à agiter le milieu, à éloigner les produits de la fermentation du voisinage immédiat des cellules, et à apporter de nouvelles substances nutritives. L'agitation et l'aération influencent ainsi la croissance des levures.

Or, seul l'oxygène dissout est utilisable par les cellules, ce gaz étant très peu soluble dans l'eau (figure 1.2). La faible dissolution de l'oxygène dans l'eau (maximum = 10 mg/L) exige donc que ce dernier soit fourni constamment au milieu de culture.

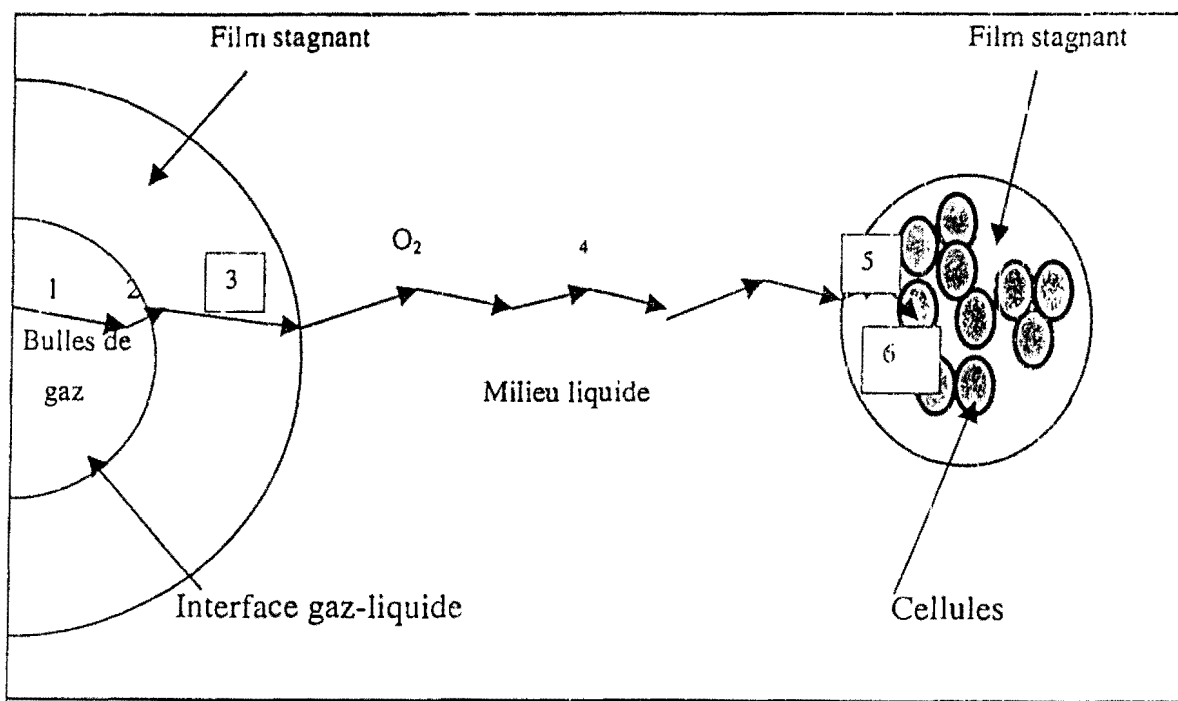


Figure 1.2: Schéma des différentes étapes impliquées dans le transport de l'oxygène de la bulle de gaz au site de réaction dans les cellules (schéma emprunté de Bailey et Ollis, 1986).

L'oxygène doit franchir plusieurs étapes avant d'arriver aux sites de réaction. L'oxygène doit d'abord diffuser de la bulle de gaz vers l'interface gaz-liquide (1) puis être transporté au travers de l'interface (2) avant de diffuser dans le film stagnant entourant la bulle (3). Par la suite, l'oxygène est transporté au sein du milieu liquide (4), et diffuse dans le film entourant les cellules (5).

Ce n'est qu'après avoir franchi toutes ces étapes que l'oxygène peut enfin être transporté à travers l'enveloppe cellulaire pour se rendre à l'intérieur de la cellule vers les sites réactionnels qui, dans le cas des levures, se trouvent être les mitochondries.

## 2.1 Coûts afférents à la fermentation aérobie

L'aération étant un processus hautement énergivore, elle représente une fraction importante du coût total des procédés aérobies. La compression et l'insufflation de l'air nécessite des équipements très coûteux et une consommation importante d'énergie. (Burton et Farrent, 1998, Royce, 1993; Cumby, 1987). Aussi, pour rendre la fermentation aérobie du lisier de porc plus attrayante pour les producteurs de porc, il est souhaitable de réduire de façon considérable les coûts liés à l'aération du système. Récemment, Burton et Farrent (1998) ont suggéré l'utilisation d'un long traitement (*long-treatment time*) ou de deux fermentations successives (*two-stage processing*) pour réduire les coûts de l'aération.

## BUT ET OBJECTIFS

Le lisier de porc, grâce à une supplémentation au moyen de perméat de lactosérum de fromagerie, peut supporter la croissance de levures utilisables comme source de protéines alimentaires. Cette étude vise donc à démontrer la faisabilité technique d'une nouvelle approche de valorisation combinée de deux effluents polluants aux caractéristiques complémentaires, notamment le lisier de porc et le perméat de lactosérum de fromagerie, par une culture de levures, en une biomasse enrichie en protéines. Cette biomasse pourrait être destinée à l'alimentation des porcs comme supplément protéique en remplacement partiel des céréales et comme probiotique. Ce travail s'articule en trois chapitres dont les objectifs primaires et secondaires se définissent ainsi :

- 1) Sélectionner la souche de levure qui se développe le mieux dans le milieu lisier/perméat de lactosérum
  - enrichir le lisier de porc au moyen d'un substrat carboné peu coûteux
  - sélectionner une culture adaptée à croître dans un tel milieu en utilisant le lactose comme principale source de carbone
  - créer un environnement propice à la production d'une biomasse abondante de levures
  - étudier l'influence de plusieurs niveaux de supplémentation sur la croissance des levures
  - déterminer dans quelles proportions le lisier de porc et le perméat de lactosérum doivent être associés pour maximiser la production de biomasse en établissant un ratio C/N optimal pour la conduite de la fermentation

- 2) Réduire significativement les coûts de fermentation en éliminant l'utilisation de soufflantes ou de compresseurs et en utilisant des levures immobilisées
  - fermenter de grands volumes de lisier/perméat (échelle pilote) en minimisant les coûts d'opération
  - immobiliser une culture de levures sur des supports solides
  - réduire les contrôles à exercer sur la fermentation
  - réduire au minimum la formation de mousse
  
- 3) Démontrer la possibilité d'opérer la fermentation du lisier en continu
  - conduire des fermentations performantes en continu
  - évaluer la productivité du système
  - optimiser les conditions d'opération en continu
  
- 4) Démontrer que le produit issu de la fermentation du mélange lisier/perméat contient des protéines qui présentent un intérêt pour l'alimentation animale et qui peuvent se comparer à d'autres protéines végétales utilisées dans l'alimentation des porcs
  - déterminer les teneurs en protéine et en acides aminés
  - déterminer les minéraux
  - montrer que le produit issu de la fermentation ne devrait présenter aucun danger en regard des pathogènes

## **CHAPITRE II**

**Essais en laboratoire préalables aux essais pilotes**

## *1 Introduction*

L'objectif que nous poursuivons ici est de mettre au point un milieu de culture à moindre coût, pouvant servir à la production de protéines microbiennes utilisables à grande échelle par les producteurs de porcs. Il s'agit donc d'essais à l'échelle du laboratoire afin de nous assurer de la praticabilité de notre démarche, avant d'envisager l'échelle pilote à laquelle sera réservée le chapitre suivant. C'est dire, qu'à l'issue de ce chapitre, nous aurons cerné les paramètres qui retiendront notre attention au cours des essais pilotes.

Il sera plus précisément question de déterminer dans un premier temps les proportions dans lesquelles il faut combiner les deux substrats (lisier/perméat) pour obtenir un développement abondant de diverses souches de levures. Dans l'affirmative, il conviendra d'opérer une évaluation comparative de ces levures pour déterminer laquelle est la plus performante, puis de déterminer les proportions des deux ingrédients du mélange permettant d'obtenir un milieu capable de maximiser la croissance. Enfin, même si nous fixons les proportions optimales de lisier et de perméat assurant la croissance des levures, il ne faut pas perdre de vue que le lisier est un milieu chargé en micro-organismes et susceptible de renfermer des pathogènes.

C'est dire qu'il ne s'agit pas seulement de faire croître les levures, mais il faudra également qu'elles puissent se développer dans un milieu où la compétition avec la flore du lisier pour le substrat est moins rude et dans la mesure du possible, limiter ou débarrasser le lisier des pathogènes qui peuvent s'y trouver. C'est pour répondre à cette préoccupation que la recherche d'un pH optimal de fermentation aura son importance.



## *II Matériel et méthodes expérimentales*

### I Matériel

#### 1.1 Le lisier de porc

Le lisier a été prélevé dans une porcherie de 1200 porcs, de type naisseur-finiisseur, de l'île d'Orléans (Porcherie Orléans). Les échantillons ont été prélevés dans une pré-fosse qui sert d'unité d'emmagasinement du lisier qui est située sous le plancher latté de la porcherie. La pré-fosse est le siège d'une décantation et d'une sédimentation partielles de certaines particules solides. Cette pré-fosse est vidangée chaque semaine dans la fosse principale. Le lisier utilisé lors de nos essais est prélevé à l'aide d'une petite pompe submersible et emmagasiné dans des contenants de 1 litre conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Au moment du prélèvement, le lisier avait connu une décantation naturelle d'au moins 24 h (absence d'agitation).

#### 1.2 Le perméat de lactosérum

Les essais d'enrichissement du lisier ont été effectués avec du perméat de lactosérum frais obtenu de l'ultrafiltration du lactosérum de fromage cheddar, provenant du centre de recherche et de développement sur les aliments (CRDA), (Agriculture Canada), de Saint-Hyacinthe. Le perméat a été lui aussi congelé à -20°C afin d'en faciliter la conservation pour une période prolongée.

### 1.3 Les souches de levures

Les souches de *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces S.P. golden cheese*, et *Saccharomyces boulardii*, ont été obtenues de "Lallemand Inc.", (Montréal, Québec), alors que la souche *Trichosporon cutaneum* a été obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC # 28330) au Maryland. Ces souches ont été choisies pour leur valeur nutritive potentielle (protéines d'organismes unicellulaires) et pour leur capacité à croître dans le lactosérum; il restait donc à vérifier leur capacité de croître dans le lisier de porc. Mentionnons ici que *Saccharomyces boulardii* (n° 871226), (de la banque de souche de la compagnie Lallemand) bien que très intéressante pour la supplémentation alimentaire, n'est pas reconnue comme capable d'hydrolyser le lactose. Elle est capable néanmoins d'utiliser l'acide lactique comme substrat carboné.

## 2 Méthodes expérimentales

### 2.1 Caractérisation de la flore indigène du lisier de porc

Mentionnons que le dénombrement de la flore bactérienne totale aérobie a été réalisé sur milieu "Plate Count Agar" de Difco, incubé à 30°C pendant 48 heures. Les coliformes ont été dénombrés sur milieu "Violet Red Bile Agar" de Difco après 24 heures d'incubation à 37°C.

Pour le dénombrement des levures, deux méthodes ont été utilisées. La méthode de l'hématimètre (Kova slide-10, ICL Scientific) au moyen d'un microscope Leitz Laberlux S (Leica, Allemagne); une goutte de la suspension obtenue au moyen d'une pipette est déposée sur une lame et observée sous un grossissement de 400X.

Le nombre de cellules à l'intérieur d'un petit carré est dénombré. La procédure est répétée pour dix petits carrés. La concentration cellulaire est calculée à partir de la moyenne de ces dix carrés selon la formule suivante:  $N = M \times 90000 \times D$  où N représente le nombre de cellules par ml, M le nombre moyen de cellules par petits carrés, D, la dilution et 90000 le facteur de multiplication.

La viabilité des levures est mesurée par la réduction du bleu de méthylène (en un composé incolore) qui est un colorant simple et cationique qui se lie aux surfaces des cellules qui sont généralement chargées négativement. Les cellules viables contiennent des enzymes capables de réduire le bleu de méthylène à 1%. Lorsque les cellules sont immergées dans une solution aqueuse de bleu de méthylène (0,3%), le colorant pénètre dans la cellule et est décoloré par les enzymes intracellulaires. Les cellules mortes dans lesquelles ces enzymes sont inactives retiennent la coloration bleue. Le pourcentage de cellules incolores mesure donc la viabilité (Atkinson et Mavituna, 1991).

La méthode de dilution et d'ensemencement a aussi été utilisée sur le milieu de culture "Potato Dextrose Agar" (de Difco dont le pH a été ajusté à 3,5, puis incubé à la température de la pièce (20-23°C) pendant 4 à 5 jours. Cette dernière méthode a été utilisée pour le dénombrement des levures et moisissures.

## 2.2 Caractéristiques physico-chimiques du lisier de porc

Le pH du milieu de culture a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre Corning (modèle 140), muni d'une électrode de type "Accumet" ("Accumet combination pH electrodes with silver/silver chloride references : SN 7085168, Fisher Scientific"). L'azote ammoniacal a été déterminé par colorimétrie au moyen de la méthode de Nessler (APHA, 1989).

Les sucres et les acides ont été mesurés par HPLC (Waters, modèle 712 WISP; réfractomètre Waters 410, colonne Interaction-300, Mendel Sci, Rockwood USA; le débit de la phase mobile constituée d'une solution diluée de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour HPLC (0.0065N) étant de 0.4 ml/minute). Les solides totaux et les matières en suspension ont été déterminés sur le surnageant d'un lisier centrifugé à 13 000 g pendant 15 minutes, par différence de poids avant et après séchage d'un échantillon (10 ml) à 85°C pendant 24 heures,

### 2.3 Effet de la centrifugation et du chauffage sur la microflore du lisier de porc

Dans le but de réduire la compétition des levures avec la population indigène du lisier pour le substrat, un certain nombre de traitements ont été envisagés et appliqués au lisier avant la fermentation. Il s'agit notamment de la centrifugation et du chauffage. Dans un premier temps, des essais de centrifugation du lisier ont été menés à 8000 g pendant 20 minutes afin de débarrasser le lisier des matières colloïdales c'est à dire des particules sur lesquelles pourraient s'attacher les micro-organismes. Cette opération permet d'obtenir un lisier dit "clarifié".

Dans un deuxième temps, le lisier brut tout comme le lisier "clarifié" ont subi un traitement de chauffage équivalent à la pasteurisation d'une crème laitière (Boggh-Sorensen, 1992). En effet, nous sommes partis de l'hypothèse selon laquelle, en diminuant les matières en suspension, il est possible d'améliorer l'efficacité de la pasteurisation.

Le but de cette étude étant de produire un milieu fermenté destiné à l'alimentation animale, le traitement par chauffage pourrait jouer un double rôle: éliminer les pathogènes qui peuvent constituer une entrave à cette finalité, mais aussi, réduire la compétition de la population indigène pour le substrat.

A cet effet, des tubes à essais contenant 15 ml d'échantillon ont été chauffés pendant 5-10-30 minutes dans un bain marie à 85°C, puis refroidis aussitôt dans un bain de glace. La flore totale aérobie, les coliformes totaux, les levures et moisissures ont été dénombrés comme mentionné plus haut (2.1) après chaque intervalle de temps, aussi bien dans le lisier brut que dans le lisier "clarifié", chauffé et non chauffé. Une fois ces essais réalisés, nous nous sommes intéressés aux proportions lisier/perméat (LP) pouvant satisfaire les exigences nutritives des levures.

#### 2.4 Essais de croissance des levures dans le milieu LP pasteurisé et non pasteurisé

La capacité de croissance des souches a été mesurée dans divers mélanges de lisier et de perméat de lactosérum avec des rapports C/N de 30:1, 20:1, 10:1, 1:1 (tableau 2.5) en tenant compte des rapports généralement utilisés dans la littérature (Tahoun *et al.*, 1987). (Voir annexe B pour le calcul des rapports C/N). Les fermentations ont été effectuées en Erlenmeyers de 500 ml. Chaque Erlenmeyer contenait 120 ml de milieu LP pasteurisé (85°C, 30 min) ou non pasteurisé et testé selon l'un des quatre ratio C/N ci-dessus mentionnés.

Par la suite, chacun des différents milieux a étéensemencé par l'une des 4 souches de levures avec un inoculum de 1% contenant environ  $10^8$  levures/ml. Les cultures de référence étaient maintenues sur gélose "malt agar" et transférées tous les mois et demi à deux mois.

Un aliquot prélevé à partir de cette gélose inclinée était transféré dans du bouillon au malt pendant 48 h (dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de bouillon). Après 48 heures d'incubation, 1 ml de ce bouillon était transféré dans 100 ml de perméat de lactosérum pendant 24 heures. Les Erlenmeyers ont été placés sur une table agitatrice ("G10 Gyrotory shaker, New Brunswick Scientific, Springfield, New-Jersey, USA"). Les fermentations ont été menées en mode *batch*, à la température de la pièce (20-23°C), sous une agitation de 250 RPM pendant 6 à 7 jours et à des pH non contrôlés. Les essais ont été répétés au moins 3 fois.

## 2.5 Effet du pH du milieu de culture sur la croissance de *K. marxianus*

Afin de mieux cerner la cinétique de démarrage de la fermentation, une expérience a donc été réalisée dans le but d'étudier l'effet de 7 niveaux de pH (6,0- 5,7- 5,4- 5,1- 4,8- 4,5- 4,0) sur la croissance des levures et de suivre l'évolution des sucres et des acides organiques au cours de la fermentation.

Les expériences ont été menées telles que décrites au point 2.4, sauf qu'ici, chaque Erlenmeyer contenait 160 ml du milieu LP à un pH donné allant de 4,0 à 6,0. L'ajustement du pH de départ s'est fait avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Les différents niveaux de pH furent réajustés chaque 24 heures au moyen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N ou de NaOH 2N, et ceci pendant 6 jours.

Des analyses ont été effectuées pour suivre particulièrement les concentrations de lactose, d'azote ammoniacal et d'acide lactique (cf.2.2).

### *III Résultats et discussion*

#### I Caractéristiques du lisier de porc

Les résultats permettant de caractériser le lisier de porc que nous avons utilisé sont présentés au tableau 2. On note que la teneur en eau du produit prélevé directement de la pré-fosse de la porcherie est très élevée puisqu'on n'y retrouve que 1.55% de solides totaux en moyenne. La teneur moyenne en azote ammoniacal était de 2.7g/L.

Le pH varie peu, les valeurs sont toujours proches de la neutralité et ne dépassent jamais 7. Nous n'avons pas détecté de sucres fermentescibles tels que le lactose, le glucose ou le galactose. Cependant, nous avons pu détecter des acides tels l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique. Les résultats obtenus pour la teneur en eau confirment que le lisier de porc est un effluent très dilué. L'eau provient essentiellement de l'urine des animaux, de l'écoulement ou des fuites d'eau des systèmes d'abreuvement de même que des lavages (Lemelin *et al.*, 1992).

Selon Asselin (1992), la teneur moyenne en eau dans les fosses est généralement supérieure à 95%. Nos valeurs se situent dans cet ordre de grandeur. Puisqu'il s'effectue une sédimentation dans la pré-fosse et que les prélèvements sont effectués beaucoup plus dans la couche intermédiaire qu'en profondeur de la préfosse, il est normal que la teneur en solides de notre lisier soit basse. Ce lisier dilué et décanté a pu être utilisé tel quel (sans tamisage) dans nos essais ultérieurs de fermentation.

La teneur en azote total des lisiers diffère de façon importante selon les études rapportées dans la littérature.

Plusieurs facteurs concourent à faire varier la teneur en azote des échantillons notamment, l'âge du lisier, sa position dans la fosse (profondeur), l'alimentation des porcs (Maheux et al., 1996), le pH et la méthode de prélèvement. La teneur en azote ammoniacal du produit que nous avons analysé se situe dans la moyenne trouvée dans la littérature. L'absence de sucres facilement métabolisables par les micro-organismes confirme que le lisier est un milieu épuisé et mal adapté pour la culture de levures. En outre, ce tableau donne la moyenne du dénombrement microbien obtenu sur plusieurs prélèvements de lisier, à diverses périodes au cours des essais.

Ces résultats montrent que le lisier de porc constitue bel et bien un milieu propice à la croissance d'un grand nombre de micro-organismes, surtout de bactéries (même si la population de  $4 \times 10^7$  n'est pas très élevée parce que c'est la flore aérobie) et confirment ceux rapportés par Bisailon et al. (1984).

## 2 Effet de la centrifugation et du chauffage sur la microflore du lisier de porc

La centrifugation utilisée pour maximiser l'efficacité du chauffage du lisier à 85°C a permis de réduire la flore totale de 2 log (tableau 2.3) alors que les coliformes totaux et les levures/moisissures n'étaient déjà plus détectables dans le milieu après 5 minutes de chauffage.

Le traitement thermique permet de réduire la flore totale du lisier centrifugé ou non centrifugé de 3 log après 5 minutes tout comme après 30 minutes de chauffage. Ce traitement détruit beaucoup plus rapidement les coliformes et les champignons que la flore totale. En effet, après 5 minutes de traitement thermique, on ne détecte plus que 700 micro-organismes par ml dans le lisier centrifugé.



Toutefois, en regard de la flore totale, surtout composée de bactéries aérobies comme *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* et anaérobies comme *Bacteroides sp.*, on note que malgré une réduction de 3 log, il reste encore quelque 20 000 micro-organismes par ml de lisier après 30 minutes de chauffage. Les dénombrements de flore totale sont aussi bas après 5 minutes qu'après 30 minutes de chauffage. Ce qui laisse supposer que la flore résiduelle est vraisemblablement composée surtout de spores résistantes à la chaleur.

Toutefois, dans le but de maximiser les coûts liés au chauffage et à la centrifugation, il a été décidé de poursuivre les expériences avec du lisier non chauffé et non centrifugé et d'envisager d'autres possibilités beaucoup plus économiques, pouvant mener aux mêmes résultats.

3 Essais de croissance des levures dans le milieu lisier/perméat :

détermination du C/N

Les résultats du tableau 4 montrent que les levures peuvent croître dans du lisier non pasteurisé enrichi de perméat et que *K.marxianus* s'est démarquée des autres souches de levures après 6 jours de croissance dans un milieu affichant un rapport C/N de 10/1. La biomasse obtenue était de l'ordre de  $10^7$  levures par ml. Comparativement aux trois autres souches, *K marxianus* s'est avérée la plus performante et ce, quelque soit le ratio C/N utilisé pour les essais.

Après ces résultats préliminaires, nous avons effectué les mêmes essais de croissance, dans les mêmes conditions de fermentation, mais avec le milieu I.P pasteurisé. Les résultats obtenus (tableau 2.4) montrent que ce milieu est généralement favorable à la croissance des levures lorsqu'il est pasteurisé.

La performance de *K. marxianus* dans ces conditions était supérieure à celle des autres souches quelque soit le ratio C/N. Toutefois, il faut relever que le rapport 30/1 convient le mieux au développement de la plupart des souches de levures. Cependant, un rapport C/N de 30/1 ou de 20/1 entraîne un surplus de carbone disponible pour les levures qui pourraient l'utiliser entre autres pour produire des réserves lipidiques ou glucidiques (tréhalose, glycogène). Le ratio maximal de carbone et d'azote qu'une levure peut assimiler pour la synthèse de ses constituants cellulaires de base est de 7/1-10/1 (Atkinson et Mavituna, 1991). Ces essais ont donc permis de constater que le milieu LP pasteurisé est favorable à la croissance des levures.

L'excès de carbone du milieu représente donc un gaspillage de substrat et pourrait par surcroît servir de substrat à des micro-organismes indésirables. Il faut souligner aussi que les résultats favorables obtenus avec le rapport 30:1 l'ont été en utilisant un milieu (LP) préalablement chauffé (pasteurisé). A cause de ces considérations et compte tenu de la rentabilité économique douteuse d'un procédé de pasteurisation, cet ensemble de conditions n'a pas été retenu.

En outre, des ratios C/N élevés supposent des mélanges de volumes beaucoup plus importants de perméat que de lisier. L'objectif principal de cette étude étant de trouver une avenue rentable et respectueuse de l'environnement pour le lisier, nous avons donc opté pour le rapport 10/1 qui à toute fin pratique (pasteurisé ou non) minimise les volumes à mélanger et donne des résultats satisfaisants. Ce rapport représente, sous nos conditions expérimentales, une proportion d'environ 55% (vol) de lisier et 45% (vol) de perméat dans le mélange. Il faut cependant mentionner que ce rapport peut varier en fonction de la teneur en azote ammoniacal du lisier ; la teneur en lactose du perméat par ailleurs est nettement plus constante.

A partir de la formule chimique approximative des levures ( $C_6H_{10}O_3N$ ), (Atkinson et Mavituna, 1991) on aurait pu retenir dès le départ un ratio 10/1. Néanmoins, nous avons voulu tenir compte de situations problématiques qui pourraient survenir à la ferme. En effet, il se pourrait qu'à un moment donné un producteur de porcs se retrouve avec une quantité de lactosérum à mélanger à son lisier. Ces résultats préliminaires permettent de suggérer de doubler et même de tripler le ratio C/N sans effets négatifs observables sur la performance de croissance des levures.

#### 4 Effet du pH du milieu de culture sur la croissance de *K. marxianus*

Ces essais préliminaires que nous venons de rapporter, bien que favorisant une croissance adéquate des levures, ne permettent pas d'éliminer la prolifération de bactéries inoffensives ou potentiellement pathogènes, pas plus qu'elles ne permettent de réduire la compétition d'autres levures. Le contrôle du pH a donc été envisagé non seulement pour maximiser la vitesse de fermentation et les rendements en biomasse mais aussi pour exercer un certain contrôle sur le développement des bactéries potentiellement pathogènes.

L'activité microbienne au cours des fermentations entraîne des fluctuations de pH liées à l'utilisation de certains substrats (hydrates de carbone) et à la production de certains métabolites (c'est à dire les acides organiques). Considérant que le lisier peut contenir des micro-organismes potentiellement pathogènes et sachant aussi qu'un pH de 4,5 représente une barrière pour ces derniers (Russel et Diez-Gonzalez, 1998; Gould et al , 1983), nous avons effectué des essais à différents pH (se situant dans la plage optimale de 4,5 à 6,0) afin de répondre à cette nécessité.

Puisque les résultats obtenus à pH 4,5 (figure 2.1) démontraient une croissance très ralentie et plafonnant rapidement, nous avons cherché un pH pouvant permettre un démarrage rapide de la fermentation sans trop favoriser le développement des bactéries indigènes. C'est dans cette optique que nous avons réalisé des essais à un pH initial de 5,4 (figure 2.1). Les résultats se sont avérés très satisfaisants ( $2.8 \times 10^8$  levures/ml par rapport à  $2 \times 10^6$ ). Cet ajustement a permis d'obtenir une croissance abondante des levures tout en minimisant les inhibitions imputables à la présence d'acides organiques à courtes chaînes ( Russel et Diez-Gonzalez, 1998 ; Gershon et Shanks, 1978 ; Spencer-Marins, 1994). Les courbes de croissance de la levure *K. marxianus* (figure 2.2) permettent de visualiser la nature du phénomène. On constate une croissance abondante pour les pH supérieurs à 5,0 alors qu'aux pH inférieurs, les levures semblent incapables d'utiliser efficacement les substrats. La phase de croissance logarithmique est considérablement retardée surtout aux pH inférieurs à 5,1.

La figure 2.3 illustre la vitesse d'utilisation du lactose par *K. marxianus*; on y distingue une utilisation rapide pour le pH 5,4; tout le lactose fut utilisé après trois jours de fermentation alors qu'il a fallu attendre 6 jours pour observer l'épuisement du milieu aux pH 4,5 et 4,0.

La figure 2.5 présentent l'évolution des concentrations d'acides organiques, en particulier l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide propionique en fonction du temps. L'acide lactique est produit en quantité importante les premiers jours de la fermentation, puis disparaît des milieux pour les pH 5,4 et pH 6,0. La concentration en acide acétique fluctue tout au long de la fermentation tandis que celle en acide propionique reste très faible du début à la fin de la fermentation généralement. Ces résultats sont en conformité avec les précédents (figure 2.3) et indiquent qu'il y a effectivement une forte activité métabolique à un pH supérieur à 5,0-5,4.

Au début de la fermentation, une partie du lactose serait utilisée directement par les levures et une autre partie par les bactéries qui le transforment en acide lactique. Aux bas pH, les enzymes bactériennes telles que les  $\beta$ -galactosidases qui permettent l'hydrolyse du lactose en glucose et en galactose sont vraisemblablement inhibées si bien que ces monosaccharides qui devraient être métabolisés par la suite pour la production de biomasse ne peuvent être utilisés à cette fin.

Les acides organiques sont reconnus depuis longtemps pour leur pouvoir inhibiteur vis à vis des bactéries. Le pH d'un milieu de culture contenant des acides organiques joue un rôle important sur la toxicité de ces acides, étant donné que l'acide se retrouve sous forme non dissociée lorsque le pH est inférieur au pKa de l'acide concerné (Henry *et al.*, 1983 ; Borquez *et al.*, 1994 ; Russel et Diez-Gonzalez, 1998). Retenons par définition que le pKa d'une solution donne la valeur de pH à laquelle les formes dissociées et non dissociées des acides sont en concentration égale. Il permet donc de connaître l'état ionique de la solution en fonction du pH.

Lorsque la valeur du pH est inférieure au pKa, la forme non dissociée de l'acide domine alors que pour des valeurs de pH supérieures au pKa, la forme dissociée (moins inhibitrice) domine.

Tableau 2.1. Acides organiques à courte chaîne et leur pKa.

|             | Lactique | Acétique | Propionique | Butyrique |
|-------------|----------|----------|-------------|-----------|
| Pka         | 3,06     | 4,75     | 4,87        | 4,81      |
| Température | -        | 25°C     | 25°C        | 20°C      |

Comme l'indique le tableau 2.1, les valeurs de pKa des acides gras volatils se situent entre 4,7 et 4,9 et augmentent avec la longueur de la chaîne carbonée (Russel et Diez-Gonzalez, 1998) si bien qu'à des valeurs de pH inférieures à 5,0, les formes non dissociées dominent. L'effet du pH sur la dissociation des acides organiques est décrit par l'équation de Henderson-Hasselbalch où A<sup>-</sup> et HA représentent respectivement les formes dissociées et non dissociées de ces acides (Russel et Diez-Gonzalez, 1998).

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Le pouvoir inhibiteur des acides organiques sur l'activité microbienne est donc inversement relié au pH du milieu: plus le pH est bas plus l'inhibition est forte.

La toxicité est due au flux transmembranaire de la forme non dissociée qui entre dans la cellule par diffusion simple. Ces acides exercent leur effet nuisible en acidifiant le cytoplasme. En effet, une fois dans le cytoplasme où le pH est neutre, l'acide organique (XCOOH) se dissocie (H<sup>+</sup>, XCOO<sup>-</sup>); cette situation a pour conséquence une baisse du pH à l'intérieur de la cellule qui s'acidifie à cause des protons (H<sup>+</sup>) libérés par la dissociation de l'acide organique et entraîne éventuellement un ralentissement de la vitesse de la fermentation (Russel et Diez-Gonzalez, 1998 ; Pampulha et Loureiro-Dias, 1990; Spencer-Martins, 1994 ; Borquez et al., 1994).

Ce ralentissement pourrait s'expliquer selon Gould et al., (1983) par le fait que la cellule dépense beaucoup d'énergie pour maintenir le pH interne constant au dépend de l'énergie disponible pour la synthèse de nouveaux matériels. Aux pH légèrement acides, ceux-ci sont moins toxiques pour les levures que pour les bactéries (Hong et al., 1990) bien qu'il y ait plus d'acides produits dans le milieu. La croissance bactérienne est fortement inhibée lorsque le pH est en dessous de 4,5 ; ce qui minimise les risques de contamination et de dominance bactérienne (Boze et al., 1992).

Nos résultats (figure 2.5) sont en accord avec ceux de Erdman et Reddy, (1987), qui ont observé une augmentation de la concentration en acide lactique au début de la fermentation suivie d'une baisse rapide. Cette chute pourrait être attribuée à l'utilisation de cet acide par les levures. Nous savons entre autre que l'acidité ralentit la synthèse de plusieurs enzymes qui catalysent diverses étapes de la glycolyse.

Ces observations confirment aussi celles de Hong et al., (1990) qui ont noté une inhibition accrue de la croissance des levures *Schizosaccharomyces* à des pH inférieurs à 4,9. D'ailleurs, nous avons observé des fluctuations importantes du pH, que nous avons dû ajuster chaque 24 heures.

Pour les pH maintenus à des valeurs supérieures à 5,0, nous avons aussi noté une baisse du pH au début de la fermentation, ce qui pourrait être dû à la production d'acides organiques et/ou à l'assimilation de l'azote ammoniacal dont les résultats sont présentés à la figure 2.4.

Au début de la fermentation, l'azote est assimilé rapidement à un pH de 5,4. Ce qui ne semble pas être le cas aux plus bas pH. En effet, lorsque les conditions sont défavorables, les bactéries utilisent directement les acides aminés du milieu pour synthétiser leurs protéines (Slaughter, 1988 ; Burrows, 1970) alors que les levures continuent d'utiliser l'azote ammoniacal pour maintenir leur pool d'acides aminés. Il est établi que les bactéries aérobies utilisent facilement les acides organiques pour leur croissance (Chen et al., 1994).

#### *IV Conclusion partielle*

Grâce à une supplémentation adéquate du lisier en sucres fermentescibles et en levures, nous avons pu établir que les levures peuvent se développer dans du lisier de porc enrichi de perméat de lactosérum de fromagerie (malgré une forte contamination bactérienne au départ), sous une valeur optimale de pH de l'ordre de 5,5 pour le démarrage de la fermentation. Les résultats obtenus ont permis de retenir la levure *Kluyveromyces marxianus* comme étant particulièrement bien adaptée à croître sur un milieu mixte à base de lisier de porc et de perméat de lactosérum puisqu'elle s'est avérée la plus performante des quatre souches de levures étudiées.

Un rapport C/N de 10/1 semble suffisant pour assurer une croissance abondante des levures. Ce ratio correspond à un mélange d'environ 55% de lisier avec 45% de perméat (vol/vol). Des ratios C:N de 20:1 et 30:1 se sont avérés tout aussi performants quant à la quantité de levures produite. Un ajustement de départ du pH à 5,5 a permis de maximiser la croissance tout en prévenant certaines inhibitions qui seraient vraisemblablement imputables à la présence d'acides organiques à courte chaîne. Pour la suite des travaux, nous avons donc retenu *K. marxianus* et le rapport C/N de 10:1. Ces conditions permettent aussi d'obtenir un produit dont l'apparence est présentée à la figure 2.6.



Tableau 2.2. Composition type du lisier de porc utilisé lors des essais en laboratoire

|                        |                            |                   |          |
|------------------------|----------------------------|-------------------|----------|
| Solides totaux         | 1,55%                      | Lactose           | n.d.*    |
| MES                    | 0,67%                      | Glucose           | n.d.     |
| pH                     | 6,8                        | Galactose         | n.d.     |
| N-NH <sub>3</sub>      | 2,7 g/L                    | Acide lactique    | n.d.     |
| Flore totale           | 4.3x10 <sup>7</sup> ufc/ml | Acide acétique    | 1,45 g/L |
| Coliformes totaux      | 3.0x10 <sup>5</sup> ufc/ml | Acide propionique | 0,75 g/L |
| Levures et moisissures | 4.7x10 <sup>3</sup> ufc/ml | Acide butyrique   | 0,6 g/L  |

\* non détecté

Tableau 2.3. Effet du chauffage du lisier à 85°C pendant 5-10-30 minutes et de la centrifugation (8000 g, 20 minutes) sur la microflore du lisier de porc

| Durée du chauffage (minutes) | Centrifugation Du lisier | Flore totale (UFC**/ml) | Coliformes Totaux (UFC/ml) | Levures et moisissures (UFC/ml) |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 0                            | c*                       | 6.9x10 <sup>5</sup>     | <10 <sup>0</sup>           | <10 <sup>0</sup>                |
|                              | nc                       | 4.3x10 <sup>7</sup>     | 1.0x10 <sup>5</sup>        | 7.8x10 <sup>3</sup>             |
| 5                            | c                        | 6.9x10 <sup>2</sup>     | <10 <sup>0</sup>           | <10 <sup>0</sup>                |
|                              | nc                       | 2.5x10 <sup>4</sup>     | <10 <sup>0</sup>           | <10 <sup>0</sup>                |
| 10                           | c                        | 4.7x10 <sup>2</sup>     | <10 <sup>0</sup>           | <10 <sup>0</sup>                |
|                              | nc                       | 1.1x10 <sup>4</sup>     | <10 <sup>0</sup>           | <10 <sup>0</sup>                |
| 30                           | c                        | 2.3x10 <sup>2</sup>     | <10 <sup>0</sup>           | <10 <sup>0</sup>                |
|                              | nc                       | 2.1x10 <sup>4</sup>     | <10 <sup>0</sup>           | <10 <sup>0</sup>                |

\*c : lisier centrifugé 20 minutes à 8000 g ; nc : lisier non centrifugé

\*\* UFC : unités formatrices de colonies

Tableau 2.4. Dénombrement des levures dans le milieu LP pasteurisé (85°C-30 minutes) et non pasteurisé après 6 jours de croissance à 20-23°C, sous une agitation de 250 rpm

| Ratio C:N (p/p)-><br>Souches       | 1:1              |                  | 10:1                |                     | 20:1                 |                      | 30:1                 |                      |
|------------------------------------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                    | NP               | P                | NP                  | P                   | NP                   | P                    | NP                   | P                    |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i>     | <10 <sup>0</sup> | <10 <sup>0</sup> | 1.8x10 <sup>7</sup> | 2.0x10 <sup>8</sup> | 1.9 x10 <sup>6</sup> | 2.4 x10 <sup>8</sup> | 7.2 x10 <sup>6</sup> | 3.2 x10 <sup>8</sup> |
| <i>Saccharomyces boulardii</i>     | <10 <sup>0</sup> | <10 <sup>0</sup> | 4.0x10 <sup>6</sup> | 2.3x10 <sup>6</sup> | 2.2 x10 <sup>4</sup> | 6.9 x10 <sup>6</sup> | 7.7 x10 <sup>5</sup> | 2.6 x10 <sup>8</sup> |
| <i>Trichosporon cutaneum</i>       | <10 <sup>0</sup> | <10 <sup>0</sup> | 8.7x10 <sup>6</sup> | 2.0x10 <sup>6</sup> | 9.4 x10 <sup>4</sup> | 7.5 x10 <sup>7</sup> | 4.0 x10 <sup>5</sup> | 2.7 x10 <sup>8</sup> |
| <i>Kluyveromyces golden cheese</i> | <10 <sup>0</sup> | <10 <sup>0</sup> | 1.7x10 <sup>6</sup> | 5.5x10 <sup>7</sup> | 1.4 x10 <sup>5</sup> | 7.8 x10 <sup>7</sup> | 7.2 10 <sup>6</sup>  | 2.9 x10 <sup>6</sup> |

NP= non pasteurisé

P = pasteurisé

Tableau 2.5. Proportion de lisier et de perméat utilisée au cours des fermentations

| Rapport C :N | % purin | % perméat |
|--------------|---------|-----------|
| 30:1         | 25      | 75        |
| 20:1         | 34      | 66        |
| 10:1         | 50      | 50        |
| 1:1          | 90      | 10        |

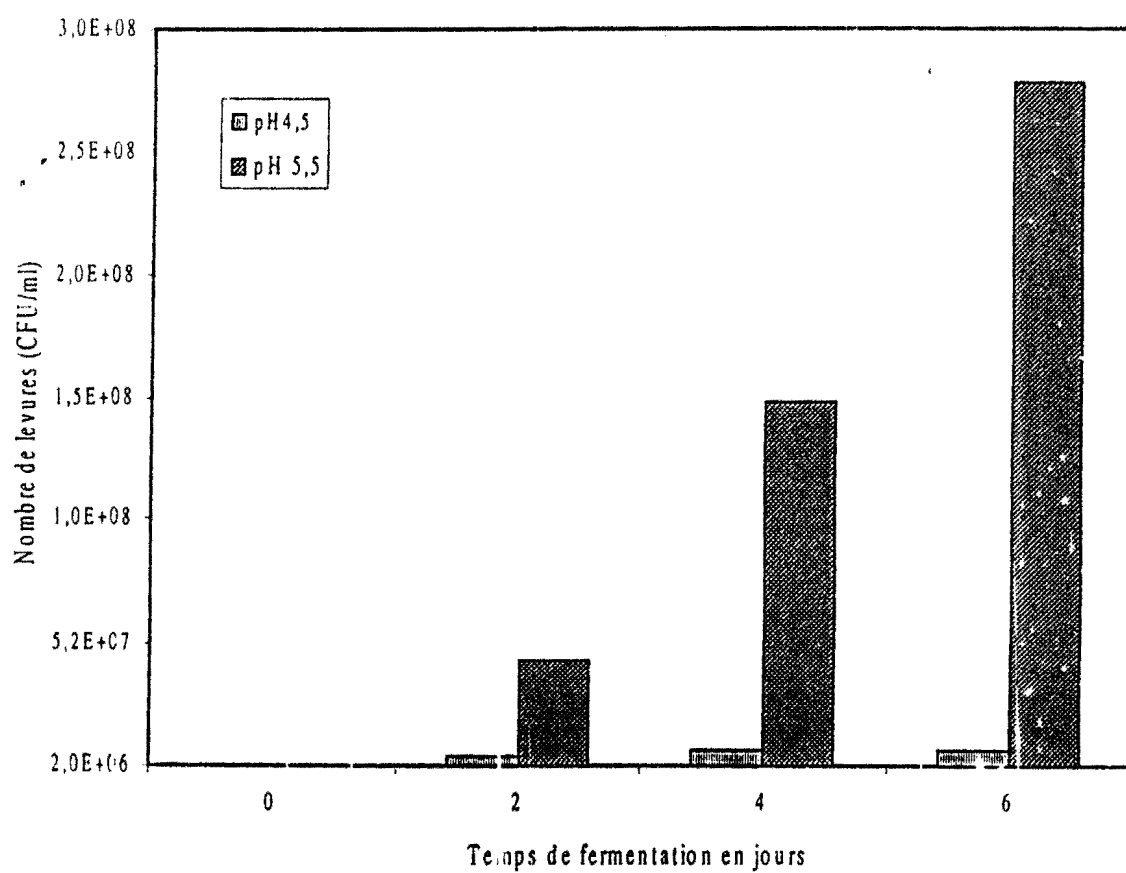


Figure 2.1. Performance de croissance de *K. marxianus* sur une période de 6 jours dans le milieu LP, sous un ratio C/N=10, une température de 20-23°C, des pH de 4,5 et 5,5 ajustés manuellement au moyen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) et NaOH (2N) toutes les 24 heures, sous une agitation de 250 rpm.

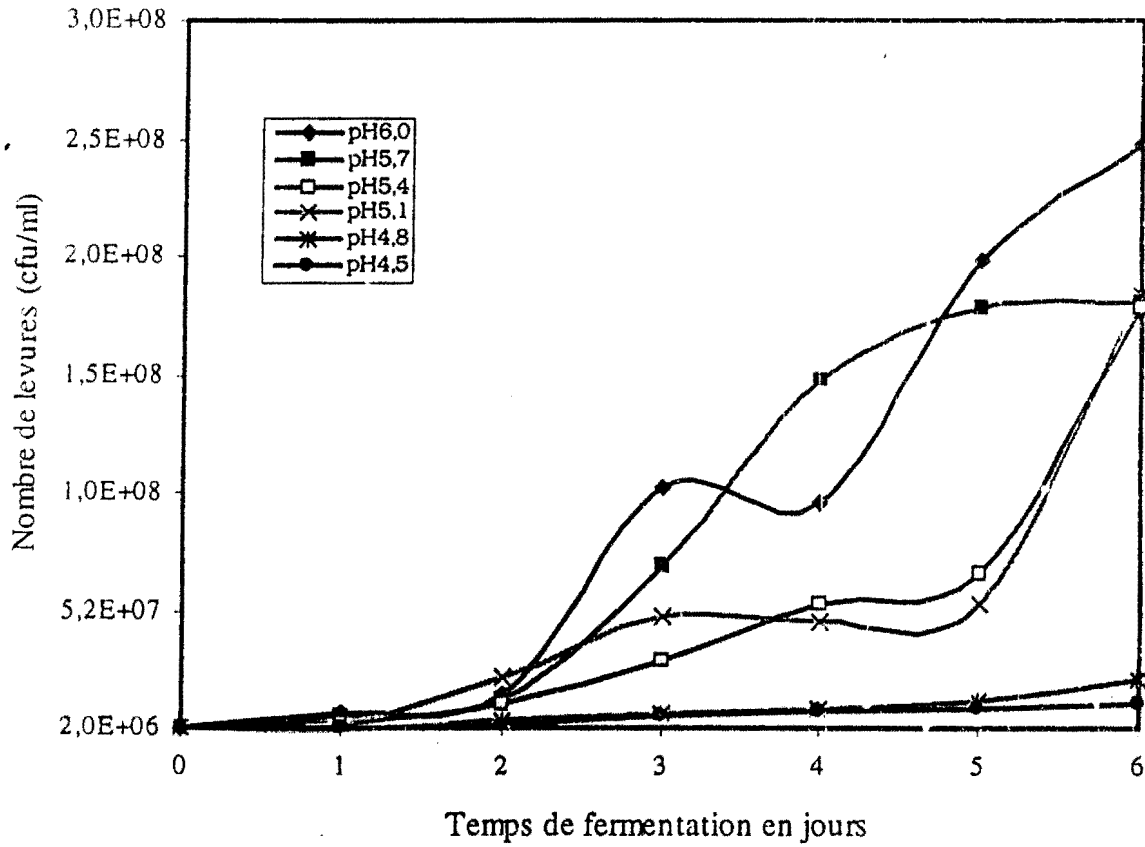


Figure 2.2. Courbes de croissance de *K. marxianus* sur une période de 6 jours, sous un ratio C/N=10 à une température de 20-23°C, sous différentes conditions de pH du milieu LP ajusté manuellement au moyen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) et NaOH (2N) toutes les 24 heures, sous une agitation de 250 rpm.

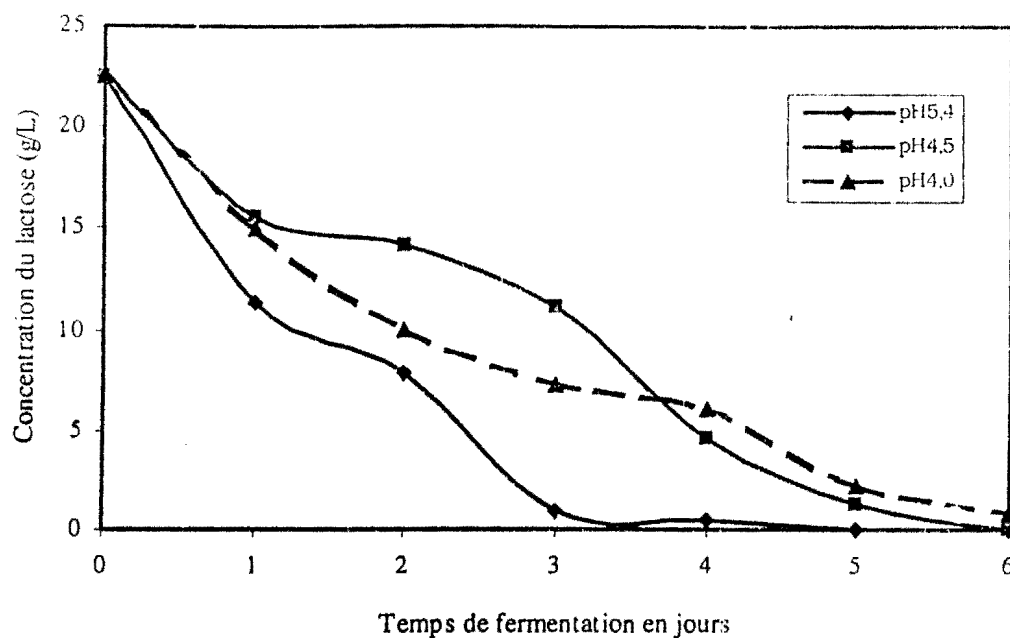


Figure 2.3. Utilisation du lactose par *K. marxianus* sur une période de 6 jours, sous un ratio C/N=10, une température de 20-23°C, sous différentes conditions de pH du milieu LP ajusté manuellement au moyen de  $H_2SO_4$  (2N) et NaOH (2N) toutes les 24 heures, sous une agitation de 250 rpm.

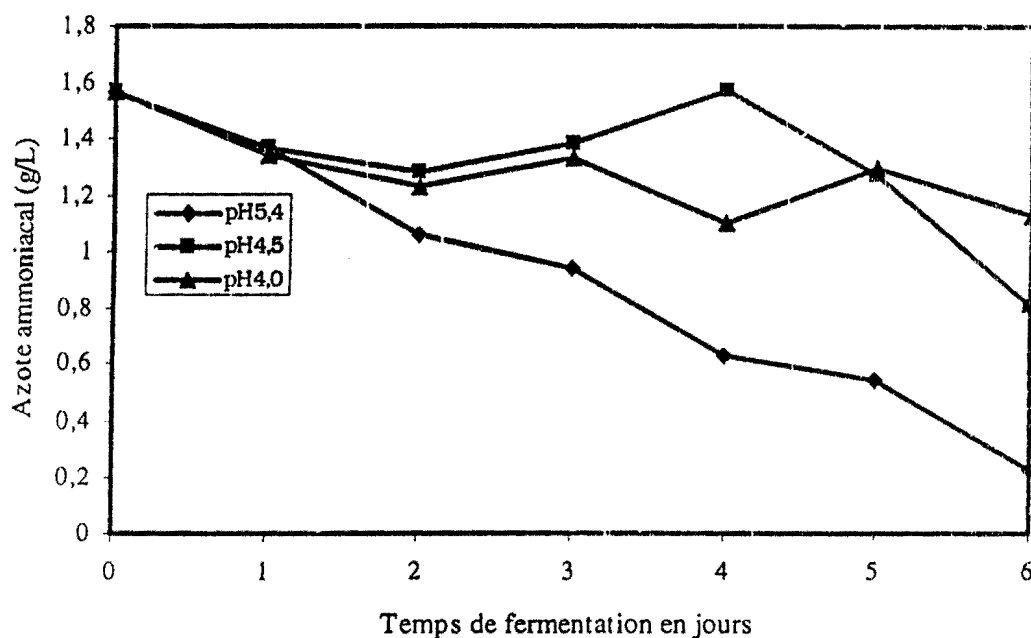


Figure 2.4. Utilisation de l'azote ammoniacal par *K. marxianus* sur une période de 6 jours, sous un ratio C/N=10, une température de 20-23°C, sous différentes conditions de pH du milieu LP ajusté manuellement au moyen de  $H_2SO_4$  (2N) et NaOH (2N) toutes les 24 heures, sous une agitation de 250 rpm.

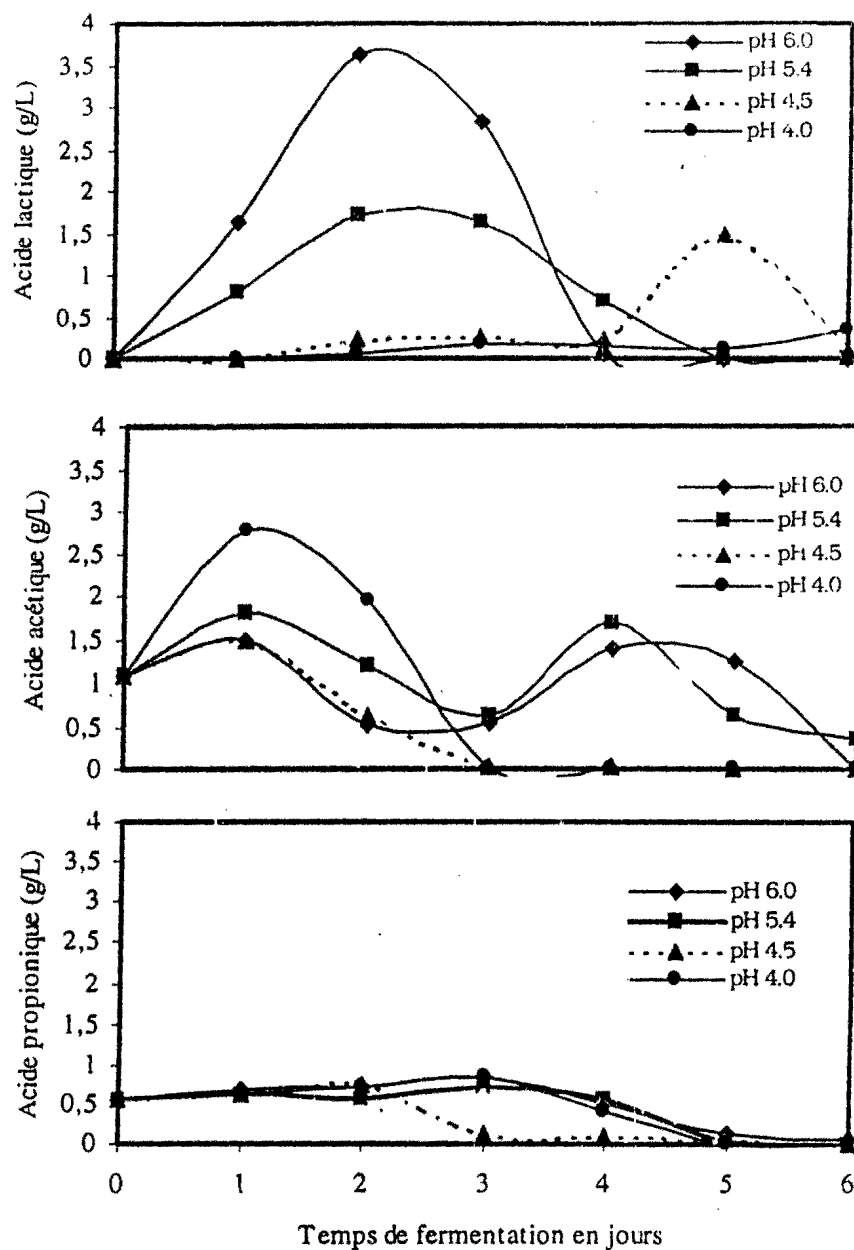


Figure 2.5. Évolution des acides lactique, acétique et propionique au cours de la fermentation de *K. marxianus* dans le milieu LP sur une période de 6 jours, sous un ratio C/N=10, une température de 20-23°C, sous différentes conditions de pH du milieu LP ajusté manuellement au moyen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) et NaOH (2N) toutes les 24 heures, sous une agitation de 250 rpm.

Figure 2.6. Apparence du lisier brut (A), du perméat de lactosérum (B), du mélange du lisier/perméat 55:45 (C) et du mélange fermenté par *K. marxianus* à 22°C dans des flacons agités à 250 rpm (D).

## **Chapitre III**

**Mise à l'échelle pilote du procédé développé en laboratoire:  
sélection et évaluation du bioréacteur**



Dans ce chapitre, nous décrivons la démarche expérimentale et les résultats qui ont permis de sélectionner un bioréacteur permettant la mise à l'échelle pilote du procédé développé en laboratoire.

## *1 Matériel et méthodes*

### 1 Matières premières

#### 1.1 Lisier de porc

Nous avons déjà étudié le lisier de porc dans sa notion même (ch. 1, section 1.1) et nous avons aussi précisé la provenance du lisier utilisé dans cette étude (ch. 2, section 1.1). Néanmoins, il est important de noter qu'à l'échelle où nous travaillons, nous avons opté pour du lisier frais, c'est à dire pour un lisier n'ayant pas plus de 3-4 jours d'âge, puisqu'il nous faut supposer que cette technologie, si elle était installée dans une porcherie, épuiserait le lisier au fur et à mesure de sa production.

#### 1.2 Perméat de lactosérum

Il convient de rappeler que le perméat de lactosérum a fait l'objet de développements dans le chapitre I (II). Il importe cependant de préciser qu'une partie des essais décrits dans ce chapitre a été réalisée avec du lactosérum entier (non écrémé et non ultrafiltré) pour tenir compte des porcheries recevant ce produit directement de fromageries ne disposant pas d'appareils d'ultrafiltration. Cela s'explique aussi par le fait que ce dernier est un matériel un peu plus difficile à manipuler par rapport au perméat parce qu'il contient des protéines, du gras et une contamination bactérienne non négligeable (ferments lactiques principalement).

De ce fait, il est beaucoup plus susceptible de mousser lors de la fermentation. Donc, si nous arrivons à contrôler la mousse avec le lactosérum, il est fort probable qu'il en soit ainsi pour le perméat qui lui, est une substance dépourvue de protéines et par conséquent moins susceptible de mousser comme le lactosérum. C'est dire que si nous pouvons le plus, nous pouvons le moins. Précisons que le lactosérum provenait de la ferme SMA (rue d'Estimauville, Québec).

### 1.3 Levures

Les deux substrats ci-haut décrits furentensemencés au moyen d'une culture de levures. Celle que nous avons sélectionnée pour la conduite des fermentations est *Kluyveromyces marxianus* à cause de son aptitude à utiliser le lactose et à se développer abondamment dans un milieu composé de lisier et de perméat (chapitre 2, 3). Le bioréacteur a étéensemencé à partir d'un inoculum de 1% contenant environ  $10^8$  levures/ml préparé de la manière suivante. Un aliquot prélevé à partir de la gélose (malt agar) inclinée fut transféré dans du bouillon au malt pendant 48h (dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de ce milieu). Après 48 heures d'incubation à 23°C et sous une agitation de 250 rpm, 1 ml de cette culture fut transféré dans 100 ml de perméat de lactosérum pendant 24 heures, et a servi à inoculer le bioréacteur.

### 1.4 Neutralisant

Les micro-organismes modifient le pH du milieu au cours de leur croissance. Il est donc souhaitable, dans un contexte d'optimisation des conditions de croissance, de l'ajuster au niveau désiré. Le neutralisant utilisé pour les besoins de ce chapitre était de l'acide chlorhydrique concentré. L'ajout d'acide s'est effectué manuellement et au besoin.

## 1.5 Antimousse

L'aération du milieu est nécessaire pour maximiser la désodorisation et la production de biomasse levurienne. Cependant, la production de mousse qui en découle devra être minimisée et/ou neutralisée. A cet effet, le produit que nous avons utilisé pour minimiser la mousse qui se formait de façon sporadique dans le bioréacteur était un antimousse commercial (Disfoam CC-118, NOF Corp., Japon) dilué de moitié avec de l'huile végétale de canola (Métro). Nous avons établi qu'une dilution avec de l'huile végétale pouvait être envisagée jusqu'à des ratios de 1/10 sans trop affecter l'activité antimoussante de ce produit et sans effet inhibiteur sur les levures.

## 2 Bioréacteurs

### 2.1 Culture en cuve aérée par microbullage

Lors du passage du laboratoire à l'usine pilote, nous avons d'abord opté pour un bioréacteur (figure 3.1) qui permettait une aération par microbullage au moyen d'un diffuseur (Aquipro, model MBD100). Cependant, nous avons vite remarqué les limites d'un tel bioréacteur. En effet, nous avons non seulement observé une production de chaleur importante (réaction exothermique) mais également une forte production de mousse nécessitant une consommation importante d'antimousse. Nous avons aussi noté une acidification marquée du milieu de fermentation. Le pH était constamment en dessous de 4,0. Cette production d'acide a provoqué la corrosion de la pompe (moteur ½ hp) de recirculation du milieu en fermentation dont certaines composantes étaient faites d'aluminium. Il convient de souligner qu'à ce stade de nos essais, le contrôle de pH n'était pas utilisé.

Le fonctionnement de ce bioréacteur nécessitait en outre une aération au moyen d'air comprimé, entraînant des coûts importants puisque nécessitant un compresseur relativement coûteux et énergivore. Tout cela a conduit à sa mise à l'écart, de sorte que nous avons dû dans un deuxième temps concevoir un nouveau bioréacteur pouvant minimiser à la fois la production de mousse et les coûts de l'aération. Tout le travail ainsi que toutes les conclusions rapportés dans ce chapitre sont à relier à ce deuxième bioréacteur pilote sur lequel notre choix s'est porté et dont la description détaillée est présentée ci-dessous.

## 2.2 Culture sur colonne aérée par écoulement en film mince

### 2.2.1 Description et fonctionnement du bioréacteur

Le bioréacteur pilote utilisé consiste en une colonne verticale (figure 3.2a) garnie de 3.6 m de hauteur et de 0.3 m de diamètre, à l'intérieur de laquelle les cellules de levures sont immobilisées sur des supports de PVC (Oxyd'H<sub>2</sub>O, Longueuil, Québec) d'une géométrie particulière (figure 3.2c) et disposés en trois sections alternées: verticalement, en désordre et verticalement. Ces supports permettent une circulation d'air à contre-courant (de bas en haut) de celle du milieu de fermentation (de haut en bas) et une maximisation de la surface d'échange de la phase liquide (figure 3.2b). Cette colonne repose sur une cuve rectangulaire en polypropylène de 61 cm de large; 92 cm de long et ayant une hauteur de 71 cm dont le volume de liquide en circulation était de 30 litres.

La chaleur développée par les levures actives dans le milieu en fermentation favorise une circulation d'air du bas vers le haut du bioréacteur, grâce à un effet comparable à celui d'une cheminée. Il en résulte un système d'aération qui ne nécessite aucune composante mécanique pour comprimer ou souffler l'air.

Le système fonctionne en tirant profit au maximum des forces de gravité et ne nécessite qu'une recirculation du milieu liquide. Cette circulation est assurée au moyen d'une pompe centrifuge (moteur 1hp) à grand débit qui permet, en même temps, un mélange efficace de tous les ingrédients du milieu (lisier, perméat de lactosérum, neutralisant, levures). La colonne est également reliée à une pompe péristaltique à double tête assurant l'injection du perméat de lactosérum et du lisier dans le milieu en circulation.

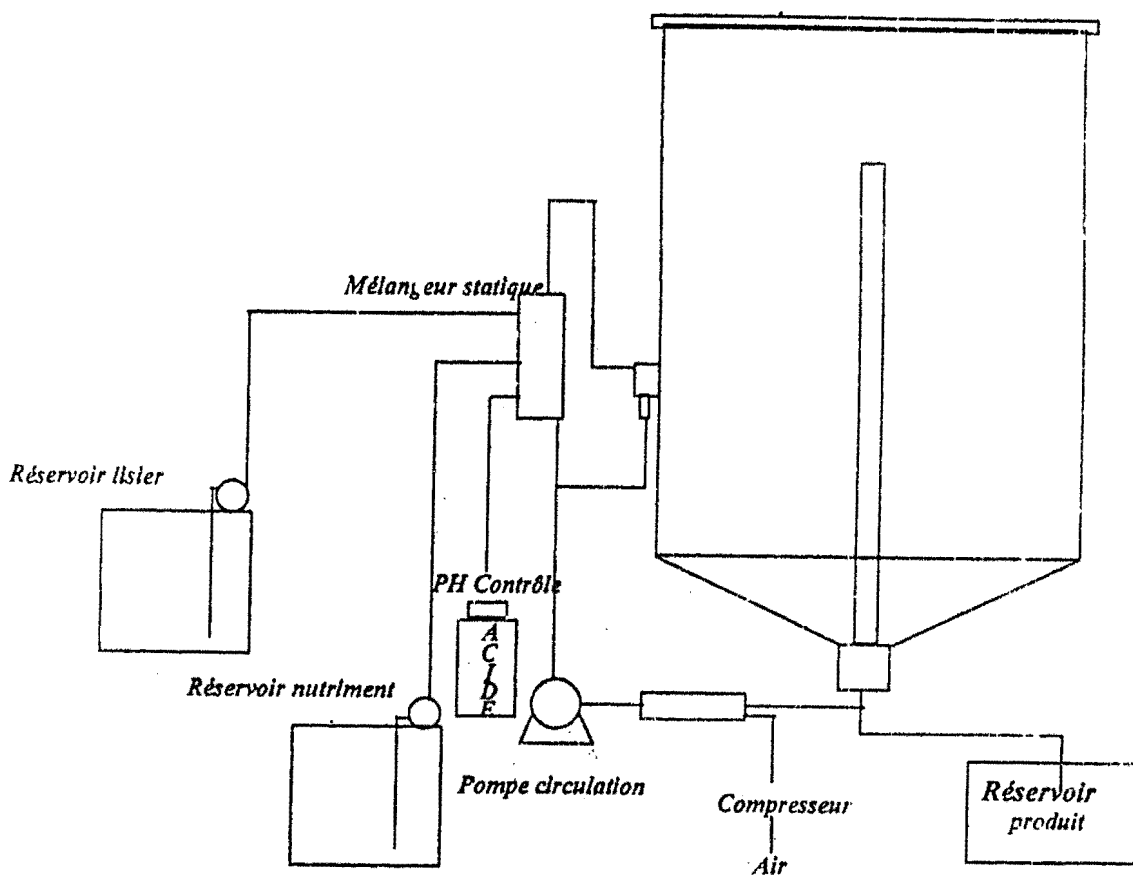


Figure 3.1. Schéma du bioréacteur utilisé pour les essais préliminaires à l'échelle pilote

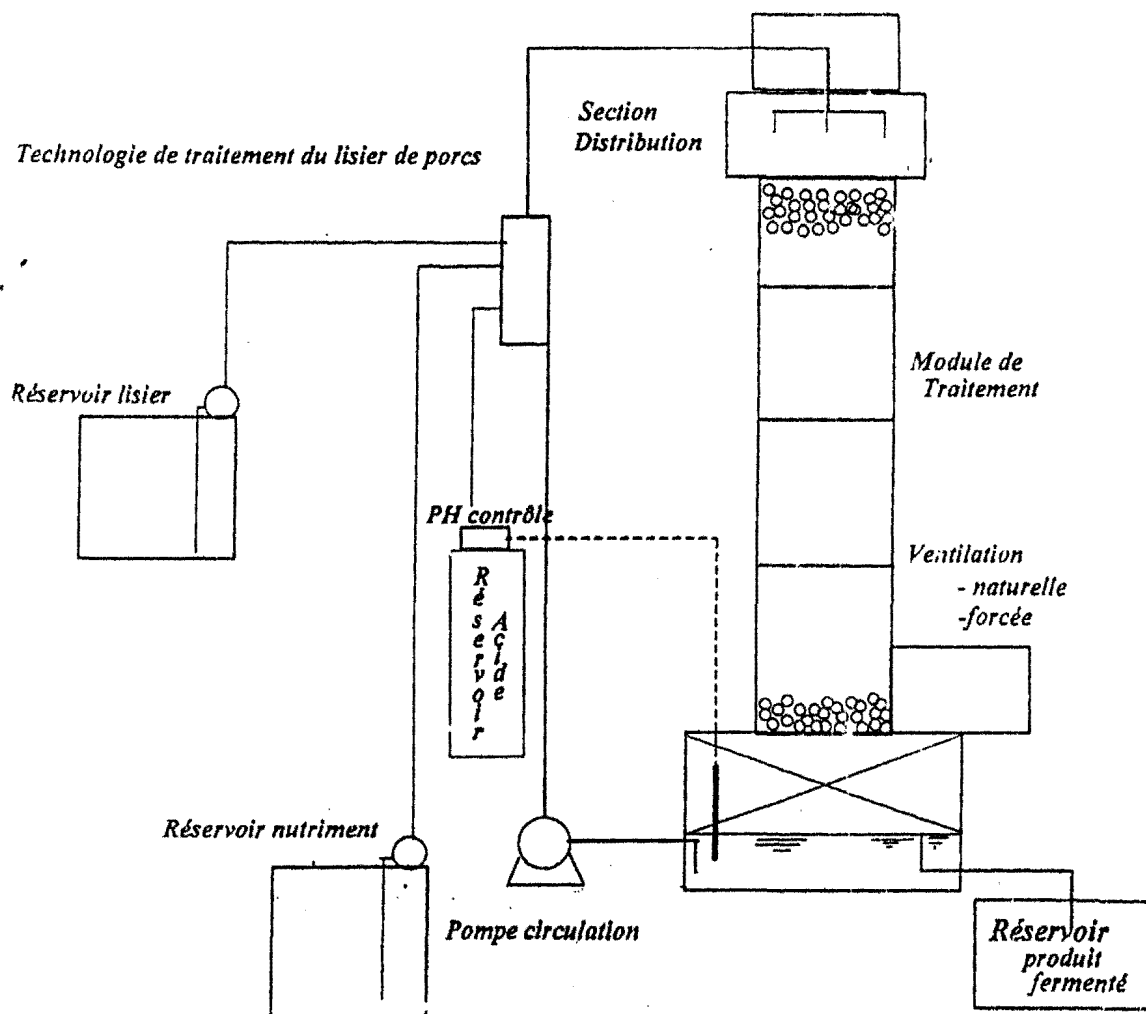


Figure 3.2a. Schéma du bioréacteur utilisé pour les essais à l'échelle pilote

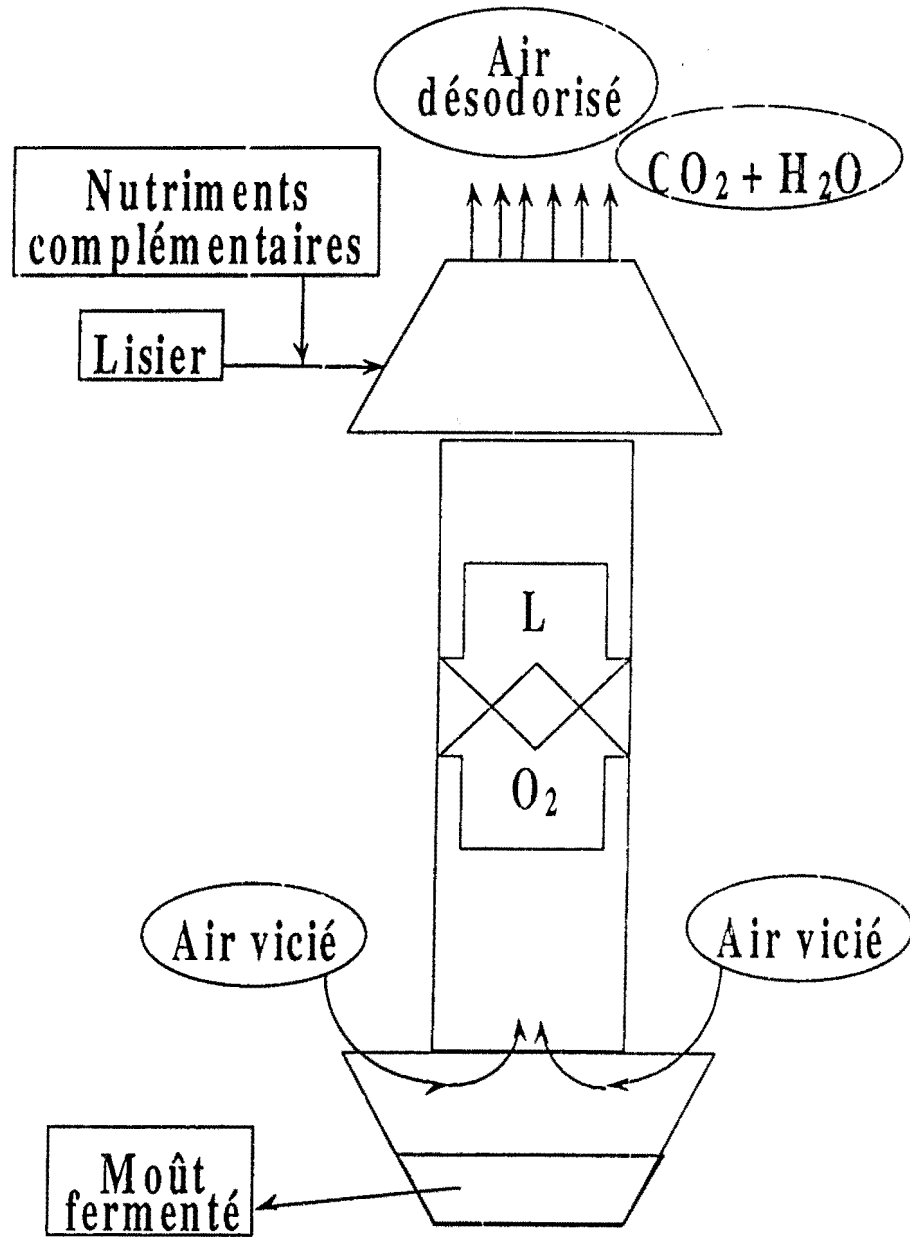


Figure 3.2b. Schéma de fonctionnement du bioréacteur

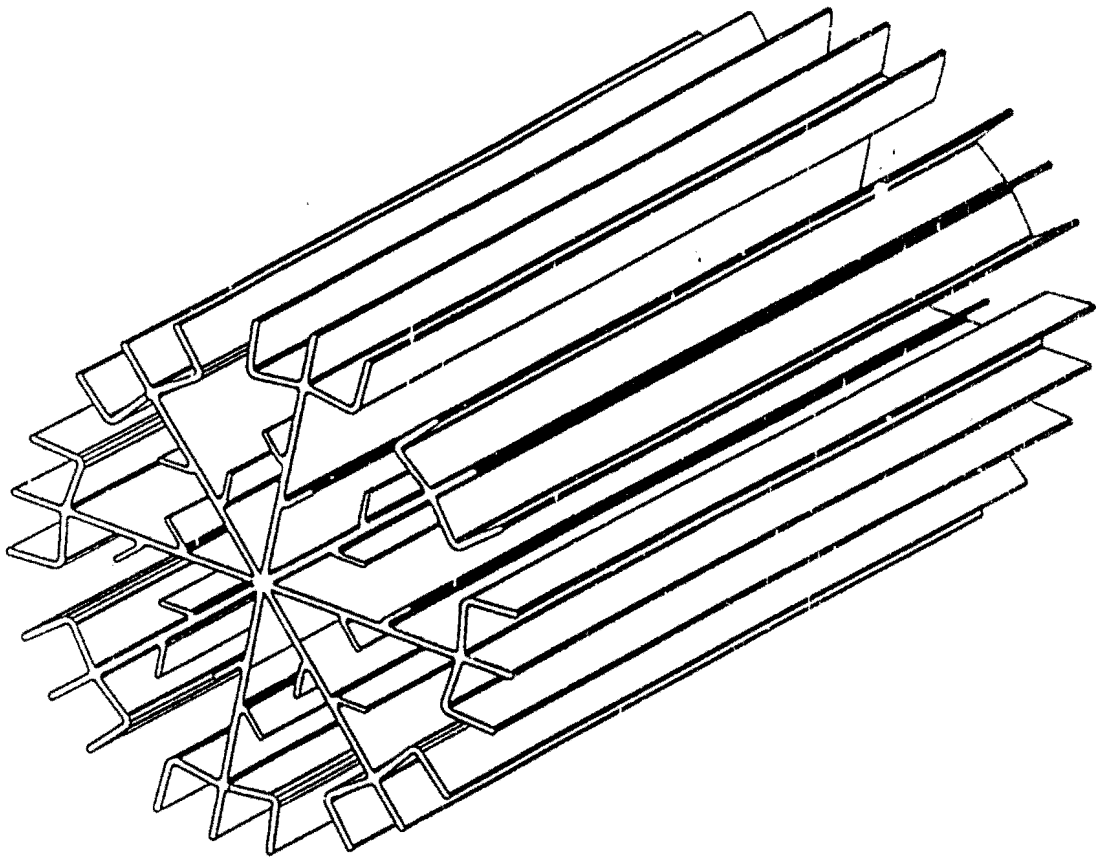


Figure 3.2c. Forme des supports (7,5 cm de diamètre/1,15 m de long) de PVC utilisés pour l'immobilisation des levures à l'intérieur du bioréacteur



### 3 Méthodes

#### 3.1 La fermentation

Dans le présent travail, nous avons opté pour une fermentation alimentée en continu de manière à en faciliter l'implantation dans des porcheries où le lisier est produit à toute fin pratique en continu. En effet, si le procédé s'avérait fiable, il pourrait être installé sur des fermes où le lisier serait introduit dans le bioréacteur au fur et à mesure de sa production. Nous avons procédé dans un premier temps à une fermentation dite en *fed-batch* c'est à dire avec une alimentation continue en lisier et en perméat et une décharge en discontinu. Il faut noter alors que dans ce procédé, on a nécessairement affaire à une utilisation continue du lisier et une vidange séquentielle pouvant être ajustée à l'horaire des repas. Ce à quoi se prête cette méthode. C'est précisément la raison pour laquelle nous avons retenu dans un premier temps un tel régime de fermentation. Nous avons aussi vérifié dans un deuxième temps un mode de fonctionnement avec soutirage continu du milieu fermenté au moyen d'un dispositif de trop-plein.

Les différents paramètres que nous avons surveillés sont le pH, la température, l'oxygène dissout ( $O_2D$ ) et le débit d'alimentation du bioréacteur. Il s'agit là de paramètres classiques qu'il est d'usage de contrôler lors d'une fermentation (Royce, 1993; Blouin et al., 1988).

## 3.2 Suivi et contrôle

### 3.2.1 pH

Le pH renseigne sur les conditions d'acidité ou d'alcalinité qui prévalent dans un milieu aqueux. Sa hausse ou sa baisse généreront, selon les cas, des conséquences souhaitables ou non, si l'on considère l'objectif de recyclage alimentaire qui est au cœur de notre étude. En effet, un pH trop près de la neutralité dans le milieu de fermentation conduirait fort probablement à des conditions favorisant le développement de bactéries potentiellement pathogènes et nous éloignerait de notre objectif de valorisation comme ingrédient alimentaire. À l'inverse un pH inférieur ou égal à 4,5 minimisera et préviendra la croissance de bactéries pathogènes mais ralentira aussi le processus de fermentation. De là, l'intérêt du contrôle du pH. Ce qui au demeurant permet d'éviter l'ajout de produits ou la mise en œuvre de traitements particuliers pour contrer le développement des pathogènes qui auraient pu contaminer le milieu. Pour réaliser les mesures et le contrôle manuel du pH, nous avons utilisé un pH-mètre Corning (modèle 140) muni d'une électrode combinée de type "Accumet" (Fisher Scientific, Montréal).

Notre façon de procéder était la suivante : plusieurs fois par jour, nous prélevions un échantillon du milieu pour en déterminer le pH. En fonction de la lecture obtenue, nous ajoutions ou pas selon le cas, de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré dans le milieu en fermentation jusqu'à ce que nous obtenions la valeur du pH recherchée (à peu près 4,5).

### 3.2.2 Température

Un effet fort intéressant de la température est son influence sur la sélection des micro-organismes dans un environnement donné (Robinson *et al.*, 1971). Une analyse préliminaire du milieu en fermentation a montré que la température fluctuait entre 22°C et 30°C en réponse à l'activité métabolique plus ou moins prononcée de la culture de levures. La température constitue donc un moyen simple, fiable et peu coûteux d'évaluer le degré d'activité des micro-organismes. Nous avons suivi la température de l'air ambiant et du milieu en fermentation, à intervalles réguliers, à l'aide d'un thermocouple Dua log-R<sup>Tm</sup>, modèle 600-1050 (Barnat Co.)

Dans la mesure où l'objectif final est d'obtenir un produit enrichi en levures, exempt de pathogènes et destiné à l'alimentation animale, il est crucial de stimuler au maximum la croissance des levures en exploitant divers avantages comparatifs par rapport aux bactéries pathogènes (pH légèrement acide, et température inférieure à 30°C).

### 3.2.3 Oxygène dissout (O<sub>2</sub>D)

L'O<sub>2</sub>D mesure la quantité d'oxygène disponible dans le milieu et nécessaire à la croissance et à l'activité des micro-organismes. Dans un procédé de traitement aérobie, la première fonction de l'aération est de fournir l'oxygène nécessaire à la production d'énergie et à la dégradation des nutriments (matière organique) en composés plus simples, assimilables (Cumby, 1987). L'aération remplirait deux rôles essentiels: d'abord, oxygéner le milieu pour les raisons ci-dessus mentionnées et ensuite fournir une agitation pour assurer le mélange et la dispersion homogène des nutriments dans le milieu de même que l'uniformisation de la température.

La mesure de l'oxygène dissout est un moyen très efficace permettant de suivre les transformations biochimiques en cours dans le milieu de fermentation (Doyle et De La Noüe, 1987). Sa variation permet de déterminer si les conditions du milieu sont favorables ou non à la croissance des micro-organismes aérobies (Doyle et De La Noüe., 1987).

En effet, dans une culture continue en état d'équilibre, si l'on constate que le niveau de l' $O_2D$  se stabilise autour de zéro (0) ppm suite à l'introduction d'une concentration plus élevée de substrats carbonés, c'est le signe d'une importante activité de la flore présente. A l'inverse, si le niveau de l' $O_2D$  dans le même milieu se maintient à des valeurs intermédiaires entre le 0 et le point de saturation, cela signifie plutôt une activité limitée de la flore en question. Pour maximiser la production de biomasse, les levures présentes dans le milieu doivent utiliser le plus efficacement possible les nutriments (sucre et azote) qui s'y trouvent. Ce qui implique une assimilation concomitante de l'oxygène (soluble) disponible dans le milieu.

La décroissance rapide de l' $O_2D$  dans le milieu en fermentation est un bon signe de l'activité cellulaire généralement dirigée vers la production de biomasse. Il importe donc de s'assurer au cours de la fermentation dans un réacteur donné, d'un bon niveau de disponibilité de l'oxygène, c'est à dire une valeur mesurée se situant très légèrement au-dessus de 0 ppm. L' $O_2D$  a été mesuré à l'aide d'une électrode de type galvanométrique "*oxygen meter*", YSI model 57 (Yellow Spring, Ohio, U. S. A.). Comme pour la température, la lecture s'est faite à intervalle régulier de 5 ou 10 minutes lorsque le système était soumis à de nouvelles conditions de pH, d'alimentation en substrats et/ou de vitesse de recirculation du milieu en fermentation.

### 3.2.4 Vitesse d'alimentation du bioréacteur

Trois raisons essentielles justifiaient la détermination de la vitesse optimale d'alimentation du bioréacteur.

La première vise à éliminer les odeurs du lisier, la deuxième à épuiser complètement les nutriments assimilables provenant du lisier et du perméat de lactosérum et la troisième, à prévenir l'apparition de conditions d'anaérobiose partielle (déficit en oxygène dissout) qui pourraient entraîner la formation d'odeurs indésirables. Pour ajuster la vitesse d'alimentation du bioréacteur, il faut donc surveiller étroitement l'équilibre entre l'alimentation en substrats et la concentration en oxygène dissout du milieu. L'ajustement optimal sera celui qui maintiendra la concentration en  $O_2D$  légèrement supérieure à 0 mg/L.

La fermentation, méthode que nous avons choisie pour atteindre notre objectif de produire une biomasse de levures exempte de pathogènes et débarrassée d'odeur, se devait donc d'être conduite sous différentes contraintes dont nous venons de faire état c'est à dire un pH de 4,5 ou moins, une température n'excédant pas 30 °C, un niveau d'oxygène dissout légèrement supérieur à 0 ppm et un ratio lisier/perméat de lactosérum assurant une utilisation maximale des éléments nutritifs (et nauséabonds) du lisier.

### 3.2.5 Mousse

L'aération et l'agitation intense que subissent les milieux de culture dans les bioréacteurs conduisent généralement à une production abondante de mousse. La mousse constitue en effet un problème difficile à résoudre en fermentation: risques de débordement et dépôt d'une partie des cellules dans l'espace supérieur du bioréacteur.

Elle doit pour cela être éliminée, car en plus des débordements, elle gêne le dégagement du CO<sub>2</sub> (Larpent-Gourgaud et Sanglier 1992 ; Cumby, 1987). Sa formation dépend d'un ensemble de facteurs dont la composition du milieu en protéines et autres substances tensioactives et l'intensité de l'aération (Cumby, 1987). Notre procédé n'en saurait faire abstraction puisque le lisier de porc est un milieu riche en protéines et peptides ayant un pouvoir moussant non négligeable. D'ailleurs, nous avons observé une production de mousse d'intensité et de consistance variables en fonction du pH au cours des fermentations. La mousse produite dans le bioréacteur avait une texture légère et facile à détruire soit au moyen de l'antimousse ditué sus mentionné (Disfoam CC-1180), soit au moyen d'un jet d'eau.

### 3.3 Démarrage des fermentations

#### 3.3.1 Fermentation en absence de lisier

Dans un premier temps, nous avons suivi l'effet des différents paramètres sur la croissance et l'activité des levures (sans contrôler le pH ), et ceci dans un milieu constitué de perméat seul et opéré en mode *batch* (tableau 3.1). L'utilisation de ce substrat riche en carbone et en facteurs de croissance au début du processus de fermentation visait à favoriser le développement des levures avant l'introduction du lisier non pasteurisé qui contient une flore microbienne très hétérogène. Pour permettre aux levures de coloniser le réacteur avant introduction du lisier, nous avons démarré le bioréacteur avec 30 litres de perméat enrichi de sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fisher Chemicals) à raison de 0.1 g/L. Ce milieu a étéensemencé avec 1% d'inoculum de *K. marxianus* contenant 2.6x10<sup>8</sup> levures/ml et la pompe recirculait le milieu à raison de 20 litres/minute.

Cette expérience a été répétée au moins 4 fois et les valeurs de dénombrements de levures rapportées sont des valeurs moyennes.

Afin de vérifier si le bioréacteur pouvait tolérer divers stress, l'alimentation a été interrompue et le pH a été contrôlé entre 4,0 et 4,5 (annexe D) par des additions sporadiques d'acide chlorhydrique concentré.

Nous avons aussi suivi l'effet d'une alimentation en sucrose plutôt qu'en perméat de lactosérum sur la variation du pH du milieu (figure 3.3a et 3.3b).

Des mesures d'oxygène dissout ont été faites régulièrement de manière à suivre l'impact des modifications effectuées sur l'activité respiratoire des cellules (figure 3.4a). L'expérience a été répétée de 4 à 8 fois (figure 3.4aa).

### 3.3.2 Immobilisation des cellules sur supports

Précisons que dès le départ de nos essais en bioréacteur, nous avons observé que les levures cultivées dans du perméat de lactosérum enrichi d'une source d'azote simple  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se fixaient sur les supports (voir schéma d'illustration des supports [figure 3.2c] et les résultats du tableau 3.2). Ce constat a été fait en échantillonnant la surface des supports de la colonne au moyen d'écouvillons.

### 3.3.3 Introduction du lisier dans le bioréacteur

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à la répétition des essais avec du lisier. Son introduction dans le bioréacteur devait se faire de telle sorte que les éléments nauséabonds soient métabolisés par la flore du milieu sans dégagement d'odeur dans le milieu en fermentation (Figure 3.5a et 3.5aa ).

Pour déterminer le débit optimal, nous avons procédé à l'ajout du lisier à des débits différents mais par ordre croissant. Il faut signaler ici que le perméat qui était utilisé pour les essais préliminaires dans ce chapitre a été remplacé par du lactosérum pour les raisons déjà mentionnées (chapitre 3, section 1.2) et que la supplémentation en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a été interrompue au moment où le lisier a été introduit (figure 3.6a et 3.6aa).

Par la suite, à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex, model L/S, tube 15, Labcor) à double tête dont la vitesse pouvait être ajustée au moyen d'un rhéostat (penta-power multi-trive DC motor), nous avons étudié l'effet de la vitesse d'addition du lisier et du lactosérum sur l'activité microbienne (figure 3.7a et 3.7b). La proportionnalité (C/N de 10/1) d'addition de l'un et l'autre des deux substrats était donc toujours respectée, quelque soit la vitesse de pompage. Toutes ces expériences ont été répétées de 4 à 8 fois sauf pour la figure 6 où les essais ont été faits deux fois.

## *II Résultats et discussion*

### 1 Fermentation en absence de lisier: suivi du pH durant la croissance des levures

Les résultats obtenus sans contrôle du pH sont présentés au tableau 3.1. On note une baisse du pH de 6.1 à 4.1 au cours des deux premiers jours de la fermentation. Puis on assiste à une remontée jusqu'à 8.2 dans les jours qui suivent. Une tendance analogue s'observe aussi bien pour la température que pour la concentration de levures. Pour ce qui est de la température, après la remontée rapide des deux premiers jours, elle se stabilise autour de 32°C, alors que le nombre de levures est passé de  $6.8 \times 10^5$  à  $3.6 \times 10^8$  par ml de milieu fermenté, avant de commencer à décroître.



L'abaissement du pH observé dans les premiers jours de la fermentation, peut être attribué à l'assimilation des acides aminés et de l'ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (provenant du sulfate d'ammonium utilisé pour enrichir le perméat de lactosérum) qui entraîne vraisemblablement la formation d'acide sulfurique [ $\text{H}_2\text{SO}_4$ ] (Owen, 1989).

Cette acidification du milieu peut aussi être due à la production de gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) et d'acides organiques puisque selon la littérature, les glucides contribuent à faire baisser le pH suite à leur transformation en acides organiques par le métabolisme microbien (Owen, 1989). La flore aérobie totale ( $10^9$  cfu/ml) du milieu en fermentation renferme des levures et des bactéries.

Toutefois, comme il faut au moins environ  $10^6$  bactéries par ml dans un milieu de culture modérément tamponné pour que les acides produits soient facilement mesurables, les quantités d'acides organiques produits ici ne seraient pas en concentration suffisante pour que leur effet ait des répercussions sur le pH d'un milieu tamponné comme le perméat de lactosérum. Il faut noter aussi que ce sont les bactéries qui sont généralement responsables de la production d'acides organiques, les levures n'en produisant généralement que très peu.

Toutefois, lorsque le pH atteint des valeurs aussi basses que 4,5, le milieu devient hostile à la multiplication des bactéries (pathogènes) qui sont considérablement ralenties sur le plan métabolique. D'ailleurs, selon Doyle et De La Noüe, (1987) l'activité bactérienne est inhibée tant et aussi longtemps que le pH se situe en dessous de 4,6. Toutefois, il faut noter que certains lactobacilles et *Leuconostoc oenos* par exemple sont actifs à des pH inférieurs à 4,0. Par ailleurs, selon Owen (1989), avec un pH de 9,0, toute activité métabolique est retardée; les bactéries prolifèrent abondamment lorsque le pH du milieu se situe au voisinage de la neutralité.

A partir de 5,6, les levures et les moisissures commencent à offrir une bonne compétition aux bactéries. En dessous de 4,5, les levures et les moisissures prédominent dans le milieu.

Tel que déjà signalé plus haut, nous avons remarqué une stimulation de la croissance des levures ( $6.8 \times 10^5$  à  $3.6 \times 10^8$  par ml) en réponse aux conditions modérément acides du milieu. Cette affirmation est soutenue par la remontée de la température (20-35°C), qui traduit une activité métabolique intense. En effet, l'activité métabolique des microorganismes en milieu aérobie est fortement exothermique (Burton et Farrent, 1995). Par la suite, la température s'est stabilisée autour de 32°C sans doute à cause d'un ralentissement de l'activité métabolique des cellules suite à un certain épuisement du milieu et/ou à l'atteinte d'une température excédant la zone optimale.

Après cette baisse marquée du pH du milieu de fermentation, on note une remontée de ce dernier dans les jours suivants. Cette hausse peut être due à plusieurs phénomènes. D'abord, il faut préciser que les levures, bien que sécrétant très peu d'acides organiques au cours de leur métabolisme, sont toutefois capables de les utiliser en milieu aérobie pour leur croissance (Moon, 1983; Champagne et Goulet, 1988) lorsque les conditions environnantes leur sont favorables.

En outre, cette remontée du pH qui va tendre à favoriser la croissance des bactéries pourrait aussi s'expliquer par les activités protéolytiques de ces dernières. Ces activités favorisent la décomposition des protéines du milieu en acides aminés avec une libération d'azote ammoniacal si la dégradation est poussée jusqu'à la désamination (Painter, 1985). Il est important de souligner que les levures lactiques n'ont généralement pas de protéases extracellulaires (Castillo, 1990) pour hydrolyser les protéines et par conséquent, contribuer de la sorte à la remontée du pH.

Notons cependant que la croissance des levures a connu une baisse (tableau 3.1) probablement parce que les conditions du milieu leur sont devenues défavorables ( $\text{pH} > 6$ ,  $\text{T}^\circ\text{C} > 30$ ).

De plus, il y a eu épuisement du milieu en azote assimilable et en carbone fermentescible puisqu'à partir du 4<sup>e</sup> jour, nous avons cessé d'ajouter la source d'azote au milieu et il en a été ainsi pour le perméat à partir du 6<sup>e</sup> jour, ou à l'épuisement de certains facteurs essentiels de croissance.

Il a même pu se produire une lyse cellulaire (Merkel, 1981) suivie d'un relargage du contenu cellulaire (azote, sucre entreposé sous forme de tréhalose). Le milieu étant toujours favorable à la croissance des bactéries, ce relargage a pu contribuer à faire remonter le pH. Cependant, malgré ces conditions ( $\text{pH} > 6$ ), certaines levures ont pu résister en faisant appel à leurs réserves.

Au terme de ces essais, nous pouvons conclure que l'absence de contrôle du pH du milieu crée des conditions défavorables à l'activité et à la prolifération des levures ; d'où la nécessité de contrôler ce paramètre à un niveau pouvant assurer une croissance optimale des levures tout en inhibant celle des bactéries. Ces résultats confirment ceux de Paca (1980), qui a démontré qu'au cours d'un traitement sans contrôle du pH, l'activité métabolique des cellules décroissait à cause du ralentissement de la division cellulaire aux pH élevés. Les valeurs élevées de pH peuvent entraîner aussi une réduction de la production de biomasse par perte de l'azote ammoniacal (Doyle et De La Noüe, 1987).

A l'issu de cet essai, nous pouvons dire que les fluctuations du pH du milieu ont montré deux événements principaux dans l'utilisation métabolique de la source de carbone fermentescible: une acidification couplée à la consommation du sucre, et une alcalinisation consécutive à l'épuisement du sucre dans le milieu.

Puisque les glucides en étant métabolisés en acides peuvent contribuer à faire baisser le pH du milieu (Owen, 1989), nous avons vérifié l'effet du substrat carboné sur l'évolution du pH.

Nous avons pour se faire vérifié si le perméat de lactosérum (lactose) et le sucrose avaient le même impact sur l'activité des levures et leur capacité d'abaisser le pH du milieu. L'expérience consistait à alimenter le bioréacteur au départ avec ces sucres (l'un ou l'autre et non les deux à la fois), et de suivre la variation du pH au cours de la fermentation. Notons que le bioréacteur était alimenté avec du sucrose à 5% sans autre facteur de croissance.

Les figures 3.3a et 3.3b rapportent l'évolution du pH et de la température du milieu en régime *fed batch*. Il s'agit pour la figure 3.3a, d'un milieu constitué de perméat de lactosérum non additionné de lisier ; on y observe une légère augmentation du pH pendant les quatre premières heures, puis une baisse avant d'atteindre un plancher de 2,0 au bout de 10 heures.

Quant à la figure 3.3b qui illustre le déroulement d'une fermentation sans lisier de porc mais avec du sucrose au lieu du lactose, on y observe dès le départ une baisse de pH qui va atteindre très rapidement le plancher de 2,95 c'est à dire 5 heures environ après le début de l'expérience.

Ce qui s'est traduit par une intense prolifération des levures ( $1,2 \times 10^6$  à  $3,1 \times 10^8$  levures/ml) laquelle était de toute évidence favorisée par les conditions acides du milieu. C'est que les levures ont dû utiliser les acides aminés et les sucres du milieu composé essentiellement de sucrose et du produit de relargage du contenu cellulaire suite à la lyse pour proliférer tout en produisant au passage du gaz carbonique, ce qui a contribué à maintenir les valeurs du pH à la baisse.

La figure 3.3b montre presque une stabilisation de la température pendant les deux premières heures de la fermentation puis une remontée jusqu'à  $34,5^\circ\text{C}$  au bout de 5 heures. Ce qui pourrait s'expliquer par une forte activité métabolique qui accroîtrait la température du milieu.

Dans la figure 3.3a par ailleurs, cette activité métabolique s'est manifestée plus rapidement c'est à dire environ 2 heures après le début de l'expérience pour atteindre son point culminant de  $34,8^\circ\text{C}$  après 8 heures. Par la suite, la température a baissé jusqu'à  $32,1^\circ$  (résultat à 10 heures). Ce comportement pourrait s'expliquer par un ralentissement majeur de l'activité métabolique par épuisement des nutriments nécessaires à la prolifération des levures.

Au total, nous pouvons dire que la culture de levures dans le fermenteur se comporte de façon relativement analogue en présence de lactose ou de sucrose comme source de sucres fermentescibles. Dans les deux cas, le pH baisse et l'activité métabolique, telle que mesurée par l'augmentation de la température augmente. Nos résultats sont donc tout à fait conformes à ceux de Owen (1989). C'est dire que le perméat de lactosérum, et plus particulièrement le lactose qu'il contient, constitue un bon substrat pour agir sur le pH dans le sens que nous souhaitons.

## 2 Immobilisation des cellules sur supports

Les concentrations de levures observées sur les supports (par  $\text{cm}^2$ ) étaient aussi élevées que celles observées dans le milieu de culture (par ml) aussi bien après 12 jours qu'après 45 jours de fermentation (tableau 3.2). Ce qui indique une très bonne stabilité du système.

Cependant, à  $t = 45$  jours, on note une baisse de 2 log de la flore totale immobilisée sur les supports (qui renferme aussi bien des bactéries provenant du lisier que des levures); on observe aussi une baisse d'un  $\frac{1}{2}$  log de la population microbienne en suspension dans le milieu à cause vraisemblablement du contrôle du pH à 4,5. Dans le même temps, on assiste à une augmentation (de 2 log) du nombre de levures sur les supports et dans le milieu. Il convient de signaler ici qu'au cours des 12 premiers jours de fermentation, le pH n'était pas contrôlé; les levures étaient ainsi moins favorisées que les bactéries puisque le pH à l'équilibre était de 6,85. D'où la dominance des bactéries dans la flore totale par rapport aux levures à  $t=12$  jours.

Après 45 jours de fermentation, la flore totale (constituée de levures et de bactéries) immobilisée sur les supports était de  $2 \times 10^9$  ufc/ $\text{cm}^2$  et la population de levures de  $3,6 \times 10^8$  ufc/ $\text{cm}^2$ . En regard de ces valeurs, il apparaît que le nombre de bactéries est supérieur à celui des levures, soit 5 fois ( $2000 - 360$  ufc/ $\text{cm}^2$ ) plus de bactéries que de levures. Ce qui signifie  $1,64 \times 10^9$  bactéries immobilisées par  $\text{cm}^2$  de surface de supports. Néanmoins, en tenant compte du fait que les diamètres moyens d'une bactérie et d'une levure sont respectivement de  $1\mu$  et  $5\mu$ , le volume occupé par chacun de ces micro-organismes immobilisés sur les supports peut se calculer selon la formule suivante :  $V = (4/3)\pi (D/2)^3$ .

La seule variable dans cette formule étant le diamètre  $D$ , le volume occupé par une bactérie serait donc de  $0.524 \mu^3$  ( $0.524 \times 10^{-3}$ ) et celui d'une levure de  $65.45 \mu^3$  ( $0.524 \times 5^3$ ). En terme de quantité de biomasse, une population de levure de  $3.6 \times 10^8$  équivaut à un nombre  $4.5 \times 10^{10}$  bactéries ( $3.6 \times 10^8 \times 125$ ). Il apparaît donc qu'il y a 22 fois plus de biomasse de levures que de biomasse bactérienne même si, en terme de nombre, il y a moins de levures. Ces résultats suggèrent que malgré des conditions de culture favorisant la croissance des levures, les contaminants bactériens provenant aussi bien du lisier que de l'air ambiant y trouvent un milieu favorable à leur prolifération.

La flore totale en suspension dans le milieu ( $8.5 \times 10^8$  ufc/ml ) à  $t=45$  jours est comparable au niveau de contamination observé dans des levures commerciales de boulangerie produites dans des conditions plus aseptiques que les nôtres (Reed, 1982). En effet, le niveau normal de contamination bactérienne dans les produits commerciaux est généralement de  $10^6$  ufc/g n'exède pratiquement jamais des niveaux de  $10^8$  ufc/g.

L'avantage de conserver une biomasse active de levures sur les supports est de maintenir une densité élevée de cellules actives au cours de la fermentation, même dans les situations où la croissance cellulaire n'est pas favorisée. Ainsi, l'on travaille avec la même «colonie» de levures dont l'implantation sur les supports fixes confère une certaine stabilité au système.

### 3 Fluctuation du niveau d'oxygène dissout en réponse au débit d'alimentation

La figure 3.4a présente la courbe de variation de l'oxygène dissout ( $O_2D$ ) de la culture en présence de perméat de lactosérum seulement, à une température variant entre 32.3 à 35.7 °C, et à un pH entre 6,74 et 2,01. Cette courbe peut être divisée en trois phases. Une chute rapide de 6,4 à 1,6 ppm (mg/L), suivie d'un plateau se maintenant à 1.6 ppm pendant 4 h avant une hausse marquée entre 12 et 16 h. La réduction de la teneur en  $O_2D$  est l'indice d'une grande activité microbienne et la rapidité avec laquelle l'oxygène est utilisé dépend de la vitesse de croissance, du nombre de cellules et de l'état physiologique des levures (Jacob, 1970). La concentration en oxygène tend à se stabiliser autour de 1.6 ppm.

A cette concentration, les micro-organismes sont très actifs sur le plan métabolique puisqu'on note une certaine stabilisation (équilibre dynamique) dans la concentration d'oxygène dissout: le plateau observé peut s'expliquer par un état d'équilibre entre la consommation de l'oxygène par les micro-organismes et l'oxygène nouvellement dissout dans le milieu.

Cette observation est confirmée par les travaux de Brown (1970) qui soutiennent que la concentration en  $O_2D$  est inversement proportionnelle à celle de la matière organique et qu'on atteint une stabilisation au point d'équilibre. Celui-ci est atteint à 1.6 ppm dans notre situation lorsque le pH se situe dans la zone de 4,0. Cet état indique qu'il y a encore de l'oxygène disponible dans le milieu et que les cellules sont vraisemblablement en déficit de substrats pour utiliser ce surplus d'oxygène, d'où la remontée rapide du niveau d'oxygène dissout correspondant à un épuisement du substrat carboné et/ou à des conditions environnementales non favorables à la croissance (pH critique ou autre raison).



la courbe de l'évolution de l'oxygène dissout de la figure 3.4a tout comme celle des figures 3.5a, 3.6a et 3.7a sont des courbes types. En effet, des essais répétés dans les mêmes conditions, ont donné des courbes de même allure. Ces variantes sont présentées aux figures 3.4aa, 3.5aa, 3.6aa, et 3.7b dans le texte.

Quant au pH, il baisse continuellement jusqu'au niveau plancher de 2,0 après 14 heures de fermentation, puis il remonte à 5,35 après 16 heures. Ici aussi, on pourrait expliquer cette baisse par la production de gaz carbonique; la hausse résulte probablement du fait que la source de carbone fermentescible s'était raréfiée dans le milieu (figure 3.4b) et que les levures furent contraintes de métaboliser les acides disponibles.

Lorsque nous avons introduit du lisier dans le bioréacteur contenant déjà du perméat de lactosérum en fermentation, nous avons observé des modifications importantes dans le comportement de la culture. En effet, rappelons qu'avec le perméat seul, le pH baissait considérablement tant et aussi longtemps qu'on notait des traces de sucre dans le milieu en fermentation (figure 3.3a et 3.4a). Ce n'est qu'après épuisement du substrat carboné que le pH remontait. Avec l'apport du lisier, on assiste plutôt à une stabilisation du pH et à une tendance continue à sa remontée; ce qui nécessite un apport plus important d'acide pour neutraliser le milieu et maintenir le pH au niveau souhaité (4,5).

Précisons cependant qu'il existe des bactéries acidophiles comme les bactéries lactiques qui peuvent survivre et être en compétition avec les levures à ces pH acides; mais à des pH inférieurs à 3,5, seules certaines bactéries aux caractéristiques physiologiques très particulières (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Leuconostoc*,...) seraient actives dans la conversion d'éthanol ou d'acides organiques en acide acétique et autres métabolites en conditions aérobies.

Fort heureusement, les bactéries lactiques ne sont pas des aérobies strictes. La forte aération du milieu de fermentation ne serait donc pas favorable à leur multiplication.

Pour ces raisons, et en tenant compte du but visé qui est de produire une biomasse de levures, il est important de maintenir le pH à un niveau défavorable à la prolifération des bactéries et de maximiser le taux d'utilisation des substrats en maintenant la concentration d'oxygène dissout à un niveau positif aussi bas que possible (très légèrement au dessus de 0 ppm).

La figure 3.5a présente ainsi la courbe d'utilisation de l' $O_2D$  en présence du perméat de lactosérum et du lisier de porc dans une proportion de 50%-50%, le pH variant de 4,9 à 3,6 suivant le temps de fermentation. La courbe de l'évolution de l'oxygène dissout de la figure 3.5a se comporte comme celle de la figure 3.4a à la différence cependant que le plateau a été observé à 0.4 ppm au lieu de 1.6 ppm et a duré 8 heures au lieu de 4 heures ; l'équilibre entre la consommation d'oxygène par la culture de levures et l'oxygène disponible dans le milieu a donc duré plus longtemps. Ceci témoigne d'une meilleure utilisation de l'oxygène et par conséquent des substrats assimilables que lors la fermentation précédente. Cette assertion est soutenue par Smith et Evans, 1982 qui rapportent que la demande en énergie pour le traitement aérobic du lisier de porc est réduite lorsque le niveau d' $O_2D$  dans le milieu est aussi bas (0.1 ppm par exemple) que possible et que l'efficacité d'utilisation de l'oxygène est plus grande quand l'oxygène dissout est ainsi minimal. Abondant dans le même sens, Doyle et De La Noüe (1987) rapportent qu'autour de 0 ppm, les populations aérobies du lisier de porc se développent effectivement très rapidement. La remontée de l'oxygène dissout qui suit immédiatement après, traduit une plus forte présence d'oxygène dans le milieu suite à un épuisement des substrats.

Même s'il laisse paraître une certaine fluctuation, le pH se maintient ici entre 3.8 et 4.9. Il faut dire que nous le contrôlions manuellement par des ajouts fréquents d'acide chlorhydrique afin de tenter de maintenir à 4.5. Cette fluctuation peut s'expliquer par les imperfections du contrôle manuel puisque nous réagissons après coup au niveau du pH affiché. Cette façon de contrôler le pH mérite une amélioration.

#### 4 Détermination de la vitesse optimale d'alimentation

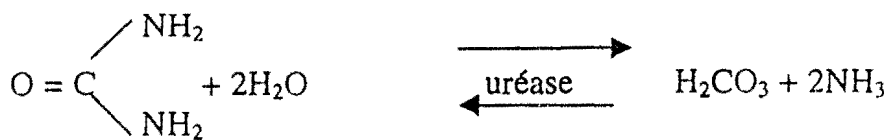
Précisons d'entrée de jeu que tous les résultats obtenus jusqu'à présent ont été réalisés en mode *batch* et que, désormais, toutes les expériences seront conduites en mode *fed-batch* c'est à dire avec une alimentation continue du bioréacteur, sans soutirage, dans un espace de temps donné.

C'est pour déterminer la vitesse d'alimentation correspondant aux objectifs que nous nous étions fixés que ces essais ont été effectués. A quelle vitesse devons-nous alimenter le bioréacteur pour éviter les mauvaises odeurs? Les substrats (lisier/perméat) doivent être ajoutés à des débits prédéterminés qui ne doivent pas excéder la capacité de la culture de levures à en utiliser complètement les composantes métabolisables. Pour ce faire, nous avons donc contrôlé l'alimentation du bioréacteur en lisier et en lactosérum au moyen d'une pompe péristaltique à double tête dont la vitesse pouvait être ajustée au moyen d'un rhéostat. L'injection des substrats se faisait dans la partie supérieure de la colonne.

Pour y parvenir, et conformément aux résultats précédents, nous avons d'abord ajouté la source carbonée dans le fermenteur, puis attendu que les levures soient en pleine activité métabolique ( $O_2D=0.25$  ppm,  $T^{\circ}C=33.1$  et  $pH=3.25$ ) pour introduire le lisier dans le bioréacteur. Cette précaution a permis d'obtenir non seulement une culture de levures très actives mais également d'entraver le développement de la microflore provenant du lisier à cause des conditions acides du milieu soumis à la fermentation. Nous sommes partis d'un débit de 1 L/h pour un volume de départ d'environ 28 litres de milieu, que nous avons augmenté progressivement en tenant compte de l'équilibre ci-dessus mentionné entre les nutriments et le niveau d' $O_2D$ .

La figure 3.6 affiche le comportement de l'oxygène dissout et celui du pH dans le milieu lisier/perméat en fermentation. On peut voir que, dès le départ, l'oxygène dissout se trouvait à un niveau relativement bas (0.25 ppm), puisque la fermentation avait démarré avec le perméat seul afin d'abaisser le pH, et que ce dernier était à un niveau ( $< 4,5$ ) défavorable à la multiplication des microorganismes provenant du lisier à être ajouté. L'oxygène dissout affichait une valeur de 0.25 ppm après 120 minutes de fermentation avec le perméat uniquement. Il faut noter que cette valeur s'est stabilisée entre 120 et 140 minutes. Jusque là, le milieu ne comportait pas de lisier. C'est à la 140<sup>ème</sup> minute que nous avons commencé à introduire du lisier de façon progressive, d'abord à 1 L/h, ensuite à 3 L/h puis à 7 L/h. A chaque ajout de lisier, peu importe le débit d'alimentation, le niveau de l'oxygène dissout remontait. Cela était vraisemblablement lié au ratio carbone/azote qui avait tendance à fluctuer dans le temps en fonction de la concentration en azote ammoniacal du lisier (figure 3.6a).

Quant au pH, une baisse était observée dès le départ avant d'atteindre une certaine stabilité à 3,05 entre 210 minutes et 240 minutes. On observait ensuite une remontée jusqu'à 4,67 à la fin de la fermentation. La baisse du pH peut s'expliquer par la production de gaz carbonique et de certains acides organiques et inorganiques. Les fluctuations de pH du milieu en fermentation peuvent aussi s'expliquer par l'utilisation de l'urée provenant du lisier de porc. En présence de l'uréase des levures, l'urée est hydrolysée pour libérer le  $\text{NH}_3$ . Ce qui contribue à la remontée du pH. Par ailleurs l'assimilation de l'azote ammoniacal a pour effet d'abaisser le pH.



Urée

Or, lorsque nous avons cherché à déterminer les paramètres optimaux, nous nous sommes aperçus qu'à une certaine vitesse d'ajout des nutriments, le milieu de culture dégageait de fortes odeurs comparables à ce qui aurait pu se passer si nous avions été en mode de fermentation anaérobie. En fait, nous avons fait ce constat, lorsque nous avons opté pour un débit d'alimentation supérieur à 3 L/h (figure 3.6a). Toutefois, cet inconvénient a disparu quand nous avons réduit ce débit. Dans le premier cas, les cellules du milieu et celles immobilisées sur les supports de la colonne n'étaient pas en mesure de supporter toute la charge d'éléments polluants provenant du lisier. C'est cette incapacité d'assimiler et/ou d'oxyder complètement certains éléments volatils (acides gras volatils par exemple) du lisier qui contribue à générer des odeurs. Compte tenu de l'objectif que nous poursuivions, il est apparu évident qu'en procédant ainsi, nous ne pouvions alimenter le bioréacteur qu'à un débit n'excédant pas 3 L/h. Pour cette expérience et par mesure de sécurité, la vitesse d'alimentation du bioréacteur a été fixée à +/- 1.5 L/h en lisier.

Puisque certaines fromageries ne sont pas outillées pour ultrafiltrer leur lactosérum et générer du perméat, il est bon de chercher à connaître l'impact de la vitesse d'alimentation du bioréacteur si le perméat devait être remplacé par du lactosérum. Pour étudier ce phénomène, nous avons démarré l'alimentation simultanée du lisier et du lactosérum entier à 0,6 L/h pour un volume de départ d'environ 28 litres dans le bioréacteur. La concentration en O<sub>2</sub>D a subi une baisse, puis s'est stabilisée à 3.3 ppm après 1h 40 minutes de fermentation (figure 3.7a).

Le débit a donc été porté de 0,6 L/h à 1 L/h. Nous avons alors observé presque immédiatement une baisse drastique de l'O<sub>2</sub>D de 3.3 ppm à 0.75 ppm ; ce qui se rapproche du point de saturation en regard de la capacité des levures à oxyder complètement les substrats de manière à maximiser leur activité désodorisante. Ces résultats de la figure 3.7 confirment ceux de la figure 6 établissant la vitesse maximale d'alimentation tolérée par le bioréacteur à environ 1 L/h ( $D=0.03 \text{ h}^{-1}$  pour chacun des substrats).<sup>1</sup>

La courbe de pH sous ces conditions de fermentation se présente en dents de scie puisque nous agissions sur le pH au besoin, en ajoutant de l'acide chlorhydrique concentré dans le milieu. Mais puisqu'il ne s'agissait pas d'un contrôle automatique, le pH pouvait remonter au bout d'un certain temps au delà de la limite acceptable à cause du pH du lisier qui est neutre. Nous y rajoutions alors aussitôt de l'acide pour le faire baisser de nouveau et ainsi de suite.

<sup>1</sup> En pratique, le bioréacteur de 0,3 m de diamètre et 3,6 m de hauteur, permet de traiter 38,5 litres de lisier par jour. Une augmentation de son diamètre de 0,3 m à 1 m ( $0,3 \times 3,3$ ) permettra de traiter 419 ( $38,5 \times 3,3^2$ ) litres de lisier par jour. Une augmentation de sa hauteur de 3,6 à 6 m, ( $6/3,6 = 1,666$ ) en maintenant le diamètre à 1 m permettra de traiter 698 ( $419 \times 1,666$ ) litres de lisier par jour. Il suffirait donc de disposer de deux ou trois de ces bioréacteurs côte à côte, selon la grosseur de la porcherie, pour recycler tout le lisier produit.

### *III Conclusion partielle*

En somme, les résultats présentés dans ce chapitre ont permis d'établir la capacité du bioréacteur sélectionné à immobiliser efficacement les cellules de levures et à prévenir la formation de mousse qu'il s'agisse du perméat de lactosérum ou de lactosérum entier. Ils montrent également que le sucre aide à l'ajustement du pH du milieu et que la biomasse dans le bioréacteur se comporte de façon similaire, qu'elle consomme du lactose ou du sucrose.

Cependant, le système n'a pu tolérer qu'un débit d'alimentation de 1 L/h pour un volume de fermenteur de 30 litres environ, soit 24 L/jour. L'oxygène dissout disponible dans le milieu s'épuisait rapidement au delà de cette valeur (figure 3.7a). Autrement dit, on approchait rapidement de 0 ppm en tentant d'augmenter le débit d'alimentation. C'est dire que l'aération du système (à laquelle est lié le débit d'alimentation) reste perfectible. Une meilleure aération permettra une alimentation accrue. Il y avait donc lieu d'optimiser le système, de le rendre plus efficace essentiellement en améliorant sa capacité d'oxygénation.

Par ailleurs, l'utilisation de la température et de l'O<sub>2</sub>D comme outils de suivi de l'activité est simple et approprié. En outre, les fluctuations de température, du pH et d'O<sub>2</sub>D en fonction de l'évolution de la fermentation illustrent ce qui se passerait dans le cas d'installation simple (à la ferme) avec peu de contrôles.

Tableau 3.1. Évolution du pH, de la population de levures et de la température dans le perméat de lactosérum en fermentation

| Temps (jours) | Nombre de levures<br>(ufc/ml) | pH   | Température°C |
|---------------|-------------------------------|------|---------------|
| T = 0         | $6.8 \times 10^5$             | 6.14 | 20            |
| T = 2         | $3.6 \times 10^8$             | 4.06 | 35.8          |
| T = 4         | $4.2 \times 10^7$             | 4.18 | 32.08         |
| T = 6         | $6.0 \times 10^6$             | 6.85 | 33.3          |
| T = 8         | $5.5 \times 10^5$             | 8.2  | 32            |

Tableau 3.2. Détermination des concentrations de levures et de microorganismes immobilisés (dans la colonne) et en suspension (dans le milieu en fermentation) en fonction du temps

| Temps<br>de fermentation | Supports (ufc/cm <sup>2</sup> ) |                   | Liquide (ufc/ml)  |                   |
|--------------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                          | Flore totale                    | Levures           | Flore totale      | Levures           |
| 12 jours                 | $1.2 \times 10^{11}$            | $7.2 \times 10^6$ | $4.1 \times 10^9$ | $1.3 \times 10^6$ |
| 45 jours                 | $2.0 \times 10^9$               | $3.6 \times 10^8$ | $8.5 \times 10^8$ | $1.5 \times 10^8$ |



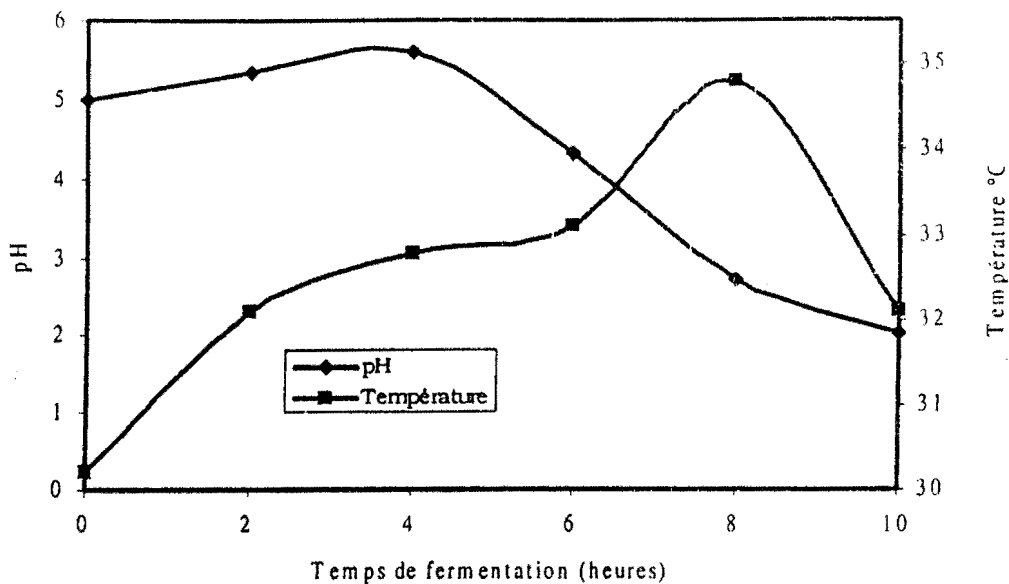


Figure 3.3a . Effet du perméat de lactosérum (20L) ajouté au milieu en circulation dans le bioréacteur à cellules immobilisées opéré en mode *batch* sur l'évolution du pH et de la température.

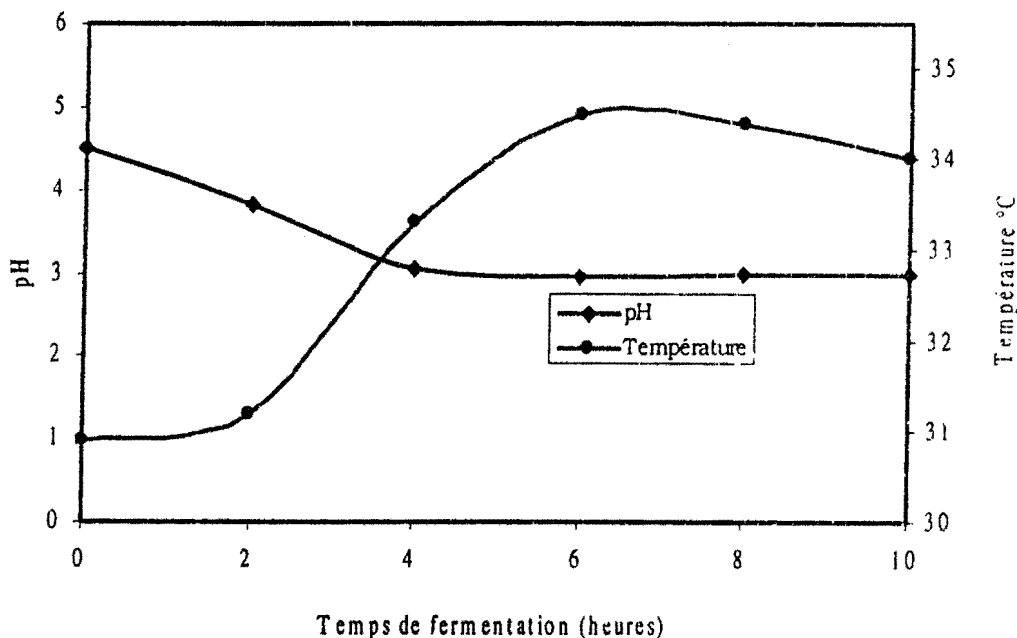


Figure 3.3b. Effet du sucrose ajouté au milieu en circulation dans le bioréacteur à cellules immobilisées opéré en mode *batch* sur l'évolution du pH et de la température.

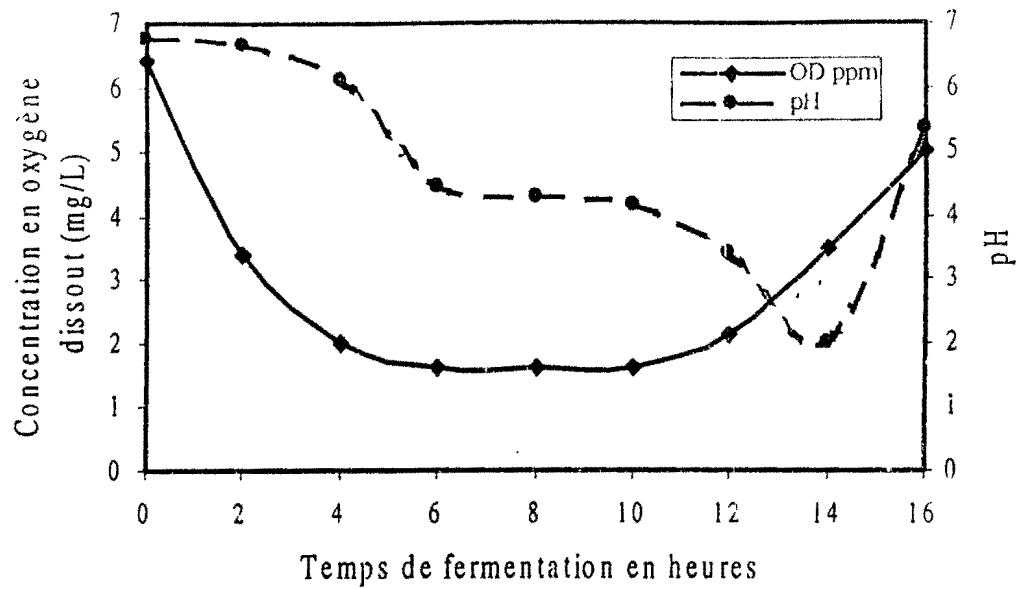


Figure 3.4a. Courbe de variation de la concentration en oxygène dissout du milieu à base de perméat de lactosérum en circulation dans le bioréacteur à cellules immobilisées et de celle du pH, à une température se situant entre 32.3 et 35.7°C

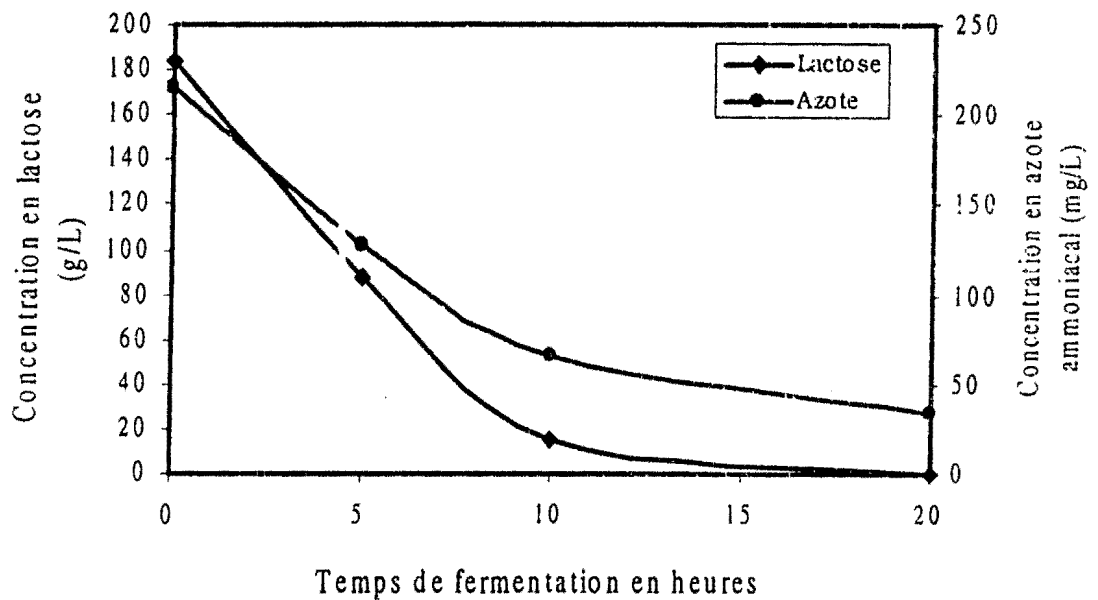
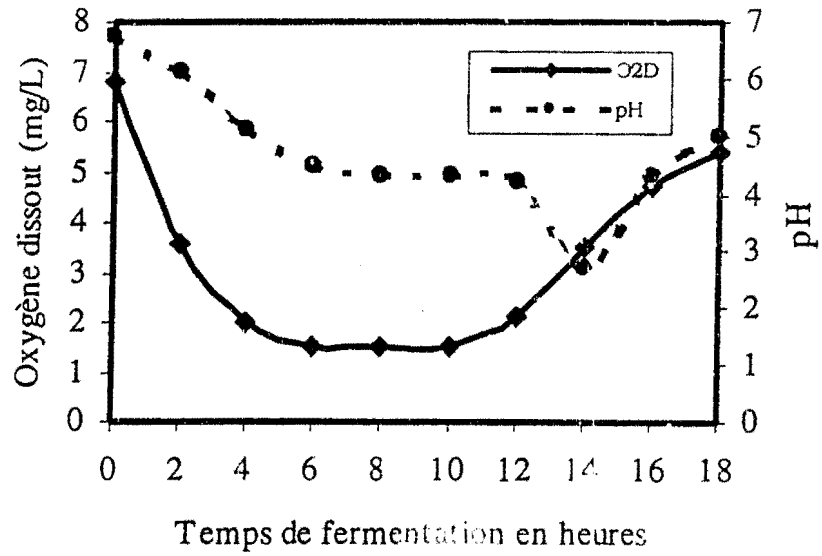
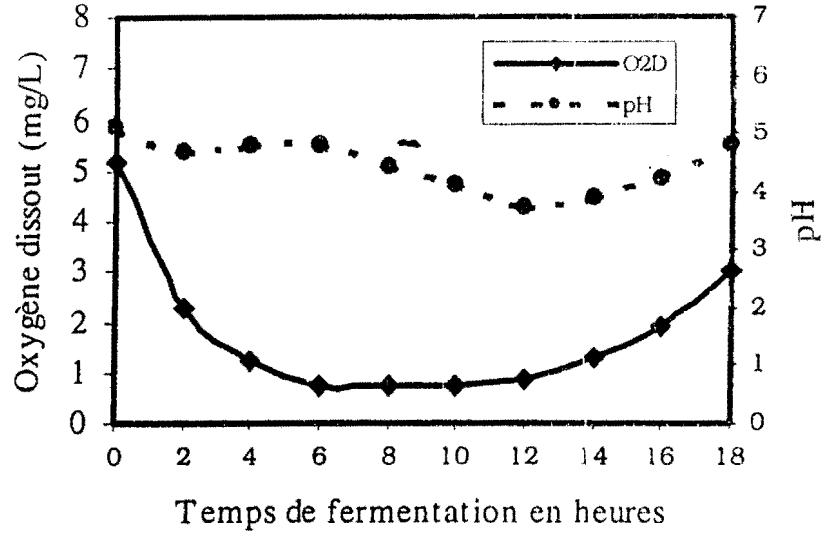


Figure 3.4b. Courbe d'utilisation du lactose et de l'azote ammoniacal du milieu à base de perméat de lactosérum en circulation dans un bioréacteur à cellules immobilisées et de celle du pH, à une température se situant entre 32.3 et 35.7°C



Figures 3.4aa. Courbe de variation de la concentration en oxygène dissout du Milieu à base de perméat de lactosérum en circulation dans le bioréacteur à cellules immobilisées et de celle du pH, à une température se situant entre 32.3 et 35.7°C

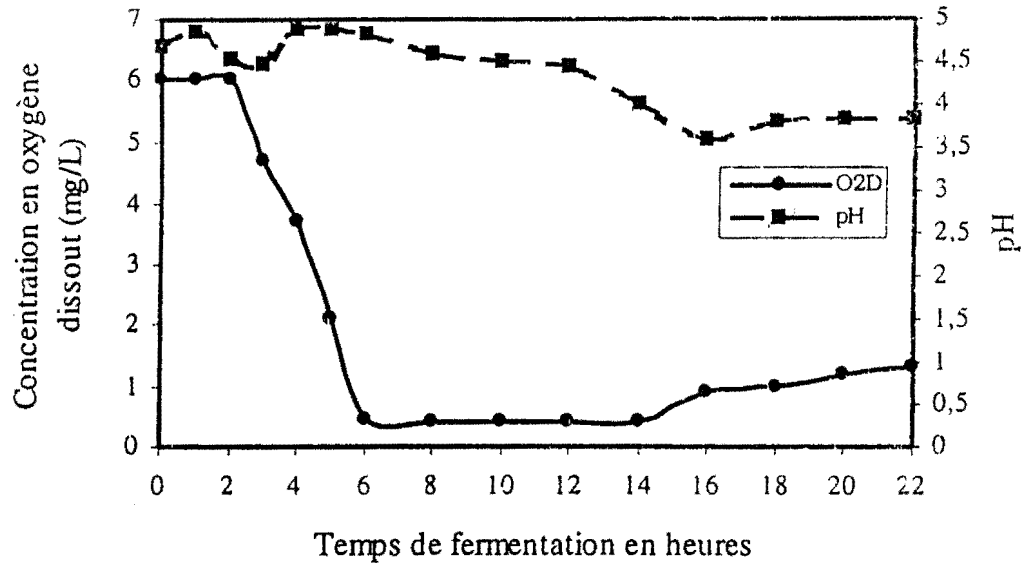


Figure 3.5a. Évolution de l'oxygène dissout et du pH au cours d'une fermentation de type *fed-batch* avec le milieu LP (15 L:15 L) dans le bioréacteur à cellules immobilisées à une température variant entre 30.5 et 32. 2°C.

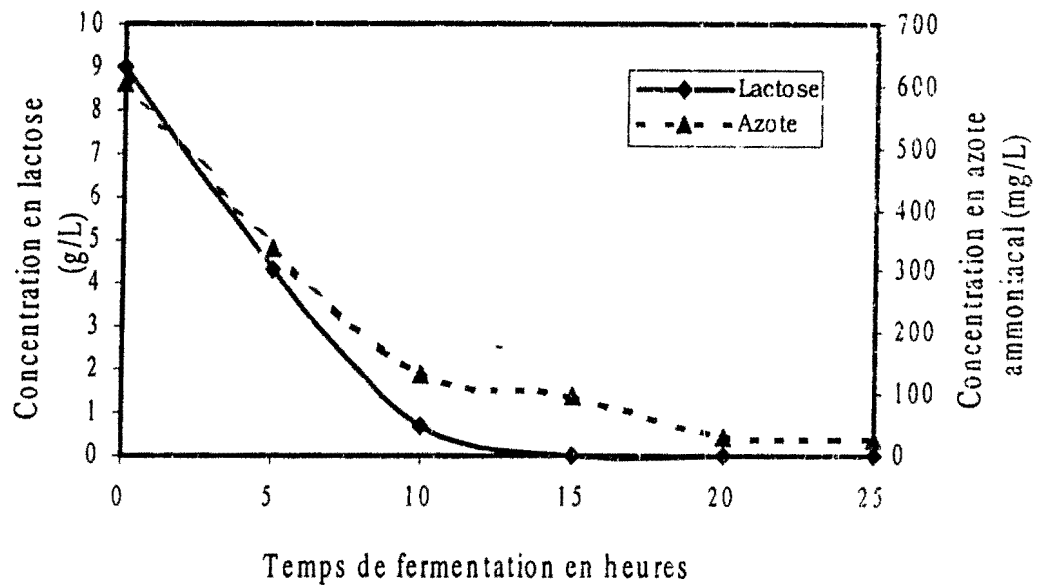
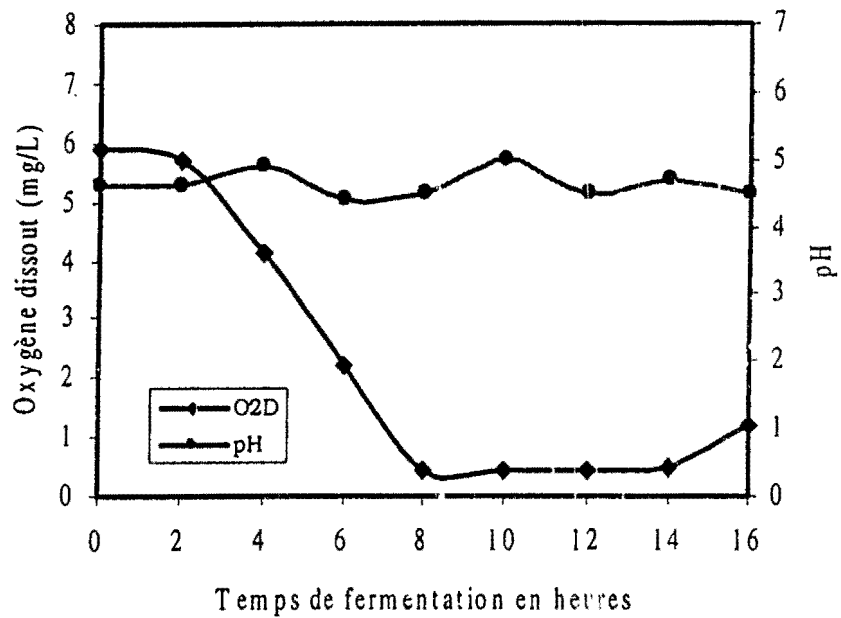
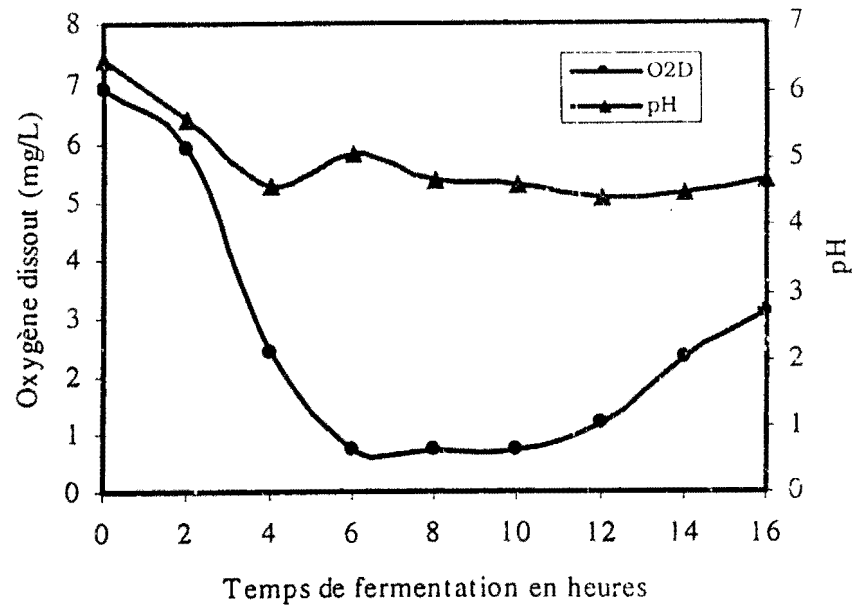


Figure 3.5b. Évolution de la concentration en lactose et en azote ammoniacal du milieu LP en fermentation dans le bioréacteur à cellules immobilisées à une température variant entre 30.5 et 32. 2°C.



Figures 3.5aa. Évolution de l'oxygène dissout et du pH au cours d'une fermentation de type *fed-batch* avec le milieu LP(15 L:15 L) dans le bioréacteur à cellules immobilisées à une température variant entre 30.5 et 32. 2°C.

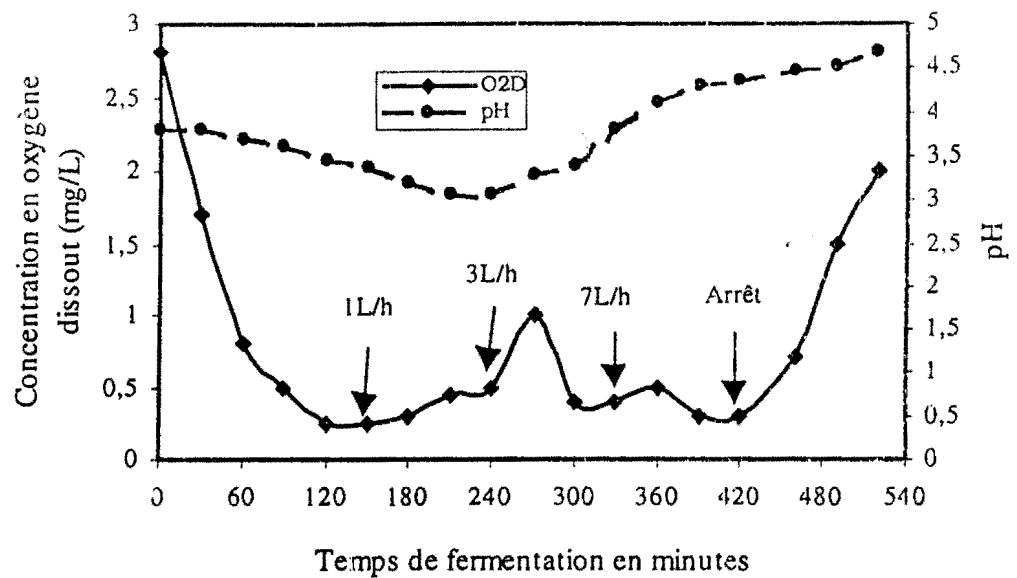


Figure 3.6a. Effet de l'augmentation du débit d'addition du lisier sur la concentration en oxygène dissout du milieu à base de perméat de lactosérum, et de l'évolution de son pH, à une température variant entre 31 et 33°C

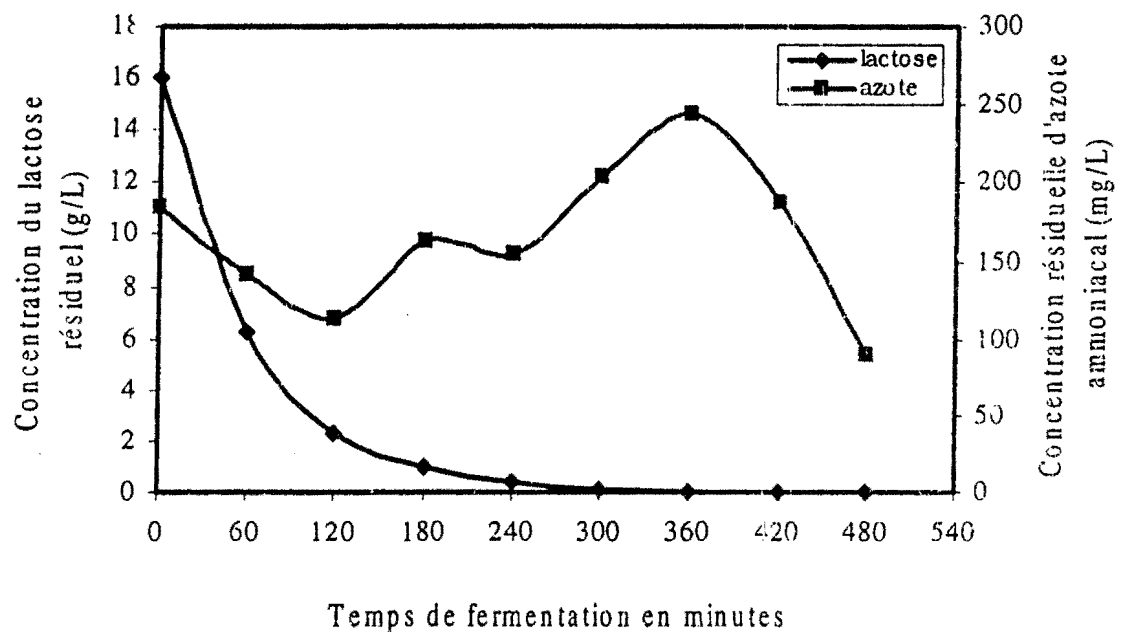


Figure 3.6b. Effet de l'augmentation du débit d'addition du lisier sur l'utilisation du lactose et de l'azote ammoniacal dans le milieu à base de perméat de lactosérum en fermentation, à une température variant entre 31 et 33°C.

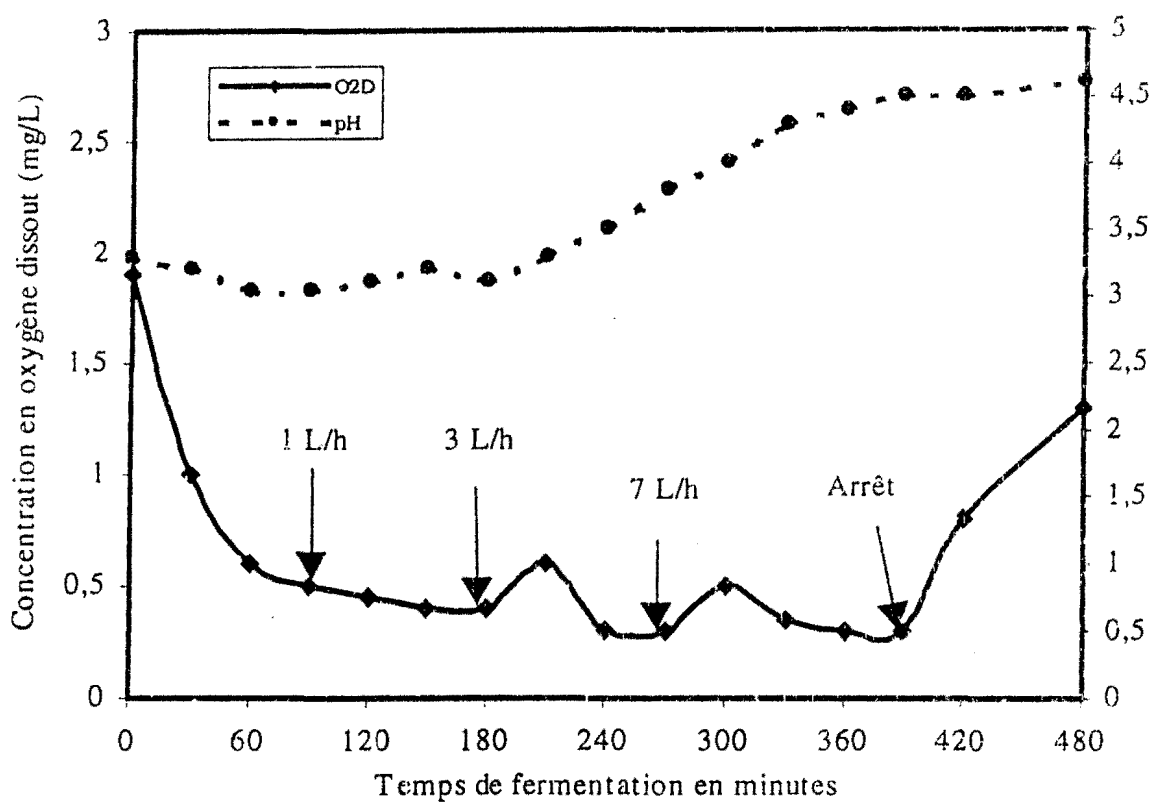


Figure 3.6aa. Effet de l'augmentation du débit d'addition du lisier sur la concentration en oxygène dissout du milieu à base de perméat de lactosérum, et l'évolution de son pH, à une température variant entre 31 et 33°C.

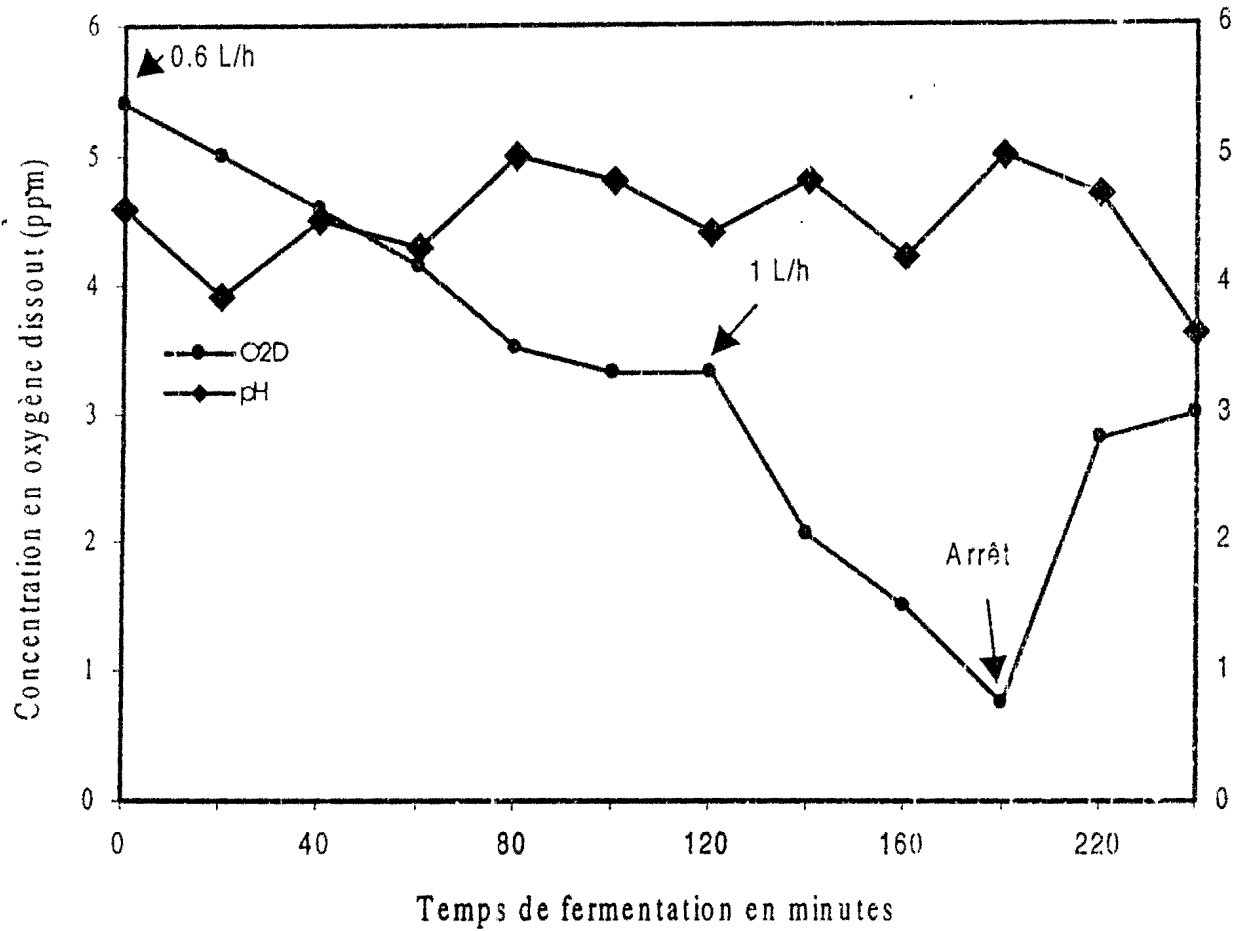


Figure 3.7a. Effet de l'augmentation simultanée du débit d'alimentation en lisier et en lactosérum entier, sur l'utilisation de l'oxygène dissout et le profil du pH du milieu en fermentation à une température variant entre 28 et 34°C.



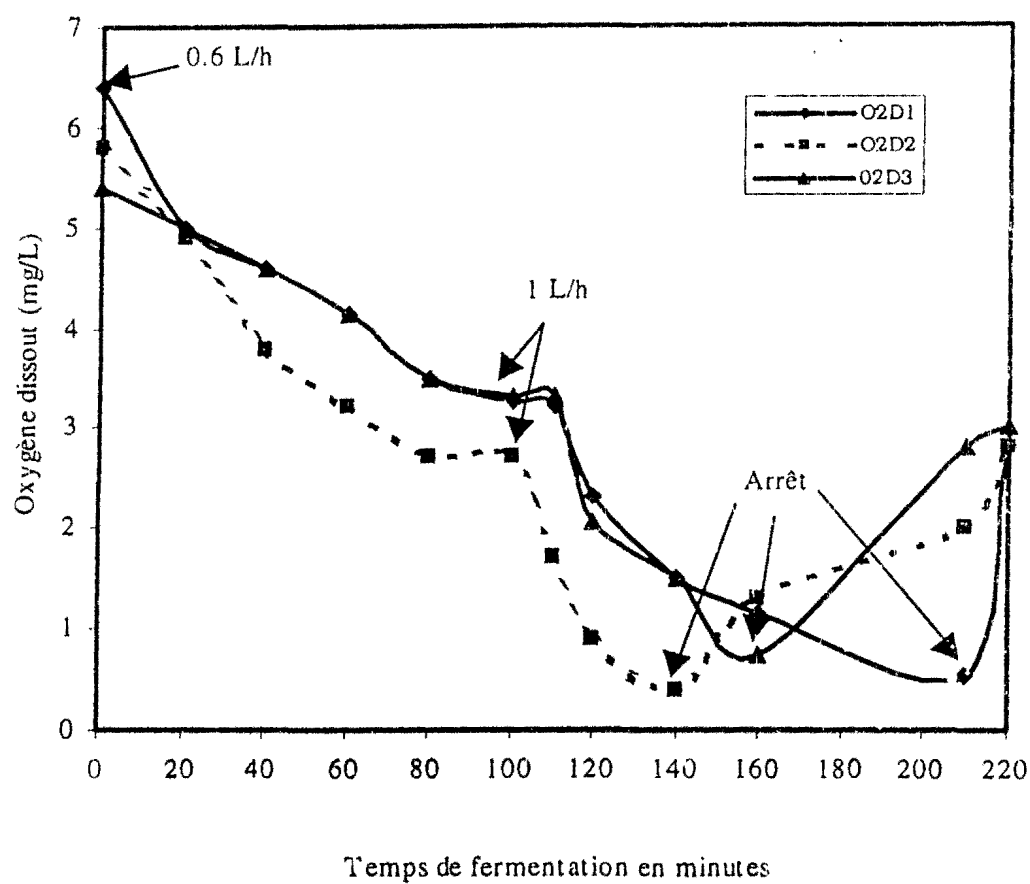


Figure 3.7b. Effet de l'augmentation simultanée du débit d'alimentation en lisier et en lactosérum entier, sur l'utilisation de l'oxygène dissout et le profil du pH du milieu en fermentation à une température variant entre 28 et 34°C.

## **CHAPITRE IV**

### **Optimisation du procédé de fermentation**

Le chapitre IV constitue le dernier de ce travail. Il est consacré à l'optimisation du procédé de fermentation et du bioréacteur dans le but d'assurer une meilleure performance globale. Il s'agit du même bioréacteur que celui du chapitre 3 mais avec quelques modifications destinées à permettre un fonctionnement plus efficace. Ainsi, il ne sera plus question d'une fermentation en *fed-batch* mais plutôt d'une fermentation en continu (voir 1.2.1, section 4 du chapitre I). Certains autres paramètres de contrôle ont aussi été retouchés pour satisfaire à l'objectif d'optimisation qui est assigné à ce chapitre. C'est le cas notamment du contrôle du pH, et de la vitesse d'alimentation et de recirculation du milieu.

## *1 Matériel et méthodes*

### 1 Matières premières

#### 1.1 Le lisier de porc

Le lisier de porc reste ce mélange liquide sans litière constitué d'urine et de déjections. Ici également, nous avons travaillé avec du lisier frais n'ayant pas plus de 3-4 jours d'âge pour respecter la contrainte que nous nous étions fixé au départ, c'est à dire de pouvoir épuiser le lisier au fur et à mesure de sa production. Rappelons que le lisier provient toujours de la porcherie Orléans (Ste-Famille, I. O.).

#### 1.2 le perméat de lactosérum

La source de carbone utilisée pour compléter le lisier était constituée seulement de perméat de lactosérum liquide provenant de l'ultrafiltration du lactosérum de la ferme SMA comme au chapitre précédent.

### 1.3 Levures

Le lisier de porc et le perméat de lactosérum sont fermentés au moyen d'une culture de la levure *K. marxianus* à cause de son aptitude à utiliser le lactose et à se développer abondamment dans un milieu composé de lisier et de perméat (chapitre 2, 3). Cette culture avait été préalablement fixée sur les supports internes du bioréacteur (chapitre 3, figure 2c).

### 1.4 Neutralisant

Le neutralisant utilisé pour les besoins de ce chapitre était également de l'acide chlorhydrique mais dilué de moitié (6N) cette fois. Toutefois à la différence du chapitre 3 où l'ajout d'acide s'est effectué manuellement et au besoin, ici, l'addition s'est faite de façon automatique au moyen d'un contrôleur automatique de pH.

### 1.5 Les bioréacteurs

Le bioréacteur à cellules immobilisées testé au chapitre précédent a révélé certaines limites (au niveau du débit d'alimentation et de la production de mousse). Aussi, pour des raisons de performance en regard de l'efficacité de dissolution d'oxygène et de la productivité (Bui et Galzy., 1990), nous avons procédé à des essais supplémentaires d'optimisation du bioréacteur et du régime de fermentation. Trois types de bioréacteurs présentant des types et arrangements de supports internes différents ont été testés (figure 4.1).

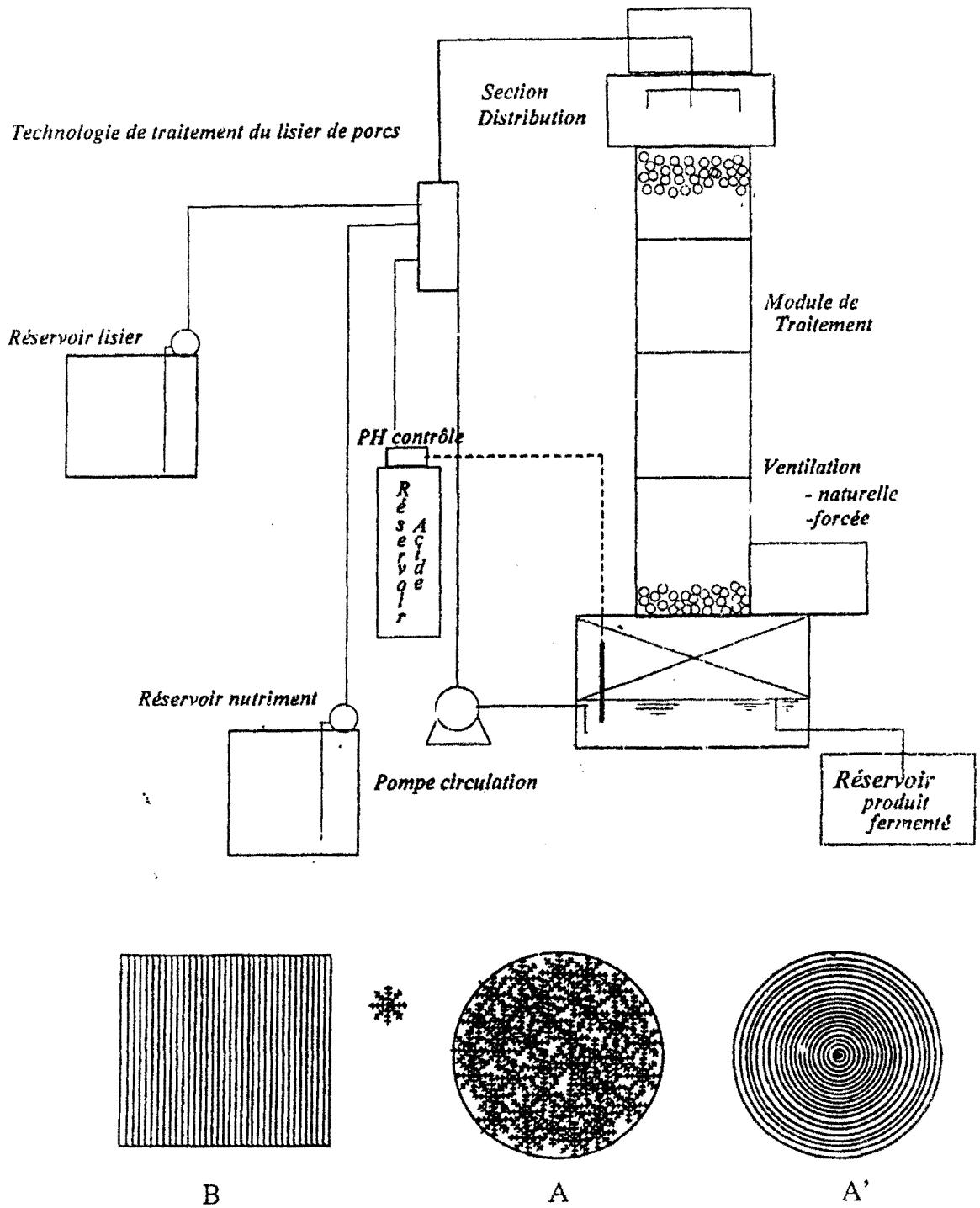


Figure 4.1. Schéma du bioréacteur et illustration des configurations internes (A, A' et B)

En effet, on avait disposé dans le bioréacteur B de forme carrée ( $15.6 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ), à la verticale, sur toute la longueur intérieure, des feuilles de moustiquaires ou treillis ajouré de  $0.16 \text{ cm} \times 0.16 \text{ cm}$  en fibre de verre recouvert de PVC permettant la fixation des levures sur le support et l'aération, les unes parallèlement aux autres. Quant aux bioréacteurs A et A' que nous avons testés, ils avaient en commun d'être des cylindres mais avec une configuration intérieure différente. L'intérieur du bioréacteur A' a été garni du même type de moustiquaire que B, à la différence que cette fois-ci, il s'agissait d'un enroulement spirale disposé à la verticale, et occupant tout l'espace intérieur du bioréacteur. Dans le bioréacteur A, le moustiquaire a cédé la place à des supports plastiques (figure 3.2c, chapitre 3 mais illustrés dans le présent chapitre à la figure 4.1 A) faits de PVC (Oxyd'H<sub>2</sub>O, Longueuil, Québec) de nature à favoriser une meilleure aération, tout en offrant un cadre propice à la fixation et à la multiplication des levures.

Ces supports étaient disposés verticalement et occupaient tout l'espace interne de la colonne. Il est à noter que quelque soit leur configuration interne, les bioréacteur A, A' et B avaient la même hauteur, soit 1,2 mètre et étaient posés sur une cuve contenant le milieu liquide en recirculation. Nous avons testé les trois bioréacteurs pour vérifier lequel offrait, à une vitesse de recirculation donnée, la meilleure efficacité de dissolution d'oxygène.

#### 1.5.1 Description et fonctionnement du bioréacteur sélectionné

Le bioréacteur retenu pour la poursuite des essais était une colonne circulaire (figure 1 A) posée sur une cuve (92 cm de long sur 61 cm de large et 71 cm de haut) faite de polyéthylène haute densité et destinée à recevoir le milieu liquide en recirculation. Nous avons limité sa capacité à 30 litres même si la cuve pouvait en contenir davantage.

La colonne contenait des supports rigides en PVC (Oxyd'H<sub>2</sub>O) disposés verticalement et occupant tout l'espace interne de la colonne. Ces supports sont les mêmes que ceux utilisés au chapitre précédent.

La circulation du milieu soumis à la fermentation était assurée par une pompe centrifuge (moteur 1hp) à haut débit pour favoriser le mélange efficace de tous les ingrédients du milieu (lisier de porc, perméat de lactosérum, neutralisant, levures) de même que l'aération du milieu. C'est précisément dans le réarrangement de la disposition des éléments dans l'espace interne de la colonne que se trouve le réaménagement léger mais déterminant apporté au bioréacteur.

La colonne ici est également reliée dans sa partie supérieure à une pompe péristaltique bicéphale et à vitesse variable, connectée respectivement au réservoir contenant le lisier ainsi qu'à celui contenant le perméat de lactosérum.

## 2 Méthodes

### 2.1 La fermentation en continu

Notre objectif étant de produire un milieu le plus riche possible en levures dans des conditions requérant un minimum de ressources et de surveillance, il a fallu choisir un régime de fermentation qui soit compatible avec le fonctionnement journalier d'une porcherie pour produire suffisamment de levures dans le milieu. La discontinuité des fermentations de type *batch* et *fed-batch* imposait un cycle de croissance aux levures (croissance, stabilisation, décroissance). Il fallait donc procéder autrement pour supprimer la phase de décroissance des levures.

Et c'est la méthode de la fermentation en continu qui nous a semblé la meilleure solution puisqu'avec elle, la croissance des levures est maintenue dans sa phase exponentielle. Il convient d'ajouter que l'efficacité de la méthode de fermentation en continu est également liée à d'autres paramètres qui, s'ils ne sont pas respectés, sont susceptibles de la compromettre. C'est le cas du pH d'une part et de la vitesse d'alimentation d'autre part. Par ailleurs, nous avons également cherché à maîtriser la production de la mousse.

### 2.1.1 pH

Le dispositif de distribution automatique d'acide est fait d'un contenant rempli d'acide chlorhydrique 6N, relié à un contrôleur automatique de pH (Hanna instruments pH controler, Italy), lui même muni d'une électrode combinée (Combination pH electrode (Fisher Scientific)) et d'une pompe (Watson Marlow 501 U, Falmouth, England).

Le point de consigne était fixé à pH 4,4 de manière à prévenir la prolifération de bactéries pathogènes et à favoriser le développement des levures par rapport aux bactéries apportées par le lisier. La quantité moyenne d'acide requise pour contrôler le pH du milieu en fermentation est le résultat d'au moins 6 répétitions.

### 2.1.2 Aération



### 2.1.2.1 Comparaison de l'efficacité de l'aération de trois bioréacteurs

Pour déterminer l'efficacité d'aération des trois bioréacteurs, nous avons soumis à trois reprises chacun d'entre eux à différentes vitesses de recirculation (20L/mn, 36L/mn et 50L/mn), en utilisant l'eau (50 litres) comme substrat, afin de mesurer leur impact sur la rapidité de dissolution d'oxygène dans le milieu en recirculation (tableau 4.1). Il faut préciser ici que l'apport d'air (aération) dans le milieu s'est fait naturellement.

Autrement dit, c'est l'air ambiant qui aéraie le milieu circulant en couche mince sur les supports disposés verticalement. Aussi, nous n'avons pas eu à déterminer de  $v/v/m$  (volume d'air/volume de milieu/minute).

### 2.1.3 Le débit d'alimentation du bioréacteur

Le taux de dilution ( $D$ ) est défini par l'équation  $D = F/V$  où  $F$  représente le débit d'alimentation d'un bioréacteur de type chémostat et  $V$  son volume utile. Cette valeur permet d'apprécier l'efficacité d'un bioréacteur lorsque la culture atteint l'état d'équilibre (*steady state*). Le débit d'alimentation d'un bioréacteur est le paramètre clé qui permet de déterminer ce taux de dilution. Dans la pratique, un taux de dilution est ajusté à  $0.1-0.2 \text{ h}^{-1}$  pour des cultures continues de levures (Vasey et Powell, 1984).

Dans le chapitre précédent, nous avons souligné l'importance et la pertinence d'une bonne maîtrise du débit d'alimentation dans une fermentation de manière à prévenir des conditions d'anaérobiose (déficit en oxygène dissout) pouvant entraîner la formation d'odeurs indésirables.

Or, à ce moment là, nos essais étaient conduits en mode *fed-batch*. Puisque le mode d'alimentation d'un fermenteur en continu est tout à fait similaire à celui du *fed-batch* mais que le volume du milieu en fermentation est moindre puisqu'il est maintenu constant par un soutirage en continu, il devient nécessaire de vérifier les conditions d'aérobiose qui sont maintenues et si la productivité du bioréacteur ne peut pas être améliorée. Pour connaître la vitesse d'alimentation compatible avec nos objectifs d'optimisation, nous avons utilisé une pompe d'alimentation péristaltique (Master flex, model L/S tube 15) bicéphale à litrages gradués par pourcentage.

Une des deux têtes de cette pompe était reliée à un réservoir à lisier et l'autre à un réservoir de perméat de lactosérum. Cette pompe nous permettait d'introduire simultanément et à un débit ajustable, une quantité donnée des différents substrats dans le ratio prédéterminé (1:1), correspondant à un ratio C :N de 10 :1. Une sonde à oxygène dissout ( $O_2D$ ) immergée dans le milieu permettait d'ajuster les débits de manière à ne pas créer de conditions anaérobies ( $O_2D \leq 0$ ). Elle nous a permis de suivre en temps réel, le niveau d'oxygène dans le milieu en fonction du débit d'alimentation décidé.

La stabilisation du niveau d' $O_2D$  après des modifications du taux d'alimentation en lisier et en substrat carboné s'effectuait sur une période de 10 minutes environ : la courbe présentait une allure exponentielle avec une pente variant constamment et tendant vers 0.

L'ajustement de la vitesse d'alimentation se faisait donc en augmentant graduellement la vitesse de pompage des substrats jusqu'à ce que le niveau d' $O_2D$  se stabilise à une valeur légèrement au dessus de 0.

Le milieu fermenté était soutiré par gravité au moyen d'un trop plein qui permettait de garder le volume de la cuve du réacteur au même niveau. Rappelons que l'oxygénation du milieu était assurée par l'écoulement en film mince du milieu sur les supports de plastique disposés verticalement à l'intérieur du bioréacteur. Une pompe centrifuge (moteur 1hp) assurait la recirculation du milieu. La seule énergie requise pour l'aération était donc celle nécessaire pour pomper le milieu du réservoir de réception à la tête du bioréacteur.

C'est cette procédure qui a permis de déterminer que le débit optimal d'alimentation pour le bioréacteur (en tenant compte des autres paramètres préalablement fixés), se situait à 1,6 litre pour chacun des substrats (lisier et perméat)/heure/30L de milieu en fermentation soit un  $D = 0.11 \text{ h}^{-1}$ . L'évolution de l'oxygène dissout mesurée plusieurs fois à partir de fermentations répétées dans le temps a permis d'obtenir les résultats des figures 4.4, 4.5a, 4.8, 4.9 et 4.10a.

#### 2.1.4 La mousse

Lorsque la fermentation était menée en mode *fed batch*, nous avons observé à certains moments une production plus ou moins importante de mousse. Cette dernière a pour effet de limiter la circulation de l'air dans le bioréacteur et de concentrer une partie de la biomasse de levures, donc de limiter aussi la production de biomasse levurienne. Il fallait donc utiliser un antimousse, ce qui entraînait des coûts supplémentaires (système de contrôle et produit antimoussant).

Nous avons donc cherché une solution qui, tout en réduisant significativement la production de mousse, supprimait les coûts liés au contrôle de la mousse. Nous avons trouvé la solution dans la maîtrise du pH, c'est à dire en travaillant à un  $\text{pH} \leq 4,5$ . Cette solution qui n'avait pu être vérifiée au chapitre précédent (chapitre 3) a été rendue possible quand nous avons opté pour le contrôle en continu du pH. En effet, avec cette méthode, le réglage du pH à 4,4 permettait d'éliminer presque complètement la production de mousse.

## 2.2 Le produit de la fermentation

### 2.2.1 Teneur en levures du produit fermenté

Le dénombrement des levures a été réalisé au moyen d'un hématimètre après une dilution au  $1/100^{\text{e}}$  mais aussi par ensemencement sur gélose Potato Dextrose Agar (PDA). Comme au chapitre 2 (section 2.1), les résultats de dénombrement des micro-organismes sont ceux des valeurs moyennes des échantillons analysés en duplicata à partir des fermentations réalisées.

### 2.2.2 Caractéristiques chimiques

Puisque le produit obtenu est destiné à servir de supplément protéique pour l'alimentation des porcs, nous avons dosé l'azote total (NT) par Kjeldahl (AOAC, 1980). Un facteur de 6.25 a été utilisé pour convertir la teneur en azote en pourcentage de protéines. Le profil et les concentrations en acides aminés ont été déterminés par chromatographie (LKB 4400 Amino Acid Analyser, Biochrom LTD, Cambridge, England) après une hydrolyse acide des échantillons.

L'énergie a été déterminée par bombe calorimétrique adiabatique (Parr Inst. Company, Moline, Illinois, U.S.A.). Les solides totaux ont été mesurés par différence de poids avant et après séchage dans un four à 95°C pendant 18 h.

La méthode de digestion par micro-ondes (four micro-ondes CEM Corporation, Mathews, U.S.A.) (Abreu et Berton, 1996) a été utilisée pour la mise en solution des échantillons destinés aux analyses minérales. Tous les éléments minéraux ont été par la suite dosés par ICP-AES ("inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, Perkin-Elmer, Norwalk, U.S.A."). Les valeurs moyennes des échantillons analysés en duplicata à partir de fermentations réalisées dans le temps sont présentées dans les différents tableaux.

## *II Résultats et discussion*

### *I Les paramètres liés à la fermentation*

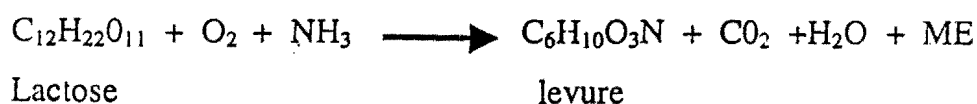
#### *1.1 Bioréacteurs et dissolution d'oxygène : essais avec de l'eau*

Rappelons que l'air fournit l'oxygène qui permet une transformation efficace de tous les éléments volatils malodorants du lisier (acides organiques, ammoniac,...) en biomasse et en énergie.

La vitesse de transfert de l'oxygène de l'air au milieu de culture en recirculation dans les divers bioréacteurs variait selon le type et la disposition des supports verticaux de même qu'en fonction du débit de recirculation (tableau 4.1).

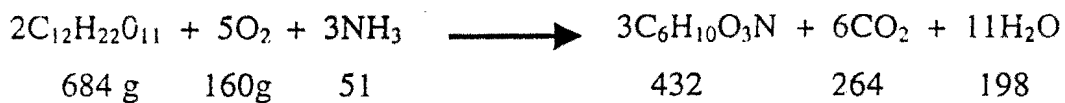
Plus la vitesse de recirculation d'un volume de milieu soumis à la fermentation est grande, plus grand est le transfert de l'oxygène. Cette tendance était la même pour les trois bioréacteurs testés et c'est lorsque la vitesse de recirculation fut fixée à 50 L/mn que nous avons observé la meilleure efficacité de transfert (tableau 4.1). Les valeurs obtenues pour les bioréacteurs A [cylindre] et B [carré] à la vitesse optimale de recirculation (50L/mn) étaient équivalentes. C'est pourquoi nous avons choisi de continuer le travail d'optimisation avec le bioréacteur A, équipé des mêmes supports que ceux décrits au chapitre 3. Ces derniers étaient cependant disposés selon une configuration légèrement différente.

Dans un deuxième temps, nous avons testé le bioréacteur à pleine hauteur, soit 3.6 mètres, avec le milieu constitué de lisier de porc et de perméat de lactosérum en fermentation. Sachant que la production de levures est la conséquence de l'oxydation de la source de carbone sous l'effet de l'aération, quelle quantité de perméat (lactose) peut-on injecter dans le bioréacteur tout en maintenant une oxydation complète du lactose ? Il est possible de calculer la quantité de lactose utilisée par les cellules dans le milieu aéré en fermentation en utilisant les formules de Atkinson et Mavituna (1991) e: Bailey et Ollis (1986) qui se résument ainsi :



En fait, cette équation décrit la réaction qui se déroule dans le bioréacteur. En effet, dans ce dernier, nous introduisons du lactose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) provenant du perméat, de l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_3$ ) venant du lisier et de l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) fourni par la recirculation dans le bioréacteur à écoulement vertical du milieu en fermentation.

Au cours de la fermentation, ces substrats sont transformés en biomasse de levures ( $C_6H_{10}O_3N$ ), en gaz carbonique ( $CO_2$ ), en eau ( $H_2O$ ) et en métabolites extracellulaires (ME), généralement excrétés à partir du cycle de Krebs, dans le milieu tout au long de la fermentation. L'équation équilibrée de la production de biomasse de levures à partir du lactose serait :



Dans cette équation, nous n'avons pas tenu compte des ME à cause de la complexité du milieu utilisé et du manque de données disponibles dans la littérature. Cet exercice aurait pu être réalisé dans un milieu parfaitement défini ou avec des substrats marqués au moyen d'isotopes radioactifs comme l'ont effectué Fradette et al., (1994) Nous n'avons pas tenu compte également de l'azote ammoniacal et non protéique du perméat de lactosérum non plus que du carbone fermentescible (acides organiques) du lisier, dont les faibles concentrations pourraient être considérées comme pratiquement négligeables dans les circonstances.

Il ressort de cette formule qu'il faut 0.37 g d'oxygène et 1.58 g de lactose pour produire 1 g de levures ; il faut 160 g d'oxygène pour oxyder 684 g de lactose. Donc connaître la quantité d'oxygène transférable et la quantité de lactose oxydable par unité de temps, c'est connaître le litrage de perméat que nous pouvons pomper dans le système.

En pratique, c'est à dire pour ce qui est de la fermentation, nous nous sommes également attachés à vérifier la quantité de lactose (litres de perméat) injectable (que le système est capable d'oxyder par minute) dans le bioréacteur. Sachant que la pente de la courbe (figure 4.3) de dissolution de l'oxygène dans un liquide traduit la vitesse avec laquelle l'oxygène est transféré dans un milieu de culture, et la concentration critique en oxygène dissout pour la levure se situant généralement entre 0 et 1 mg/l, nous avons d'abord quantifié l'oxygène qui est disponible dans le milieu. C'est alors que la pente (entre 0 et 1 mg/L d'O<sub>2</sub>D) de la courbe de dissolution de l'oxygène dans l'eau (figure 4.3, courbe A) a indiqué que l'oxygène disponible est de 2.6 mg /L/min (soit 130 mg pour le total des 50 litres d'eau que contenait le bioréacteur).

C'est dire que dans notre cas, la quantité de lactose que le système peut oxyder par minute était alors théoriquement de 33.6 g/L selon le calcul suivant :  $684\text{g} \times 130 \text{ mg/min} / 160 \text{ g} = 555.8 \text{ mg/min}$  ou  $0.56 \text{ g/min}$  ou  $\times 60 = \underline{33.6 \text{ g/h}}$  (soit 0.7 L de perméat pouvant être pomper dans le système par heure). Nous y reviendrons dans les résultats relatifs au débit d'alimentation.

Cette même figure 4.3 rapporte les courbes de dissolution de l'oxygène dans l'eau (A), dans une solution de perméat de lactosérum (B) et dans le milieu lisier/perméat en fermentation (C). La concentration de l'oxygène dissout à l'équilibre diffère selon la composition du milieu et la présence de levures (courbes A, B et C). Elle est de 10 mg/L dans l'eau; la concentration maximale à l'équilibre est de 8.2 mg/L dans la solution de perméat et seulement de 4.3 mg/L dans le milieu en fermentation. La faible concentration de l'oxygène dissout dans le dernier cas pourrait s'expliquer par un taux de transfert de l'oxygène dans ce milieu complexe qui est la résultante de la dissolution de l'oxygène et de sa consommation partielle et simultanée par les micro-organismes : ce qui se traduit par une lente remontée de l'oxygène et une concentration à l'équilibre de 4.3 mg/L.



Les résultats de la fermentation du milieu lisier/perméat à différentes vitesses de recirculation, soit 20 L/mn et 42 L/mn (figure 4.4a et 4.4b) indiquent qu'avec une vitesse de recirculation du milieu de 42 L/mn, il est possible d'injecter 1,6 litre de perméat à l'heure. Au delà de cette vitesse de recirculation, on observait une formation de mousse exagérée (entraînant un débordement). Quoique les résultats des figures 4.4 et 4.5 proviennent d'expériences similaires, celles ayant abouti à la figure 4.4 n'ont été vérifiées qu'une seule fois ; par ailleurs, la courbe de la figure 4.5a et ses variantes sont en tout point conformes à celle de la figure 4.4b. Pour cette raison, nous n'avons pas jugé nécessaire de répéter les essais présentés à la figure 4.4.

Les 3 courbes de la figure 4.4a et les 5 de la figure 4.4b ont été enregistrées l'une à la suite de l'autre en ajustant le débit d'alimentation de chacune au point 0 minute. L'amélioration de la performance du réacteur en regard de sa capacité à utiliser un plus fort dosage de lactose et de lisier pourrait s'expliquer par l'effet cheminée lié à la ventilation du système. Le système aspire de l'air par le bas et cet air se réchauffe au contact d'une culture de cellules immobilisées très actives. Plus la quantité de chaleur dégagée par les cellules en activité est importante, plus il y a aspiration d'air.

Par ailleurs, plus la colonne est haute, plus la quantité d'air circulant dans la colonne par unité de temps est forte. En principe, plus le bioréacteur sera haut, plus le milieu sera exposé longtemps à l'air pendant la recirculation, permettant ainsi un meilleur transfert d'oxygène (Atkinson et Mavituna, 1991). Donc, plus l'effet cheminée est fort et plus on augmente la quantité d'air circulant à contre-courant dans le bioréacteur et plus le taux de dissolution d'oxygène devait être élevé.

L'effet cheminée est également associé à une variation de température. Plus cet effet est grand, plus la température est élevée et moins la dissolution de l'oxygène est bonne (oxygène étant plus soluble à froid qu'à chaud, tableau 4.2). Cependant, il faut noter que la température du milieu se stabilise autour de 26°C. Cette situation pourrait s'expliquer par un équilibre entre le refroidissement résultant de l'évaporation partielle du milieu et l'élévation de la température. Par conséquent, le taux de dissolution de l'oxygène ne serait vraisemblablement que peu affecté par des oscillations de température autour de 26°C.

On remarque aussi qu'à 42 L/mn, le bioréacteur peut être alimenté jusqu'à 1,6 L/h (figure 4.5a) pour un taux de dilution ( $D$ ) de  $0.11 \text{ h}^{-1}$  voire même 2 L/h ( $D=0.13 \text{ h}^{-1}$ ) comparativement à 1 L/h ( $D=0.06 \text{ h}^{-1}$ ) lors des essais antérieurs (chapitre 3). Au terme de ces essais, nous pouvons dire que le bioréacteur A (cylindre) de 3.6 mètres de hauteur tel que configuré permet une aération suffisante pour éliminer complètement les odeurs typiques du lisier. La configuration optimale étant choisie, et la quantité d'oxygène maximale transférable dans le milieu étant connue, il importe désormais de vérifier le débit maximum d'alimentation que peut supporter ce bioréacteur. Tout comme au chapitre 3, la courbe de l'évolution de l'oxygène dissout de la figure 4.5a tout comme celle des figures 4.6, 4.7, 4.8 et 4.9 sont des courbes types. En effet, des essais répétés dans des conditions similaires ou analogues, ont donné des courbes de même allure. Ces variantes sont présentées aux figures 4.5b- 4.10b dans le texte. Celles des figures 4.6 et 4.7 sont données avec des nuages de points.

## 1.2 Débit d'alimentation

A partir de la vitesse optimale de recirculation de 42 L/mn, nous avons procédé comme au chapitre 3 à des ajouts progressifs du lisier et du perméat dans le milieu, tout en observant le niveau de l'oxygène dissout. Pour ce faire, les substrats étaient ajoutés à des débits (1 L/h à 2 L/h) n'excédant pas la capacité de la culture de levures à en utiliser complètement les composantes fermentescibles. Les résultats obtenus (figure 4.5) démontrent qu'à 1L/h, l'oxygène est rapidement utilisé et que la valeur résiduelle se stabilise à environ 1.5 ppm d'O<sub>2</sub>D. A 1.6 L/h, le niveau de l'oxygène dissout résiduel se situe autour de 0.5 ppm. À 2 L/h, la courbe d'oxygène dissout se stabilise au voisinage de zéro. Mais malgré tout, l'oxygène dissout disponible demeure suffisant pour maintenir une bonne activité métabolique et prévenir l'apparition d'odeurs indésirables telle qu'appréciée par une dizaine d'observateurs indépendants. En effet, malgré le fait que des techniques «objectives» d'évaluation sensorielle n'aient pas été utilisées pour quantifier le phénomène, plusieurs observateurs indépendants ont pu constater la disparition des odeurs typiques du lisier de porc.

Ces résultats indiquent également que le bioréacteur est capable de tolérer une alimentation d'au moins 1.6 L/h pour le lisier et 1.6 L/h pour le perméat pour un volume utile de 30 L, alors que cette valeur était de 1 L/h ( $D=0.03 \text{ h}^{-1}$ ) pour chacun de ces substrats au chapitre 3 (section II, 4). L'amélioration de l'aération du milieu a permis d'accroître le débit d'alimentation et en somme l'efficacité globale du système à traiter du lisier de porc.

Il faut remarquer cependant que même avec la meilleure aération que permet le réarrangement du système, il n'est toujours pas possible d'atteindre une vitesse d'alimentation supérieure à 2 L/h.

C'est le cas notamment lorsque en lieu et place du perméat de lactosérum habituel, nous avons utilisé du perméat concentré. Nous y reviendrons dans les résultats relatifs au pH.

### 1.3 Le pH

Avec le dispositif de distribution automatique d'acide assurant un contrôle du pH en continu, nous sommes parvenus à réduire la consommation du milieu en acide (de  $6 \pm 1,2$  ml/h à  $1 \pm 0,3$  ml/h). Il en est ainsi car le pH est constamment maintenu à l'échelle visée; ce qui constitue une amélioration, une optimisation par rapport à la façon dont nous avons travaillé lors de la fermentation en *fed-batch*. Puisque c'est un système qui n'exige pas de main d'œuvre, il présente un avantage économique certain pour une utilisation sur la ferme.

La figure 4.6 présente les résultats des essais de contrôle du pH à des valeurs de 4,0; 4,5 et 5,0. Dans le cadre de l'optimisation du système, c'est à dire avec une vitesse d'alimentation allant jusqu'à 2 L/h, le maintien du niveau de pH à 4,0 et 4,5 de façon manuelle nécessitait de 6 ml à 10 ml de HCL 6N à l'heure selon le niveau de pH désiré. Puisque le pH du lisier lui même est neutre (6,8) et que celui du perméat se situe autour de 6,0, il devient évident qu'il n'existe que deux moyens d'abaisser ces valeurs: un ajout d'acide exogène ou une acidification par la bio. masse microbienne en fermentation.

Dans le cas d'une alimentation du bioréacteur en régime *fed-batch*, il est plausible qu'au cours des essais d'optimisation la consommation d'acide soit plus élevée qu'en régime continu: en effet, on ne laisse pas toujours sous ces conditions suffisamment de temps à la culture d'épuiser complètement les substrats qui lui sont offerts.

La quantité d'acide nécessaire pour maintenir le pH au niveau voulu augmente proportionnellement au fur et à mesure que la vitesse d'alimentation en substrats progresse de 0,6 L/h à 2 L/h. À pH 4,5, la courbe décrit une ligne similaire sauf qu'à ce niveau, l'ajustement du pH nécessite une plus faible quantité d'acide (pH 4,0 = 10 ml ; pH 4,5 = 6 ml par heure).

Il est possible de rationaliser économiquement le système en assurant la maîtrise du pH non plus par l'utilisation de l'acide mais plutôt au moyen de la concentration en lactose du perméat. En effet, il est envisageable de concentrer le perméat avant de l'acheminer sur la ferme porcine; ce procédé existe déjà dans certaines industries fromagères et pourrait contribuer à minimiser les coûts de transport du perméat du site de production à la ferme. Il faut préciser ici que le ratio C/N de 10 choisi comme optimal dans les études précédentes est toujours respecté.

Toutefois, ce ratio a été modifié uniquement pour les besoins de l'expérience qui a consisté à vérifier si en concentrant le lactose du perméat, on pouvait réduire la consommation d'acide.

Quand nous avons combiné le perméat concentré avec du lisier, nous nous sommes aperçu que le pH du milieu en fermentation se stabilisait toujours entre 4,0 et 4,5 que ce soit à 0.6 L/h ; 1 L/h, 1.6 L/h ou à 2 L/h. Ce qui a permis du coup de réduire considérablement la consommation d'acide (figure 4.7).

Déjà à partir d'une concentration en lactose de 55 g/L, l'utilisation d'acide est négligeable et devient nulle à 60 g/L. Ces résultats pourraient s'expliquer par la production d'acides organiques à partir du lactose et par une meilleure assimilation de l'azote ammoniacal.

Lorsque le perméat est enrichi de 20 ou 40 % en lactose c'est à dire qu'il contient au moins 60 g de lactose par litre, donc 30 g/L dans le mélange qui est alimenté, la culture de levures utilise rapidement (30 minutes) l'oxygène excédentaire du milieu (figure 4.8). Par exemple, à 60 g de lactose par litre, la pente de la courbe est forte au départ puis elle se stabilise en 40 minutes autour de 0.2 ppm d'O<sub>2</sub>D. Pour le perméat nature, c'est à dire contenant 50 g de lactose par litre, on observe que le niveau d'oxygène dissout s'épuise après 70 minutes. Cependant, le milieu ne s'épuise pas rapidement et complètement en oxygène dissout lorsque la concentration en lactose du perméat est réduite à 40 g/L.

Selon ces données, il semble que lorsqu'il y a suffisamment d'oxygène dans le milieu de culture et en présence d'une forte concentration du milieu en carbone fermentescible, l'activité métabolique est plus forte que lorsque la concentration de la source de carbone est moindre. Ce qui a pour conséquence l'utilisation rapide de l'oxygène dissout dans le milieu. A l'inverse, si la concentration en substrat carboné est moindre ou insuffisante par rapport à la concentration en azote, il y a un ralentissement de l'activité métabolique (figure 4.9).

Toutes les courbes présentées à la figure 4.8 laissent apparaître une brève stabilisation du niveau d'O<sub>2</sub>D entre la dixième et la vingtième minute de fermentation. On peut présumer que les cellules seraient à ce moment presque au même stade de leur cycle de croissance, donc en synchronisation (Atkinson et Mavituna, 1991). Il est plausible d'obtenir un tel comportement lorsque les cellules sont cultivées dans des conditions où elles doivent affronter des périodes de jeûne.

Nous avons remarqué qu'aux débits les plus élevés d'addition des substrats, l'oxygène dissout peut soit se stabiliser quelque soit la concentration en substrats du milieu, soit remonter avec l'alimentation du milieu en substrats carbonés et azotés (perméat/lisier).

La figure 4.10 illustre parfaitement ce constat. On assiste à une remontée de l'oxygène dissout dans le milieu à partir d'une alimentation de 2 L/h en lisier et perméat. Ce comportement pourrait s'expliquer par la toxicité du lisier ou par l'insuffisance de la source carbonée indispensable au métabolisme énergétique de la culture de levures. Pour vérifier cette dernière hypothèse, le milieu en fermentation a été alimenté uniquement avec du perméat (en coupant l'alimentation en lisier) au moment où s'amorçait la remontée de l'oxygène dissout.

Lorsque nous avons cessé d'alimenter le bioréacteur en lisier donc en azote et que nous avons poursuivi la fermentation avec du perméat seulement, nous avons observé une reprise de l'activité métabolique qui s'est traduite à la fois par la diminution de l'oxygène dissout jusqu'à 0.15 ppm pour une alimentation de 3 L/h et une remontée de la température du milieu. Comme l'indique la figure 4.10, la température du milieu montre un fléchissement suivi d'une légère décroissance au point de la remontée en oxygène dissout.

Ces résultats indiquent qu'il n'y avait effectivement pas suffisamment de carbone fermentescible dans le milieu (C=56 mg/L, N=108 mg/L avec un C/N=0.5 ou 1/2) par rapport au 10 526 mg/L (42% de carbone sur les 342 g de lactose) de carbone et au 1242 mg/L d'azote (1350 mg/L) qui rentrent simultanément dans le bioréacteur avec un ratio de 10/1, étant donné que le lisier est déficitaire en sucre fermentescibles. Ces données suggèrent que la concentration en carbone est vraisemblablement plus limitante que celle en azote dans les conditions d'opération du bioréacteur. En effet, le lactose sert à la fois de source d'énergie et de carbone pour la croissance des levures. En plus, le ratio C/N doit être situé entre 7/1 et 10/1 pour assurer une bonne biomasse de levures (Atkinson et Mavituna, 1991).

Nous nous sommes aussi demandé si la concentration en lactose du perméat pouvait contribuer à réguler et stabiliser le pH du milieu en fermentation sans recourir à l'adjonction de neutralisant tout en assurant une bonne activité respiratoire de la biomasse de levure. Le maintien d'une bonne activité cellulaire est en effet une condition essentielle à la biotransformation des contaminants (nutriments) du lisier.

Nous avons donc vérifié l'effet de la concentration en lactose du perméat sur l'utilisation de l'oxygène dissout par la culture de levures de même que son effet sur le pH puisque, comme nous l'avons démontré au chapitre 3, les glucides peuvent contribuer à faire baisser le pH du milieu de culture. Il faut toutefois noter que l'utilisation du  $\text{NH}_4^+$  par les levures contribue également à acidifier le milieu soit par l'assimilation parallèle d'une molécule chargée négativement (symport) ou par l'excrétion d'un ion  $\text{H}^+$  pour maintenir la charge positive interne. Les essais visaient donc la comparaison de différentes concentrations en lactose du perméat.

Ainsi, au lieu d'utiliser uniquement du perméat pur dont la teneur en lactose est de 5% (50 g/L) comme à l'accoutumé, nous avons réalisé les essais avec du perméat dont la concentration en lactose variait de 30 à 70 g/L, soit par ajout de lactose, soit par dilution du perméat avec de l'eau; c'est-à-dire que le perméat a été fortifié à 20%-40% de lactose et dilué dans le même ordre de pourcentage, à -20% et -40%.

Concrètement, nous avons utilisé du perméat à 30 g/L ; 40 g/L ; 50 g/L ; 50 g/L et enfin 70 g/L. Nous avons, dans le même temps, déterminé la quantité d'acide nécessaire pour contrôler le pH au niveau voulu (tableau 4.3).

Il ressort de ce tableau que le contrôle du pH en continu permet de minimiser la consommation de neutralisant. En outre, la concentration du lactose du perméat de lactosérum contribue à réguler le pH du milieu en fermentation sans recourir nécessairement à l'apport de neutralisant.



Donc une augmentation de l'ordre de 20% du ratio C:N du milieu permet de réduire à 0 (figure 4.7) la consommation d'acide mais nécessite une réduction du débit d'alimentation en lisier de 1,6 à 1 L à l'heure (figure 4.9). En somme, les substrats doivent être injectés dans un ratio C:N prédéterminé (10 :1) qui doit idéalement être respecté. Les débits peuvent varier en intensité mais le ratio doit demeurer le même. En effet, plus de lisier que de substrat carboné entraînera un excès d'azote ammoniacal dans le milieu de fermentation, une réapparition d'odeurs nauséabondes et un pH qui aura tendance à s'élever. Par contre, s'il y a une plus grande proportion de substrat carboné, la culture de levure sera en déficit d'azote et elle aura tendance à faire plus de réserve cellulaire avec son excès de carbone fermentescible ou le laisser disponible à des micro-organismes non désirables.

## 2 Produit de la fermentation

Le milieu (lisier/perméat) fermenté, quasiment épuisé en sucres fermentescibles, contient une biomasse de levures qu'il importe de caractériser quant à sa valeur nutritive potentielle pour les porcs.

### 2.1 Concentration en levures

Le produit fermenté et désodorisé<sup>2</sup> (tel qu'apprécié par une dizaine de personnes) obtenu à la fin de nos expérimentations contient une population de levures de l'ordre de  $2.8 \times 10^9$  ufc/ml alors que la concentration des levures immobilisées sur les supports était de  $5.8 \times 10^9$  ufc/cm<sup>2</sup> (tableau 4.4).

<sup>2</sup>Il convient de préciser ici que tous les essais effectués avec le bioréacteur pilote se sont déroulés à l'intérieur d'une bâtisse servant d'atelier mécanique. Les personnes y travaillant n'ont à aucun moment été incommodées par les odeurs du lisier. Les substances volatiles du lisier étant captées et oxydées par les levures, l'air était donc désodorisé. Les seules occasions où des odeurs nauséabondes pouvaient être détectées correspondaient aux moments où la culture tombait en déficit d'oxygène dissout.

Les concentrations cellulaires (levures) observées (figure 4.2) après optimisation sont un peu plus élevées que celles avant optimisation aussi bien dans le milieu de culture que sur les supports.

Les levures ont pu atteindre cette densité grâce à un environnement qui leur était plus favorable (pH 4,5) qu'à la compétition bactérienne. La flore aérobie totale composée essentiellement de bactéries était de  $1.8 \times 10^9$  ufc/ml dans le produit fermenté, et  $8.7 \times 10^8$  ufc/cm<sup>2</sup> étaient immobilisées sur les supports de PVC. Quant aux cellules de levures immobilisées sur les supports, leur forte densité a pu être maintenue pendant la fermentation qui a duré cinq mois (tableau 4.5).

La surface disponible pour l'adhérence dans le bioréacteur a été évaluée par calcul à 15.6 m<sup>2</sup> pour les supports et à 0.943 m<sup>2</sup> pour la surface interne mouillée du bioréacteur : ce qui donne une surface totale d'environ 16.5 m<sup>2</sup>. En assumant que toute cette surface est couverte par un biofilm de levures, le nombre total de levures occupant cet espace serait de  $5.8 \times 10^9$  ufc/cm<sup>2</sup> x 16.5 m<sup>2</sup> x 10<sup>4</sup> cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup> c'est à dire  $95.7 \times 10^{13}$  cellules immobilisées. Le nombre total de levures en suspension dans les 30 L de milieu de fermentation étant de  $2.8 \times 10^9$  ufc/ml x 1000ml x 30, soit  $84 \times 10^{12}$ . En comparant les quantités totales de levures sur les supports et dans le milieu, il nous faut conclure qu'il y a au moins 10 fois plus de levures immobilisées que libres dans le milieu.

Ces résultats laissent supposer que les cellules immobilisées sont en grande partie responsables de l'activité métabolique qui a lieu dans le milieu de fermentation. Ces dernières participeraient donc très activement aux différentes réactions qui s'opèrent dans le milieu.

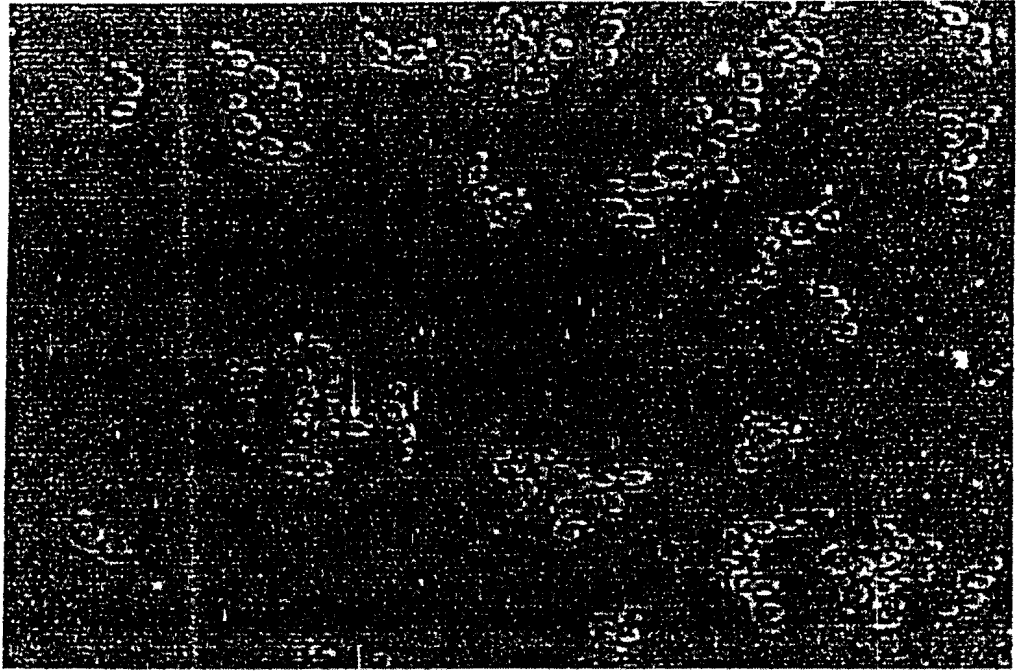
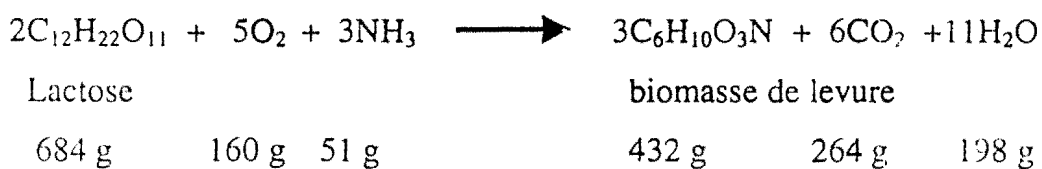


Figure 4.2. Observation microscopique (objectif 400X) des levures en croissance dans le produit fermenté (dilution au 1/100<sup>e</sup>).

## 2.2 Rendement et productivité du système

### 2.2.3 Rendement

- Même si les concentrations cellulaires obtenues sont importantes, des paramètres tels que le rendement et la productivité doivent être calculés pour évaluer l'efficacité du système de fermentation.
- A cet effet, et en partant de l'équation équilibrée de la biomasse de levures produite à partir du lactose, il est possible de calculer le rendement théorique:



Le nombre de cellules obtenues à la fin ou à un moment donné de la fermentation est proportionnel à la quantité de substrat utilisée. Le rendement est donc le ratio correspondant et est défini par la quantité de biomasse produite ou le nombre de cellules obtenues pour 100 g de substrat utilisé; à partir de cette équation, le rendement théorique auquel on peut s'attendre à partir du lactose ( $Y_1$ ) serait donc de :

$$Y_1 = \frac{3 \times 144}{2 \times 342} = 0.63 \text{ (63\%)} \quad (A)$$

Il ressort de cette équation que 1 g de lactose permet de produire 0.63 g de levures c'est à dire 63 g de levures pour 100 g de lactose consommé.

Il convient de préciser que compte tenu de l'hétérogénéité de la composition du lisier de porc (débris alimentaires, fibres, poils,...), les levures n'ont pu être déterminées sur base sèche. Pour les calculs qui vont suivre, nous n'utiliseront que la concentration des levures en ufc/ml.

Or, la concentration moyenne de levures obtenue pour le produit fermenté (après optimisation) est de  $2.8 \times 10^9$  ufc/ml (tableau 4.4), et la quantité moyenne de lactose ayant contribué à la production de cette biomasse de levures est de 23.944g/L. En effet, en considérant qu'environ 24 g de lactose/L de perméat (50% de perméat) sont pompés en continu dans le bioréacteur et que la concentration moyenne de lactose résiduel est de 56 mg/L de milieu,

$$Y_1 = \frac{2.8 \times 10^9 \times 10^3 \text{ ufc/L}}{23.944 \text{ g/L}}$$

soit  $\frac{2.8 \times 10^{12} \text{ ufc/L}}{23.944 \text{ g/L}}$ , Ce qui donne  $1.169 \times 10^{11} \text{ ufc/g}$  de lactose utilisé

(B)

Les levures humides destinées à la boulangerie, la distillerie et l'œnologie d'après les données obtenues d'une levurerie commerciale (Doyon, 1998), contiendraient en moyenne de  $1 \text{ à } 2 \times 10^{10}$  cellules viables par gramme.

Puisque la levure humide contient en moyenne 30% de solides et 70% d'humidité, le nombre de cellules rapporté sur une base sèche serait

$$\frac{2 \times 10^{10} \text{ ufc/g}}{0.30} = 6.66 \times 10^{10} \text{ ufc/g} \quad (\text{C})$$

Par ailleurs, le rendement théorique pour l'azote ammoniacal utilisé ( $Y_A$ ) serait de :

$$Y_A = \frac{3 \times 144}{3 \times 17} = 8.47$$

Il apparaît que 1 g d'azote ammoniacal permet de produire 8.47 g de levures c'est à dire 847 g de levures pour 100 g d'azote ammoniacal.

La concentration moyenne du produit fermenté obtenue est de  $2.8 \times 10^9$  ufc/ml et la quantité moyenne d'azote ammoniacal ayant contribué à la production de cette biomasse de levures à un moment donné est (1.35 g/L injecté en continu – 0.108 g/L dans le milieu) de 1.242g /L.

$$Y_N = \frac{2.8 \times 10^9 \times 10^3 \text{ ufc/L}}{1.242 \text{ g/L}} = 2.25 \times 10^{12} \text{ ufc/g d'azote ammoniacal utilisé.}$$

#### 2.2.4 Productivité

La productivité (P) est la quantité de biomasse nette obtenue par unité de volume et de temps. En culture continue, la productivité s'obtient en multipliant le taux de dilution (D) par la concentration (C) de la biomasse en régime permanent (steady state).

$$P = D \times C, \text{ on sait que } D = 0.11 \text{ h}^{-1}$$

$$P = 0.11 \times 2.8 \times 10^9 \times 10^3 \text{ ufc/L} = 0.308 \times 10^{12} = 3.08 \times 10^{11} \text{ /L/h}$$

#### 2.2.5 Efficacité

L'efficacité est définie par la quantité de biomasse produite ou le nombre de cellules obtenues pour 100 g de substrat qui est introduit dans le système de fermentation. En ce qui concerne le substrat carboné, nous avons comparé l'efficacité du système de fermentation étudié au chapitre précédent alors que cette dernière était menée en mode *fed-batch* à celle du présent chapitre où la fermentation s'est faite en continu.

Le nombre total de levures obtenues au chapitre 3 étant de  $1.5 \times 10^8$  ufc/ml et de  $2.8 \times 10^9$  ufc/ml pour ce chapitre, l'efficacité peut se calculer de la manière suivante :

$$\frac{1.5 \times 10^8 \cdot 10^3 \text{ ufc/L}}{24 \text{ g/L de lactose}} = 0.0625 \times 10^{11} \text{ ufc/g} \quad \text{et} \quad \frac{2.8 \times 10^9 \cdot 10^3 \text{ ufc/L}}{24 \text{ g/L de lactose}} = 0.116 \times 10^{12} \text{ ufc/g}$$

- Tel que rapporté par ces résultats, la fermentation en continu a permis d'améliorer l'efficacité du système de fermentation d'au moins 18 fois.

### 2.3 La teneur en protéines et en acides aminés du produit fermenté

Les résultats relatifs à la concentration en levures du produit fermenté établissent que ce dernier a permis une abondante multiplication cellulaire. La valeur alimentaire de cette biomasse et plus particulièrement sa teneur en protéines est un paramètre critique en regard de son recyclage potentiel dans l'alimentation du porc.

Il est reconnu que les levures sont généralement riches en protéines et qu'elles peuvent en contenir jusqu'à 50% (TKN x 6.25) sur une base de matière sèche. Bui et Galzy (1990) ont trouvé que ce pourcentage est de l'ordre de 45% pour *K. marxianus*, lorsque cette dernière est cultivée sur un milieu de base (*minimal medium*) avec le glucose comme source de carbone.

Cette teneur en protéines peut néanmoins varier selon les genres, les espèces, les souches et surtout le milieu et les conditions particulières de culture (Boze et al., 1992 ; Bui et Galzy., 1990).

Dans le cadre de nos essais, la teneur en azote des substrats principaux ayant servi à la production de biomasse, était respectivement de 1.326 g/L et de 0.11 g/L pour le lisier et le perméat de lactosérum. Suite à la fermentation, le produit final obtenu en contenait 1.468 g/L, une valeur légèrement supérieure à la somme des concentrations de chacun des substrats (tableau 4.6). La différence tient vraisemblablement au fait que le produit fermenté a subi une certaine concentration par évaporation lors de sa recirculation dans le bioréacteur. Avec un équivalent protéique de 30% (tableau 4.7) sur une base de matière sèche, la biomasse de levures semble avoir fixé efficacement l'azote du lisier.

Le tableau 4.7 compare la teneur en protéine totales du lisier fermenté à celle de quelques céréales couramment utilisées dans l'alimentation du porc. Les valeurs rapportées indiquent que le lisier fermenté serait 2,5 fois plus riche en protéines brutes que le sorgho et 3 fois plus que le maïs et l'orge. Ce produit pourrait donc éventuellement être utilisé comme complément protéique dans l'alimentation des porcs.

Ainsi donc, nos résultats vont dans le même sens que ceux de Chahal et Ishaque, (1988), qui ont obtenu entre 29 et 30% de protéines après la fermentation de la fraction liquide du lisier de porc avec des résidus agricoles tels que la paille de maïs et celle du blé. S'il est important que le produit final soit riche en protéines, il est tout aussi déterminant que ces protéines contiennent les dix acides aminés jugés essentiels pour le porc en quantité et en proportion nécessaires pour sa croissance.

Les compositions en acides aminés essentiels de quelques protéines (aliments conventionnels) comme le soya, l'œuf, les levures et notre produit fermenté sont présentées dans le tableau 4.8. Compte tenu de son profil en acides aminés et de sa bonne digestibilité, la protéine de l'œuf est considérée comme comblant presque parfaitement les besoins du porc. Cette comparaison avec d'autres sources



d'aliments riches en protéines permet de vérifier la qualité du produit fermenté et d'en déterminer les facteurs limitants. Par rapport à la référence (FAO), il apparaît que le lisier fermenté est riche en acides aminés essentiels exception faite de ceux reconnus comme faisant défaut aux protéines de levures.

L'acide aminé reconnu comme le plus limitant pour le porc est la lysine; les protéines céréalières en contenant des concentrations nettement inférieures aux protéines animales. Il ressort du tableau 4.8 que le lisier fermenté est suffisamment riche en lysine, thréonine, valine et leucine comparativement aux produits céréaliers du tableau 8. L'utilisation de cette biomasse de levures comme supplément alimentaire permettrait de combler une partie de la carence de certains produits végétaux en acides aminés essentiels.

Les résultats relatifs au produit fermenté dont il est ici question montrent que, ce dernier est riche en plusieurs acides aminés essentiels, surtout en certains acides aminés (lysine et thréonine) habituellement utilisés pour compléter la ration de base des porcs (tableau 4.8). Le tableau comparatif des profils d'acides aminés essentiels du produit fermenté, de quelques levures et du tourteau de soya montre que le produit fermenté est déficitaire en acides aminés soufrés mais présente un bon équilibre pour les autres acides aminés essentiels.

On constate par ailleurs (tableau 4.9) que la teneur en acides aminés de notre produit se compare bien à celles des levures lactiques (Bel) et du lisier aéré (oxidation ditch). Le lisier fermenté se révèle plus riche en phénylalanine et en valine mais équivalent pour la thréonine, l'arginine et l'histidine aux levures des industries Bel.

En somme, la biomasse que constitue le produit final est non seulement riche en levures, cellules reconnues pour leur richesse en protéines, mais surtout en acides aminés essentiels (tels la lysine et la thréonine) que l'on ne trouve pas en concentration suffisante dans les céréales communément servies comme aliment aux porcs. Ces résultats confirment ceux de nombreuses revues et symposiums qui rapportent la qualité nutritive des levures lorsque celles-ci sont utilisées comme sources de protéines pour les animaux (Golberg., 1985; Davis, 1983; Senez, 1983).

La composition du produit fermenté présentée au tableau 4.10 laisse voir que le lactose et l'azote résiduels en régime stationnaire (*steady state*) donnent un ratio C:N de 1/2. Ce dernier indique un abaissement considérable de la teneur en carbone du système suite à la fermentation : rappelons que le ratio C:N des substrats (avant fermentation) était de 10:1. Par ailleurs, l'énergie du produit fermenté est de 3,17 Kcal/g confirmant ainsi que ce produit contient principalement des glucides et des protéines (4 Kcal/g).

Il convient de souligner aussi que ce produit ne doit pas exposer les porcs à des risques inacceptables. Il est reconnu d'ailleurs par McCaskey et al., (1985) que les micro-organismes pathogènes, les métaux lourds, et les résidus médicamenteux peuvent représenter un risque potentiel pour le recyclage alimentaire des excréments d'animaux. A ce titre, même s'il est vrai que ce n'est ni le but ni l'objectif central de cette étude, nous avons quand même tenu à travailler dans des conditions de nature à éliminer les bactéries pathogènes.

Pour cela, nous avons ajusté le milieu à un pH de 4.4, pH reconnu comme étant un facteur de protection et pouvant empêcher la prolifération des bactéries pathogènes.

C'est le cas notamment de l'ensilage d'excréments d'animaux qui a été trouvé exempt de pathogènes lorsque le pH était inférieur à 5,0 (McCaskey et Antony, 1975, 1979; Kamra et Srivastawa, 1991; Caswell et al., 1977; Kamra et Srivastava, 1994; McCaskey et al., 1985; Flachowsky et Hennig, 1990; Turner et Colin., 1997).

Quoique *C. botulinum* ne présente aucun danger de prolifération en fermentation aérobie, la valeur du pH de 4,5 marque la limite au-dessous de laquelle elle ne produit pas de toxine (Bourgeois et al., 1996). Les bactéries lactiques et acétiques peuvent se développer à un pH inférieur à 4,5 mais sont sans danger pour la santé.

On pourrait aussi suggérer un traitement thermique équivalent à une pasteurisation pour assurer une marge de sécurité accrue au produit et des possibilités de récupération d'énergie au moyen d'échangeurs de chaleur analogues à ceux utilisés dans les usines de transformation d'aliments (Bailey et Ollis, 1986).

Les coûts liés à ce chauffage devraient en principe être minimales compte tenu de l'acidité du produit et de la récupération thermique possible. Selon Bourgeois et al., (1996) l'acidité du milieu recevant le traitement thermique influence beaucoup la résistance à la chaleur des micro-organismes. Plus le milieu est acide, moins l'intensité thermique nécessaire pour atteindre la valeur létale est grande.

Il ressort par ailleurs des études d'un sous-comité américain, (*The subcommittee on Mineral Toxicity in Animals*, NCR, National Academy of Sciences 1980) sur la toxicité des minéraux destinés à l'alimentation animale, que tous les minéraux sont potentiellement toxiques pour les animaux s'il sont ingérés en quantités exagérées (Church et Pond, 1988).

Toujours selon cette sous-commission, la marge de sécurité entre la quantité de minéraux nécessaire pour l'alimentation et celle de leur dose toxique varie selon les minéraux, les espèces animales et les conditions d'alimentation.

En outre, selon les recommandations du PAG (Protein Advisory Group) de la FAO/WHO/Unicef et l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, 1974), la détermination des éléments majeurs tels que le Na, K, Mg, Ca, Cl et des éléments traces tels le Mn, Zn, Fe, Co, Mo, As, Pb et Hg doit être effectuée sur tout produit destiné à l'alimentation humaine ou animale. Aussi, sans prétendre à une étude exhaustive de la question (qui relève beaucoup plus de la nutrition) nous nous sommes quand même imposés de vérifier la présence et la concentration des minéraux en question dans le produit final issu de la fermentation du lisier (tableau 4.11).

Il ressort de ce tableau comparatif que le produit fermenté est une bonne source de minéraux et se compare avantageusement au produit issu des fosses aérées et utilisé pour alimenter les porcs (Harmon et Day., 1975). Par ailleurs notre produit se prête bien à l'alimentation animale si l'on tient compte de la concentration minérale maximale tolérée par les porcs, excepté pour le calcium et le potassium qui présentent des concentrations excédant le standard de la sous-commission (mais néanmoins inférieures à celles du lisier simplement aéré (*oxydation ditch liquor* =ODL). En règle générale, Church, (1991) soutient que l'insuffisance (concentration) d'un minéral est plus problématique qu'un excès.

Treize minéraux (Ca, P, Na, Cl, Mg, K, S, Cu, Fe, Mn, Zn, I, Se) seraient essentiels au bon développement du porc ; parmi ceux-ci, le calcium et le phosphore doivent être en quantité suffisante pour une croissance optimale.

Le ratio le plus approprié de Ca:P se situe entre 1:1 et 1.5:1 (Church, 1991). Ce rapport, qui est de 1:1 dans le produit fermenté, répond donc aux normes. Ainsi, même si la concentration en calcium semble élevée, il reste que le ratio Ca:P satisfait aux besoins du porc. Quant au sodium, signalons qu'il peut être très toxique pour le porc s'il excède le niveau de 8% (Church, 1991)

En ce qui concerne les résidus médicamenteux tels que les antibiotiques administrés aux porcs, et que l'on pourrait craindre *a priori* de retrouver dans le produit fermenté, il faut rappeler que les levures sont des eucaryotes et qu'à ce titre, elles sont insensibles aux antibiotiques communément utilisés contre les bactéries.<sup>3</sup> Quant aux qualités sensorielles du produit par les porcs, il est bon de signaler que du lisier simplement aéré (ODL) a déjà été accepté comme seule source de liquide par des porcs à l'engraissement (Harmon et al., (1972); Harmon et Day (1974)). On peut donc raisonnablement anticiper qu'ils feront de même avec un produit enrichi en protéines et qui par surcroît serait désodorisé.

Du reste, les études de Iniguez-Covarrubias et al., (1994), qui rapportent des essais d'alimentation avec du lisier fermenté en continu avec du sorgho tendent à confirmer ce point de vue.

---

<sup>3</sup> Il est important de noter ici que les acides nucléiques de la biomasse levurienne n'ont aucun effet négatif sur la santé des porcs tout comme sur celle de la plupart des animaux. En effet, ces derniers sont capables de synthétiser l'urate oxydase (contrairement aux humains, singes supérieurs, reptiles et les oiseaux) qui hydrolyse l'acide urique en allantoiné (soluble), leur évitant ainsi la formation de calculs rénaux (goutte) par l'accumulation de l'acide urique dans les reins et la vessie (Rivière, 1975).

### *III Conclusion partielle*

Au terme de ce chapitre, nous pouvons constater que la performance du système a effectivement été améliorée en tenant compte de la vitesse d'alimentation qui est passée de 1 L/h à 1.6 L/h, de la maîtrise du pH du milieu et de celle de la mousse. Ainsi, nous avons pu atteindre une plus grande vitesse d'alimentation pour un taux de dilution de  $0.11 \text{ h}^{-1}$  ( $D$  variant entre  $0.05$  et  $0.07 \text{ h}^{-1}$  dans le précédent chapitre) à cause principalement d'une meilleure aération du liquide en circulation dans le bioréacteur.

Ces meilleurs résultats sont aussi à attribuer au régime de fermentation en continu que nous avons utilisé et qui a permis de juguler la production de mousse (sans ajout d'anti-mousse), de maîtriser davantage les paramètres essentiels que sont le pH du milieu et son oxygénation. La concentration en levures que nous avons obtenue correspond à des rendements voisins du théorique; cette biomasse s'est révélée riche en protéines, et affichait un bon profil d'acides aminés essentiels. La figure 4.11 illustre le schéma d'écoulement du lisier de porc selon notre approche comparativement au schéma global d'écoulement actuel du lisier dans les porcherie (annexe C).

Tableau 4.1. Taux de dissolution de l'oxygène dans trois types de bioréacteurs avec supports internes verticaux selon la vitesse de recirculation du milieu.

| Vitesse de recirculation<br>du milieu | Bioréacteur A                         | Bioréacteur A' | Bioréacteur B |
|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|---------------|
|                                       | Mg O <sub>2</sub> /L d'eau à 25°C/min |                |               |
| 20 L/mn                               | Nd*                                   | 0.499          | 0.482         |
| 36 L/mn                               | Nd                                    | 0.542          | 0.577         |
| 50L/mn                                | 0.934                                 | 0.769          | 0.938         |

\*nd = non déterminé

Tableau 4.2. Dissolution de l'oxygène dans l'eau selon la température (Atkinson et Mavituna; 1991)

| Température (°C) | Concentration de l'oxygène<br>dans l'eau (mmol/L) |
|------------------|---|
| 0                | 2,18  |
| 10               | 1,70  |
| 15               | 1,54  |
| 20               | 1,38  |
| 25               | 1,26  |
| 30               | 1,16  |
| 35               | 1,09  |
| 40               | 1,03  |

Tableau 4.3. Effet de la concentration en lactose du perméat de lactosérum injecté dans le fermenteur contenant 30 L de milieu lisier/perméat en fermentation continue sur la quantité d'acide chlorhydrique 6N nécessaire pour contrôler (pendant 1 heure), le pH à 4.4 et à une vitesse d'alimentation de 1.6 L/h.

|                                | 30 g/L | 40 g/l | 50 g/L | 60 g/L | 70 g/l |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Avec contrôle continu du pH    | 112*   | 68     | 29     | 0      | 0      |
| Avec contrôle discontinu du pH | nd**   | Nd     | 85     | Nd     | Nd     |

\* ml de HCL 6N

\*\*nd = non déterminé

Tableau 4.4. Dénombrement des levures en suspension (dans le produit fermenté) et immobilisées (sur les supports de PVC).

|  | Produit fermenté (ufc/ml) |                          | Cellules immobilisée (ufc/cm <sup>2</sup> ) |                          |
|--|---------------------------|--------------------------|---|--------------------------|
|  | Levures                   | Flore totale             | Levures                                     | Flore Totale             |
| Avant optimisation<br>(régime <i>fed-batch</i> ) | $1.5 \times 10^8 \pm 38$  | $8.5 \times 10^9 \pm 21$ | $3.6 \times 10^8 \pm 23$                    | $2.0 \times 10^9 \pm 29$ |
| Après optimisation<br>(régime continu)           | $2.8 \times 10^9 \pm 51$  | $1.8 \times 10^9 \pm 32$ | $5.8 \times 10^9 \pm 27$                    | $8.7 \times 10^8 \pm 33$ |



Tableau 4.5. Dénombrement des microorganismes immobilisés sur les supports de PVC au cours des cinq mois de fermentation

| Temps<br>(jours) | Levures<br>$10^8$ cfu/cm <sup>2</sup> | Flore totale<br>$10^8$ cfu/cm <sup>2</sup> |
|------------------|---------------------------------------|--|
| 15               | 2.1                                   | 21   |
| 50               | 27                                    | 8.1  |
| 95               | 46                                    | 2.9  |
| 130              | 160                                   | 3.1  |

Tableau 4.6. Teneur moyenne en azote du produit fermenté, du lisier et du perméat

|                           | Perméat         | Lisier           | Produit fermenté  |
|---------------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| Azote total (g/L)         | $0.11 \pm 0.06$ | $1.326 \pm 0.25$ | $1.458 \pm 0.13$  |
| Azote non protéique (g/L) | $0.09 \pm 0.02$ | $1.002 \pm 0.12$ | $0.352 \pm 0.028$ |

Tableau 4.7. Comparaison de la teneur en protéines (TKN x 6.25) du produit Fermenté et de quelques céréales communément utilisées en alimentation animale (Adrian et Frangine, 1991).

| Produit alimentaire | % de protéines totales (sur base sèche) |
|---------------------|---|
| Produit fermenté    | 30                                      |
| Maïs                | 10,1                                    |
| Sorgho              | 12,5                                    |
| Orge                | 10,1                                    |
| Tourteau de soya    | 53,1                                    |

Tableau 4.8. Comparaison de la composition en acides aminés essentiels (g acide aminé pour 16 g N) du produit fermenté, de quelques levures et aliments conventionnels (d'après Senez, 1983).

| Source de protéine              | Azote<br>x 6.25 | Lys | Thr | Cys | Met | Val  | Ileu | leu | Phe | Try  |
|---------------------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|------|
| Référence FAO                   | -               | 4.2 | 2.8 | 2.0 | 2.2 | 4.2  | 4.2  | 4.8 | 2.8 | 1.0  |
| <u>Produit fermenté</u>         | 30              | 6.8 | 5.5 | 0.6 | 0.8 | 10.5 | 4.0  | 7.8 | 4.8 | -    |
| Tourteau de soja                | 45.5            | 2.8 | 1.9 | 0.7 | 0.6 | 2.3  | 2.2  | 3.5 | 2.2 | 0.6  |
| Farine de poisson               | 66.3            | 4.9 | 3.0 | 0.7 | 1.9 | 3.7  | 3.2  | 5.0 | 2.9 | 0.9  |
| Œuf entier                      | -               | 6.5 | 5.1 | 2.4 | 5.1 | 7.3  | 6.7  | 8.9 | 5.8 | 1.6  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 53.7            | 8.2 | 4.8 | 1.6 | 2.5 | 5.5  | 5.5  | 7.9 | 4.5 | 1.2  |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i>   | 56.2            | 6.9 | 5.8 | -   | 1.9 | 5.4  | 4.0  | 6.1 | 2.8 | 1.4  |
| <i>Candida utilis</i>           | 48              | 7.1 | 4.7 | 0.6 | 1.0 | 5.3  | 4.3  | 7.0 | 3.7 | 0.04 |

Tableau 4.9. Comparaison des profils d'acides aminés du produit fermenté, de celui des levures Bel (Bui et Galzy, 1990) et du lisier aéré (Harmon et Day, 1975).

| Acides aminés<br>(% matière sèche) | Produit<br>fermenté | Levures<br>Bel | Lisier<br>Aéré | Acides aminés<br>(% matière sèche) | Produit<br>fermenté | Levures<br>Bel | Lisier<br>aéré |
|------------------------------------|---------------------|----------------|----------------|------------------------------------|---------------------|----------------|----------------|
| Phénylalanine                      | 1.78                | 1.5            | 1.48           | Leucine                            | 2.91                | 3.3            | 2.79           |
| Lysine                             | 2.55                | 3.5            | 1.42           | Acide aspartique                   | 3.72                | 4.3            | 3.73           |
| Histidine                          | 0.98                | 1.0            | 0.47           | Sérine                             | 1.96                | 2.6            | 2.55           |
| Arginine                           | 2.51                | 2.5            | 1.28           | Acide glutamique                   | 4.8                 | 8.3            | 5.06           |
| Thréonine                          | 2.02                | 2.2            | 1.96           | Proline                            | 1.64                | 1.5            | 1.29           |
| Valine                             | 3.9                 | 2.2            | 2.06           | Glycine                            | 2.1                 | 1.9            | 2.29           |
| Méthionine                         | 0.51                | 0.8            | 0.77           | Alanine                            | 2.56                | -              | 2.83           |
| Isoleucine                         | 1.48                | 2.0            | 1.49           | Tyrosine                           | 1.42                | 1.5            | 1.17           |

Tableau 4.10. Composition moyenne du produit fermenté obtenu en régime continu stationnaire (steady state) à un taux de dilution (D) de  $0.11 \text{ h}^{-1}$

|                                       |                   |
|---------------------------------------|-------------------|
| Solides totaux %                      | 3.25              |
| Protéines brutes % (%N $\times$ 6.25) | 30                |
| Energie cal/g                         | 3172.46           |
| Lactose résiduel mg/L                 | 56.2              |
| Azote ammoniacal résiduel mg/L        | 108               |
| PH                                    | 4.4               |
| Levures (ufc/ml)                      | $2.8 \times 10^9$ |

Tableau 4.11. Comparaison de la composition minérale du produit fermenté à celle du lisier aéré (Harmon et Day, 1975) et au niveau maximum accepté dans l'aliment pour le porc (Church et Pond, 1988)

| Eléments (sur base sèche) | Produit fermenté | Lisier aéré <sup>a</sup><br>(ODL) | Niveau accepté dans l'aliment pour le porc <sup>b</sup> |
|---------------------------|------------------|-----------------------------------|---|
| Ca %                      | 1.908            | 3.33                              | 1   |
| K %                       | 7.388            | 4.04                              | 2   |
| Na %                      | 2.536            | 2.75                              | 8   |
| Mg %                      | 0.476            | 1.49                              | 0.3   |
| P %                       | 2.097            | 3.83                              | 1.5   |
| Mn ppm                    | 92.74            | -                                 | 400   |
| Fe ppm                    | 815.52           | 550                               | 3000  |
| Zn ppm                    | 2016.13          | 71                                | 1000  |
| Cu ppm                    | 139.11           | 115                               | 250   |
| Al ppm                    | 85.08            | -                                 | 200   |
| As ppm                    | 1.242            | -                                 | 50  |
| Mo ppm                    | 0.685            | -                                 | 20  |
| Cr ppm                    | 0.202            | -                                 | 1000  |
| Pb ppm                    | 5.992            | -                                 | 30  |
| Co ppm                    | 0.347            | -                                 | 10  |
| Ni ppm                    | 1.613            | -                                 | 100   |

<sup>a</sup> Harmon et Day., 1975

<sup>b</sup> Church et Pond, 1988

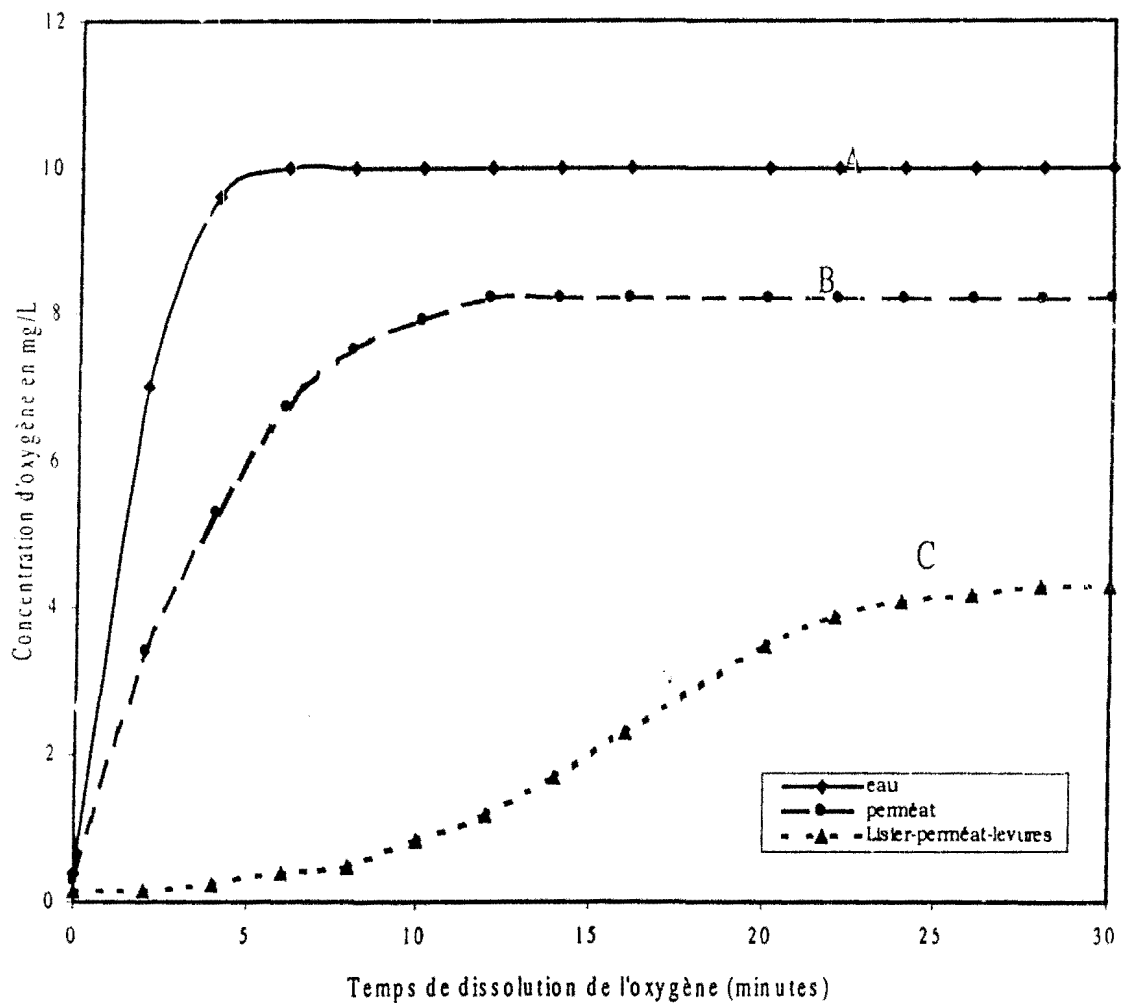


Figure 4.3. Courbes de dissolution de l'oxygène dans l'eau (A), dans du perméat de lactosérum (B) et dans le milieu lisier/perméat/levures en fermentation à 25°C.

Tableau 4.11. Comparaison de la composition minérale du produit fermenté à celle du lisier aéré (Harmon et Day, 1975) et au niveau maximum accepté dans l'aliment pour le porc (Church et Pond, 1988)

| Eléments (sur base sèche) | Produit fermenté | Lisier aéré <sup>a</sup><br>(ODL) | Niveau accepté dans l'aliment pour le porc <sup>b</sup> |
|---------------------------|------------------|-----------------------------------|---|
| Ca %                      | 1.908            | 3.33                              | 1   |
| K %                       | 7.383            | 4.04                              | 2   |
| Na %                      | 2.536            | 2.75                              | 8   |
| Mg %                      | 0.476            | 1.49                              | 0.3   |
| P %                       | 2.097            | 3.83                              | 1.5   |
| Mn ppm                    | 92.74            | -                                 | 400   |
| Fe ppm                    | 815.52           | 550                               | 3000  |
| Zn ppm                    | 2016.13          | 71                                | 1000  |
| Cu ppm                    | 139.11           | 115                               | 250   |
| Al ppm                    | 85.08            | -                                 | 200   |
| As ppm                    | 1.242            | -                                 | 50  |
| Mo ppm                    | 0.685            | -                                 | 20  |
| Cr ppm                    | 0.202            | -                                 | 1000  |
| Pb ppm                    | 5.992            | -                                 | 30  |
| Co ppm                    | 0.347            | -                                 | 10  |
| Ni ppm                    | 1.613            | -                                 | 100   |

<sup>a</sup> Harmon et Day., 1975

<sup>b</sup> Church et Pond, 1988

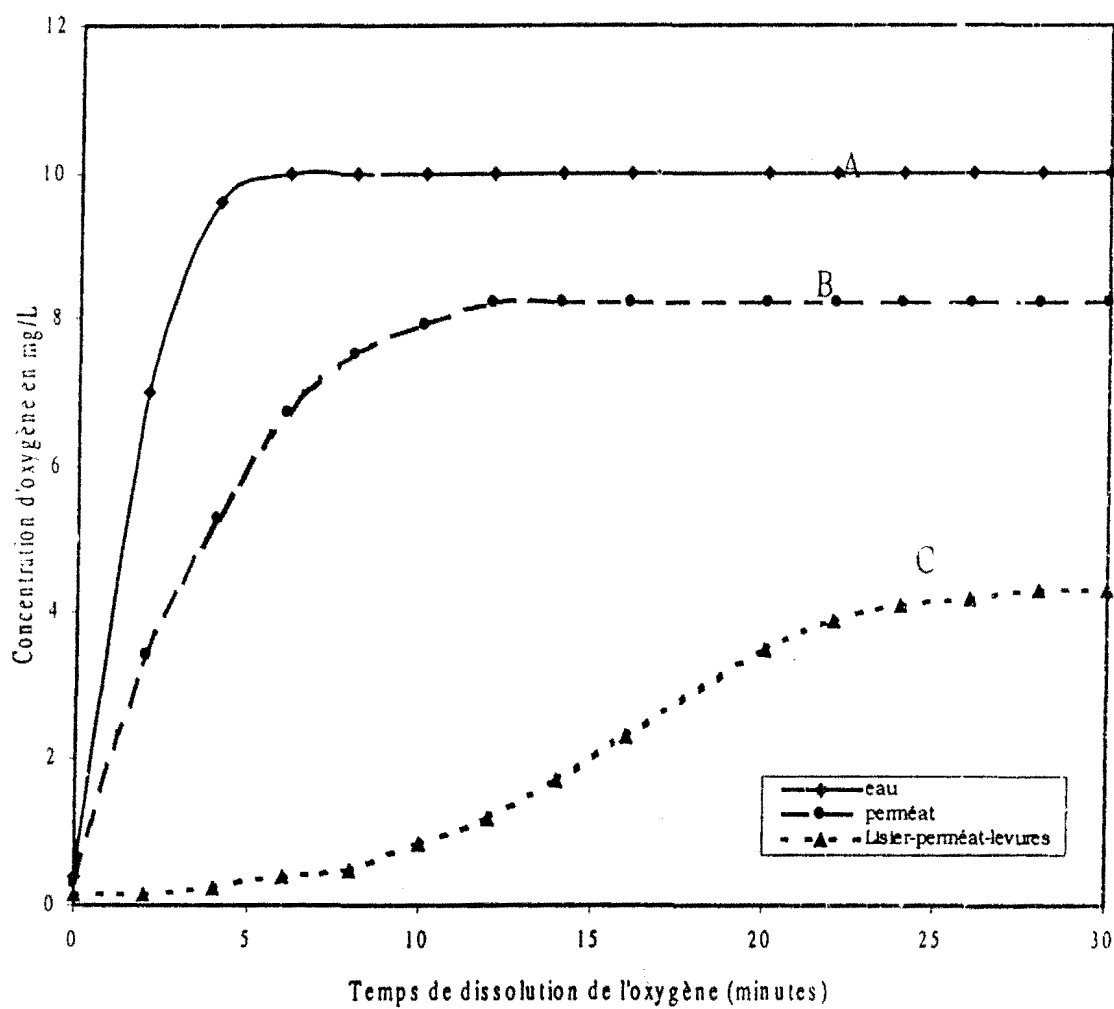


Figure 4.3. Courbes de dissolution de l'oxygène dans l'eau (A), dans du perméat de lactosérum (B) et dans le milieu lisier/perméat/levures en fermentation à 25°C.

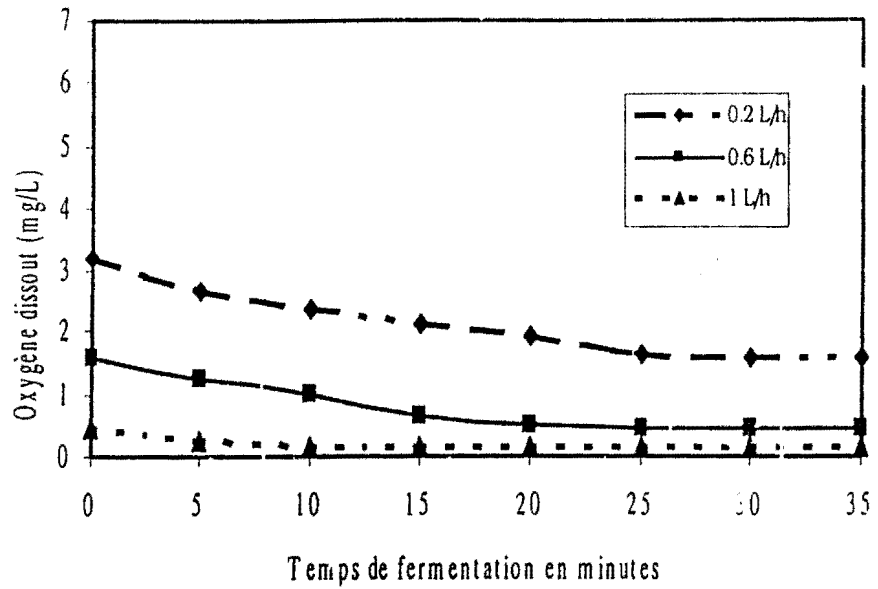


Figure 4.4a. courbes d'utilisation de l'oxygène dissout dans le milieu lisier/perméat en fermentation à différents débits d'alimentation du bioréacteur opérant à un taux de recirculation de 20L/mn, (pH 4.7, 25°C). Les 3 courbes ont été enregistrées l'une à la suite de l'autre en ajustant l'alimentation à 0 mn. Le volume total du liquide dans le fermenteur était de 30L.

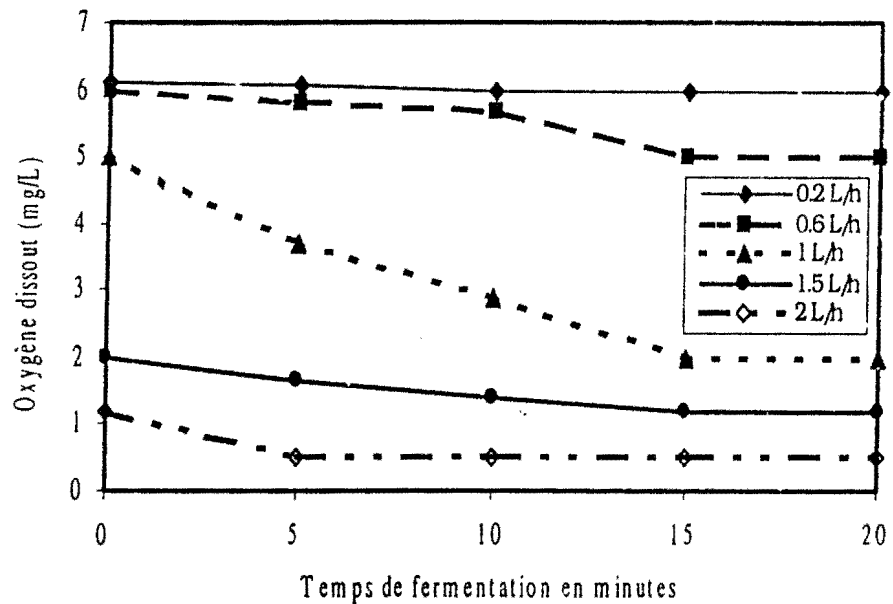


Figure 4.4b. Courbes d'utilisation de l'oxygène dissout dans le milieu lisier/perméat de lactosérum en fermentation, à différents débits d'alimentation du bioréacteur opérant à un taux de recirculation de 42 L/mn (pH 4.7, 25°C). Les 5 courbes ont été enregistrées l'une à la suite de l'autre en ajustant l'alimentation à 0 mn. Le volume total du liquide dans le fermenteur était de 30L.



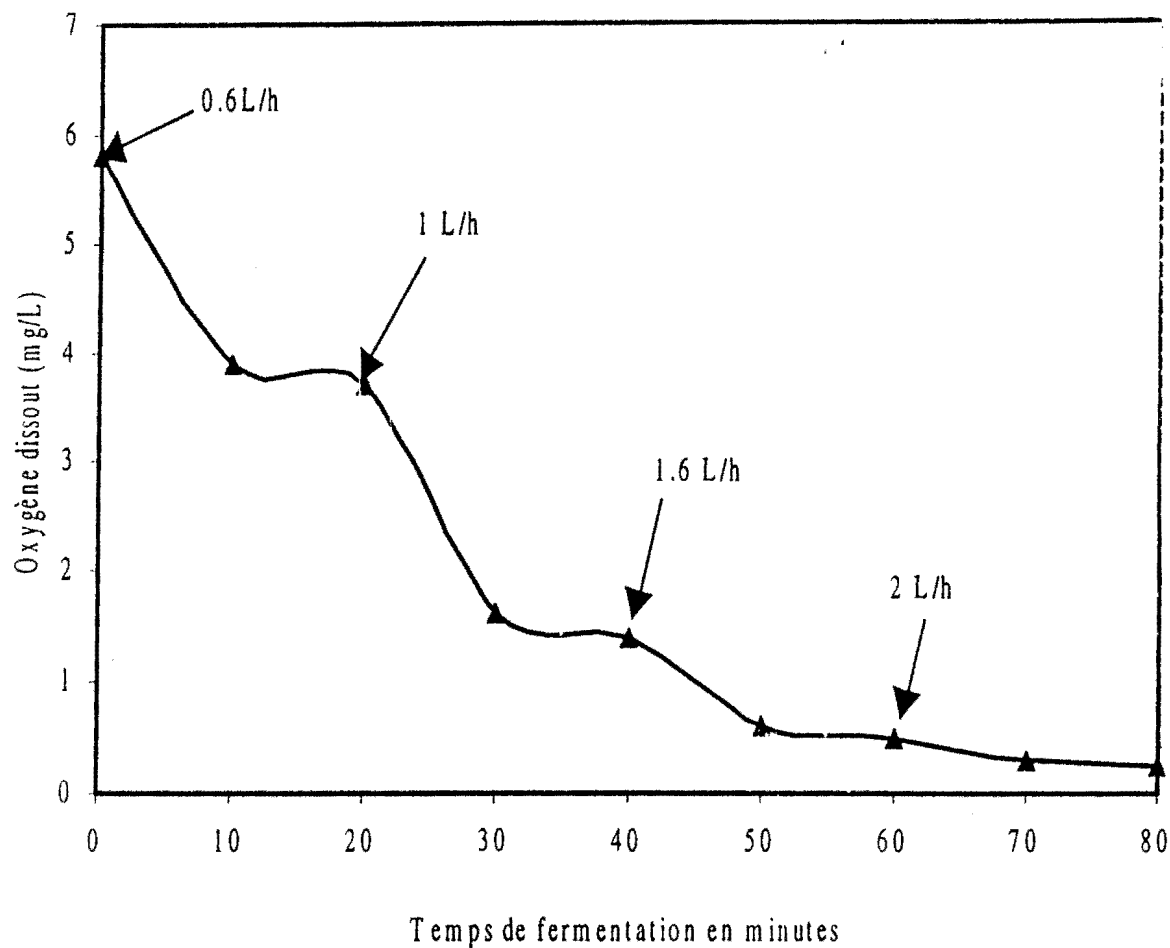


Figure 4.5a. Effet de l'augmentation du débit d'alimentation en lisier et en Perméat de lactosérum sur l'utilisation de l'oxygène dissout par la culture de levures entre 22 et 27°C, à un pH de 4.4, sous un débit de recirculation de 42L/mn.

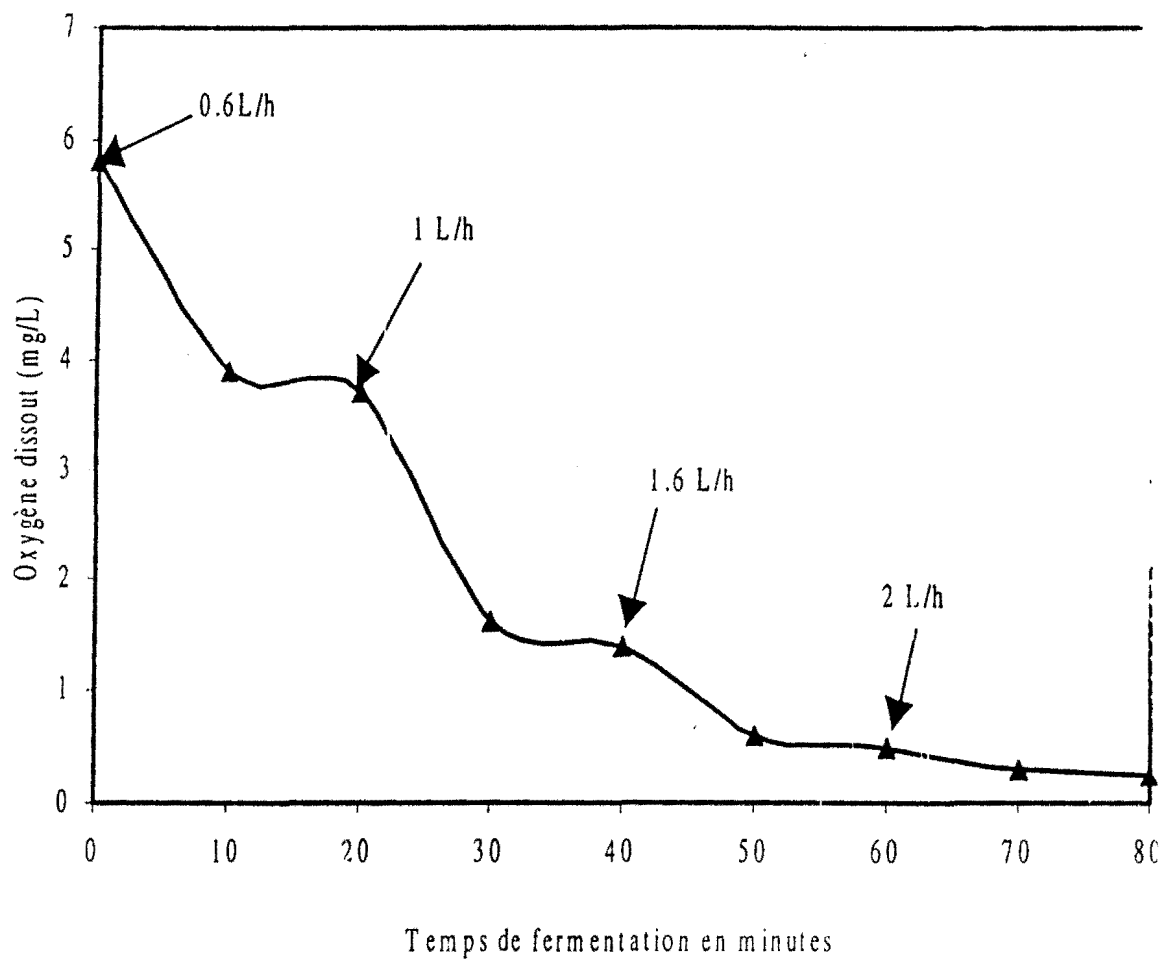


Figure 4.5a. Effet de l'augmentation du débit d'alimentation en lisier et en Perméat de lactosérum sur l'utilisation de l'oxygène dissout par la culture de levures entre 22 et 27°C, à un pH de 4.4, sous un débit de recirculation de 42L/mn.

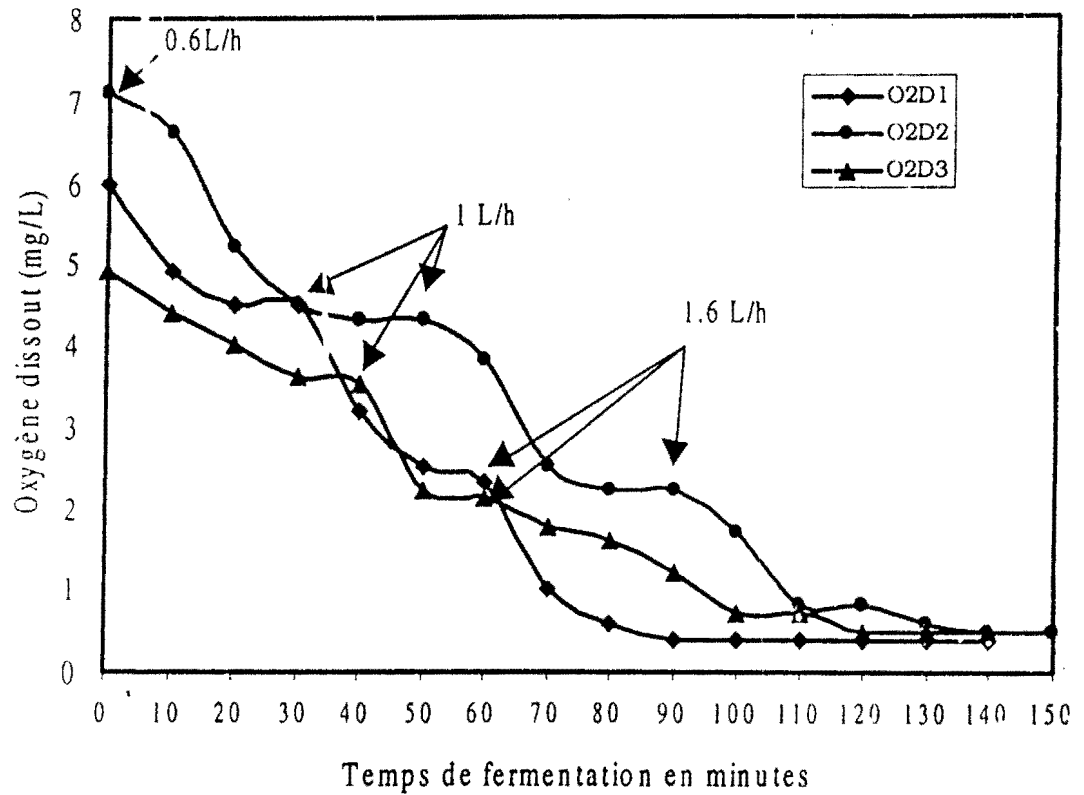
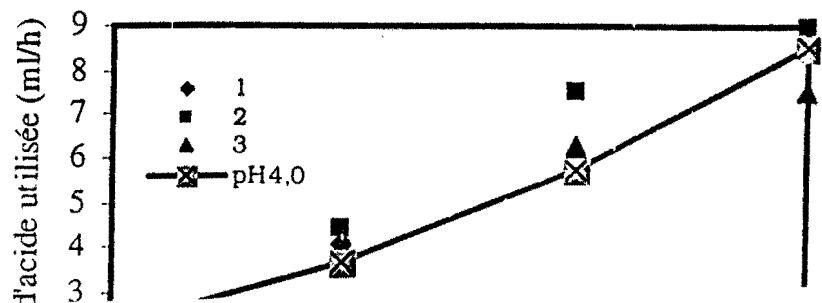


Figure 4.5b. Effet de l'augmentation du débit d'alimentation en lisier et en perméat de lactosérum sur l'utilisation de l'oxygène dissout par la culture de levures entre 22 et 27°C, à un pH de 4.4, sous un débit de recirculation de 42L/mn.



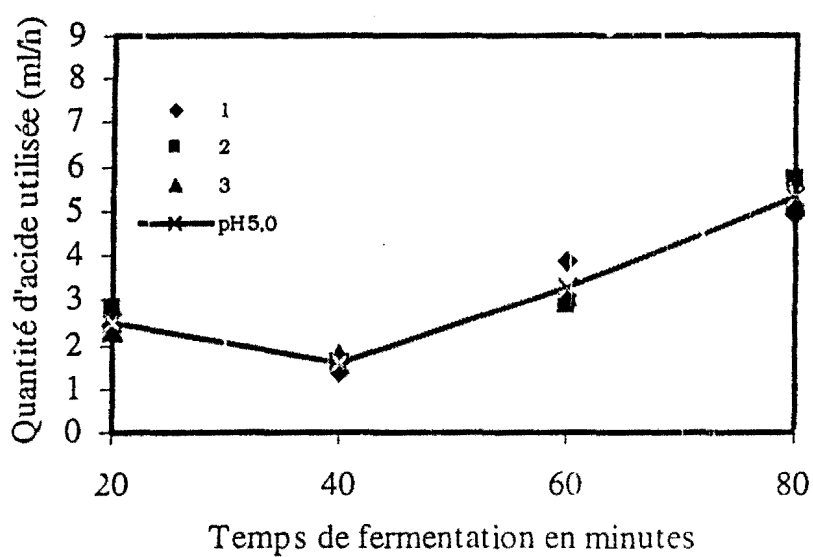
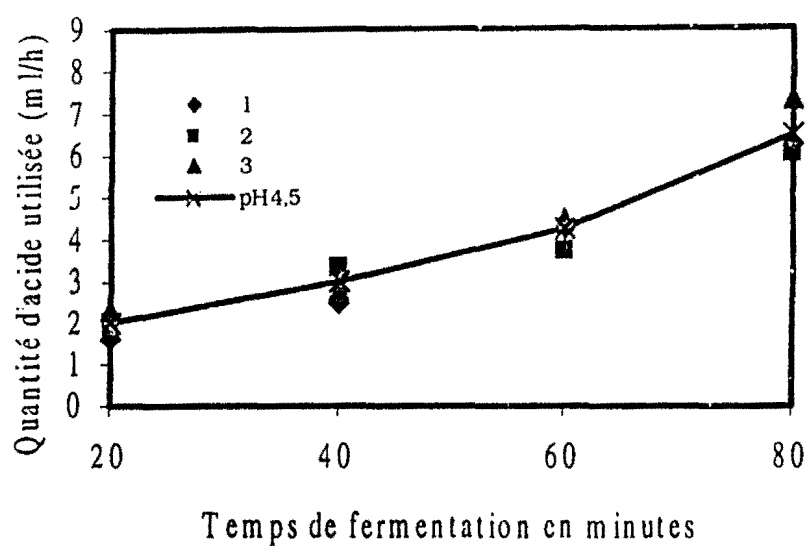


Figure 4.6. Variation de la quantité cumulative d'acide HCL 6N requise pour contrôler (en discontinu) le pH du milieu lisier/perméat en fermentation, entre 22 et 27°C, sous un débit de recirculation de 42L/mn.

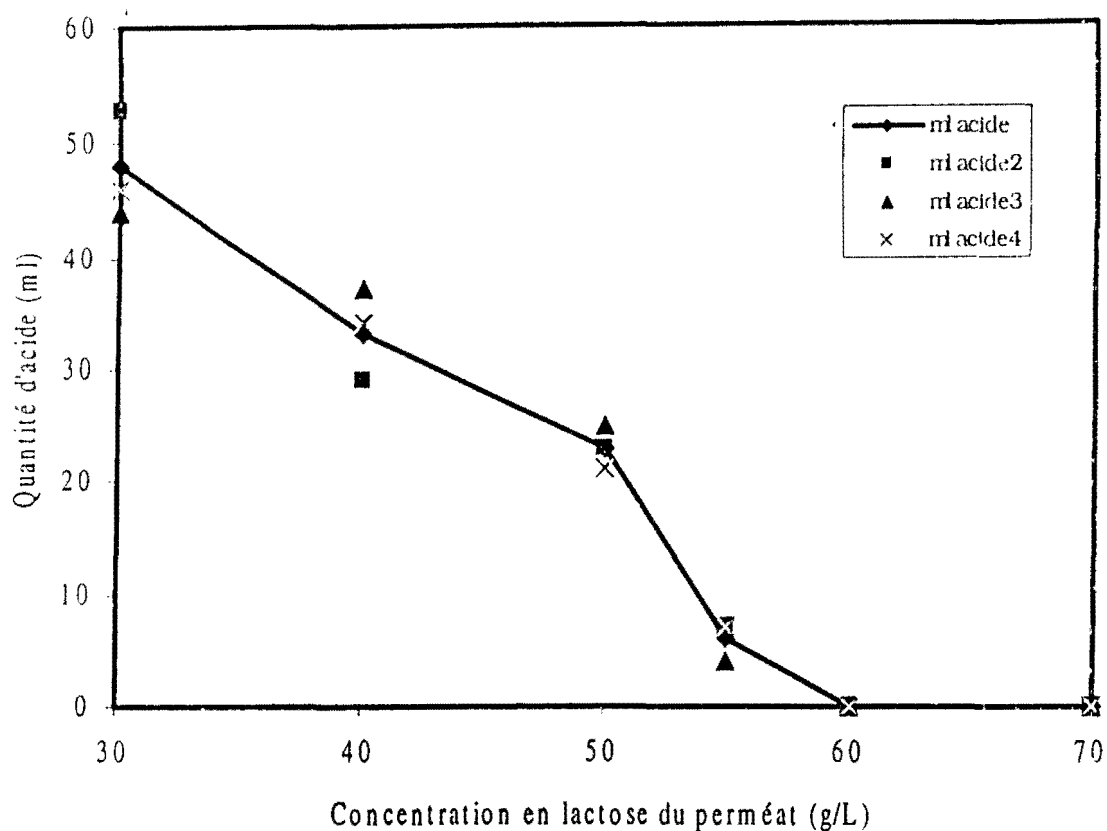


Figure 4.7. Influence de la concentration en lactose du perméat sur la quantité d'acide HCL 6N nécessaire par heure pour contrôler en continu le pH du milieu en fermentation à 4.4, entre 22 et 27°C, sous un débit de recirculation de 42L/mn et pour un débit d'alimentation de 1.6L/h.

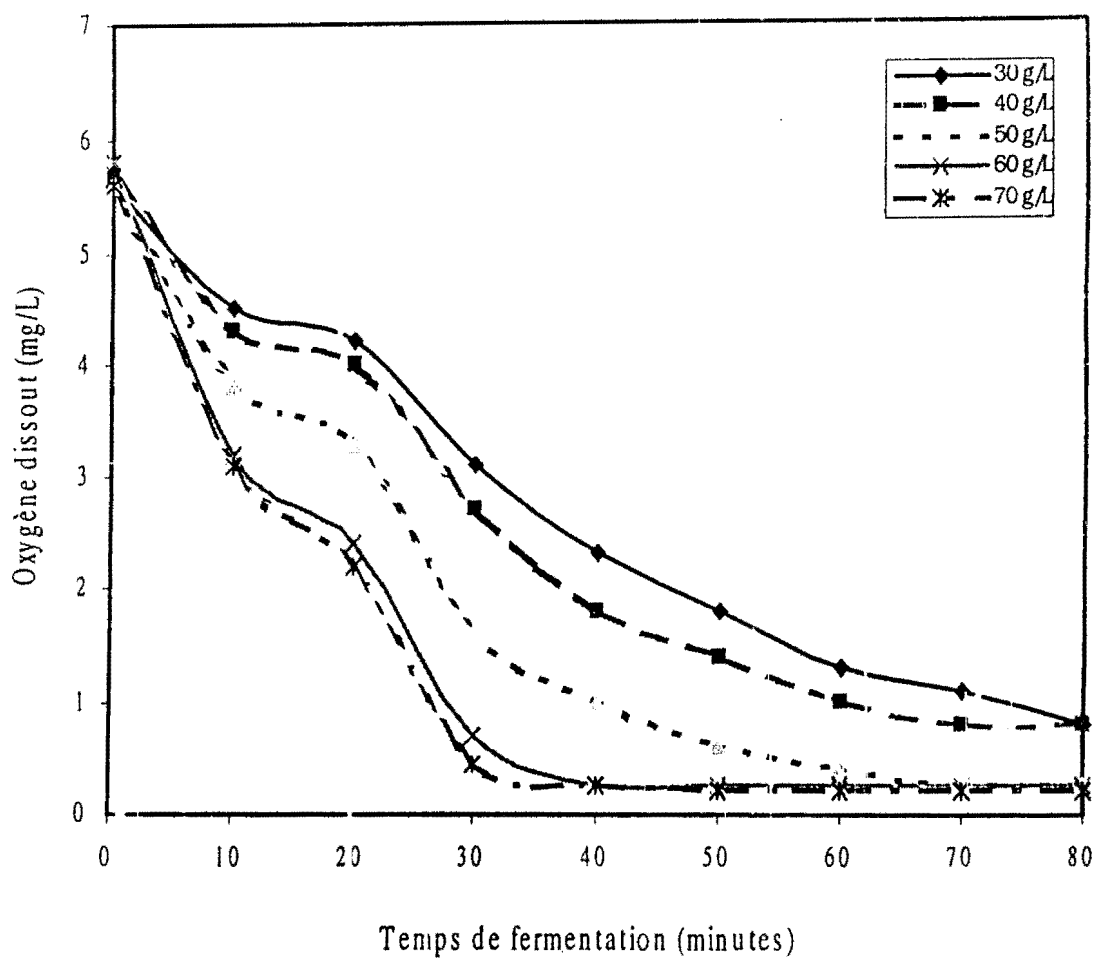


Figure 4.8. Influence de la concentration en lactose du perméat de lactosérum sur l'utilisation de l'oxygène dissout du milieu lisier/perméat de lactosérum en fermentation par une culture de *K. marxianus*, à un taux de dilution ( $D$ ) de  $0.11\text{h}^{-1}$ , après environ 30 minutes de sevrage entre l'injection des différentes concentrations dans le bioréacteur. Ce délai permettait la remontée de l'oxygène dissout à un niveau de 5.5-5.8 ppm.

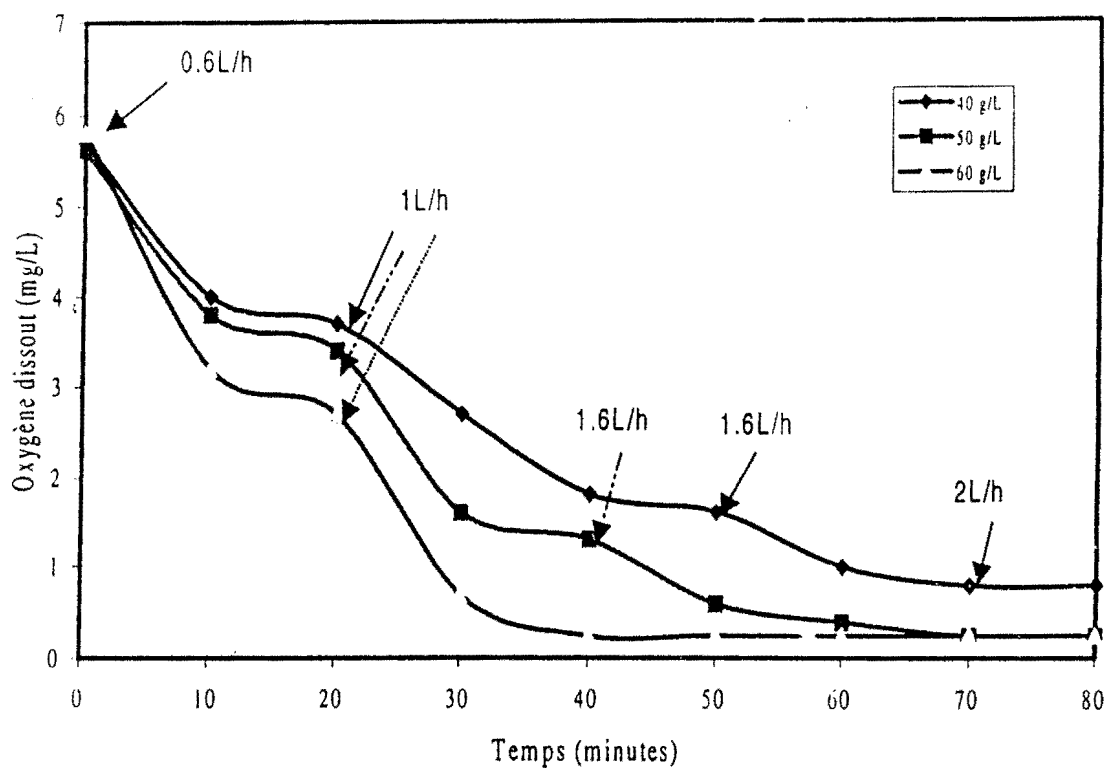


Figure 4.9. Influence de la teneur en lactose du perméat de lactosérum et du débit d'alimentation du milieu lisier/perméat sur la consommation d'oxygène dissout par *K. marxianus*, à 25°C, cultivé en régime continu.

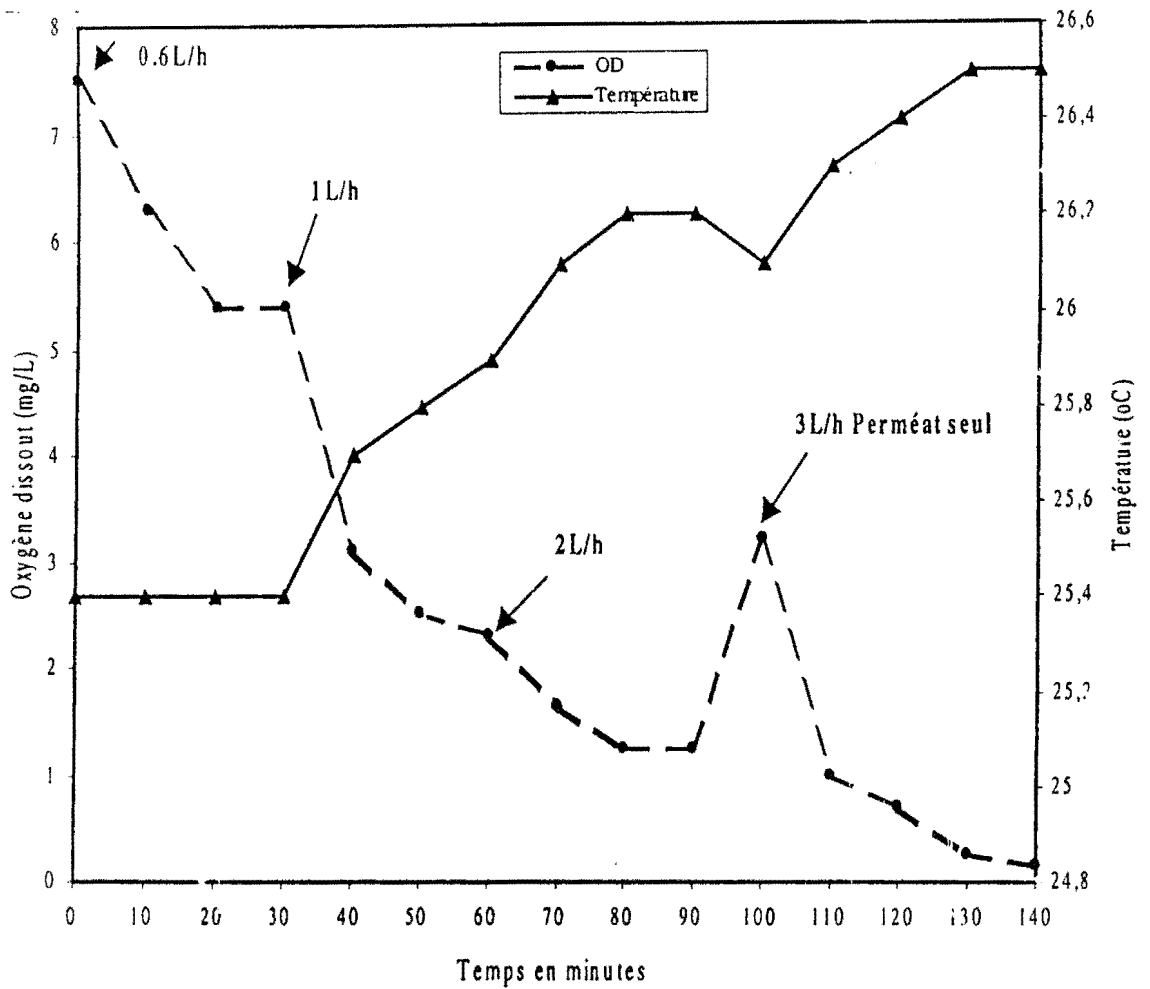
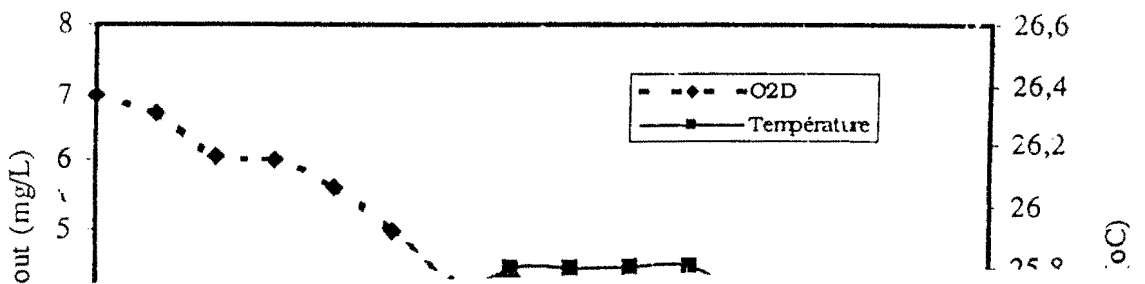


Figure 4.10a. Évolution de l'oxygène dissout et de la température du milieu lisier/permétat de lactosérum en fermentation sous un régime continu, à différents débits d'alimentation du bioréacteur à cellules immobilisées, à pH 4.4, sous un débit de recirculation de 42L/mn.





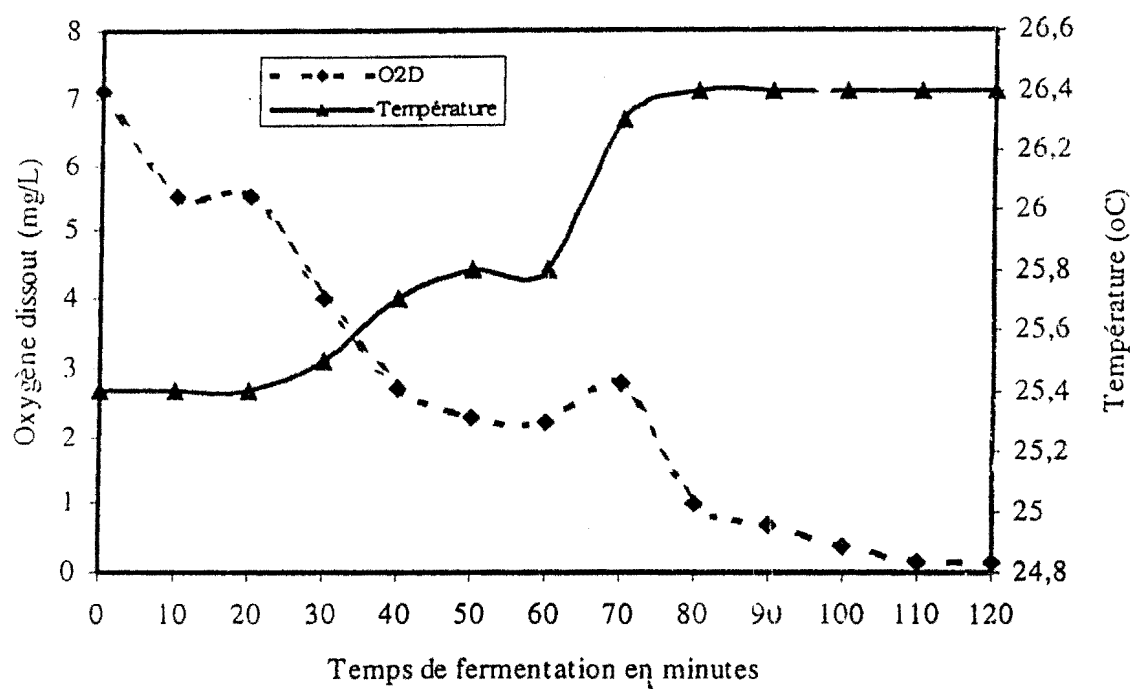


Figure 4.10b. Évolution de l'oxygène dissout et de la température du milieu lisier/perméat de lactosérum en fermentation sous un régime continu, à différents débits d'alimentation du bioréacteur à cellules immobilisées, a pH 4,4, sous un débit de recirculation de 42L/mn.

## Annexe E

## PRINCIPAUX COMPOSÉS MALODORANTS DU LISIER DE PORC

|   |                                 |                                       |
|---|---------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Hydrates de carbone,<br/>lipides</i> |                                 | Acides gras volatils, CO <sub>2</sub> |
| <i>Protéines</i>                        | Composé azoté (tryptophane)     | Indole, scatole, amines               |
|   | Composés soufrés (cystéine)     | Mercaptan, sulfure                    |
|   | Composés phénoliques (tyrosine) | Phénol, crésol                        |
| <i>Urée</i>                             |                                 | NH <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>     |

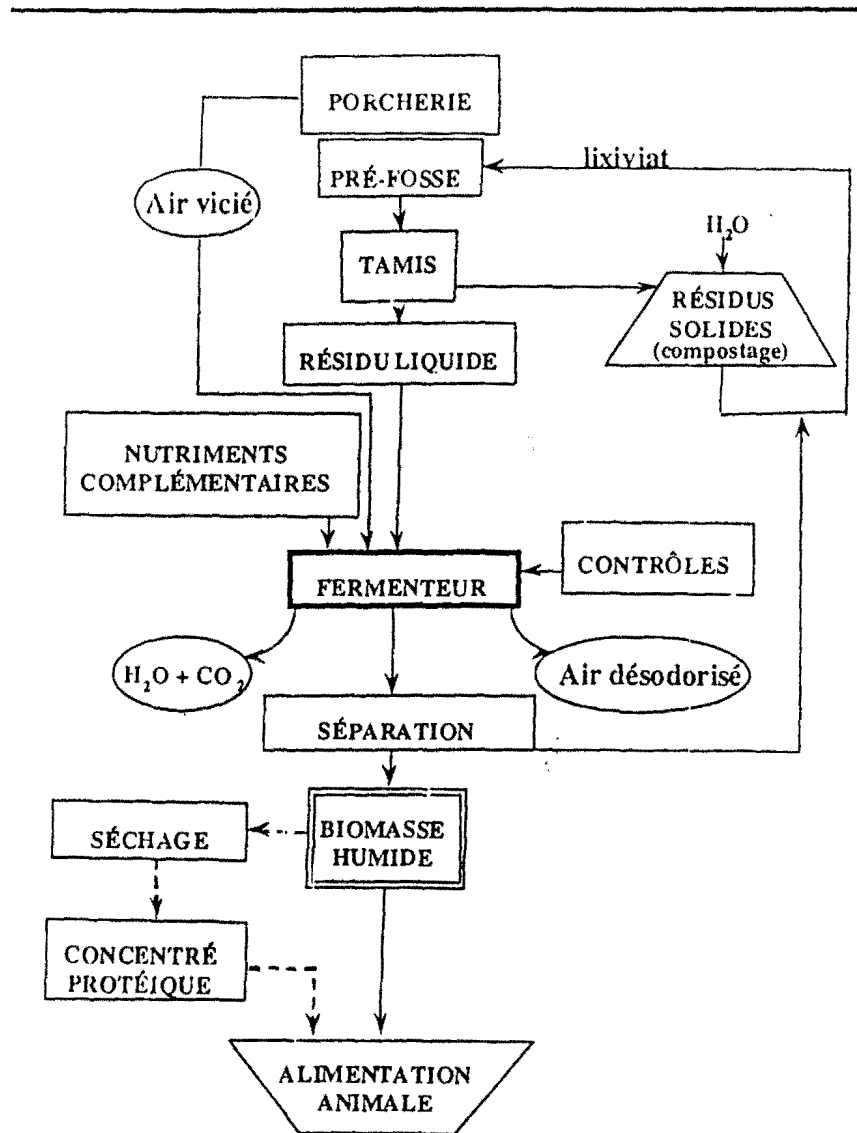


Figure 11. Procédé global d'écoulement du lisier de porc suggéré

## CONCLUSION GENERALE

La présente étude aura donc montré qu'à travers un dispositif simple et peu coûteux<sup>1</sup>, des volumes considérables de lisier peuvent être avantageusement exploités pour des fins alimentaires. Plus spécifiquement, le lisier peut être une source de production de biomasse levurienne riche en protéines s'il est enrichi en substrats carbonés fermentescibles et traité par un processus de fermentation aérée. Cette étude ouvre ainsi une plus large perspective à la façon de disposer de cet effluent qui est au centre des préoccupations des éleveurs de porcs, des riverains et des gouvernements.

### *Contribution à la science*

Concrètement, le présent ouvrage aura apporté un certain nombre de contributions originales :

- a) Les levures peuvent se développer abondamment dans du lisier de porc enrichi de perméat de lactosérum ;
- b) Le perméat de lactosérum peut être utilisé comme substrat carboné fermentescible pour le biotraitement du lisier de porc ;
- c) La levure *K. marxianus* se révèle comme étant particulièrement apte à croître sur un milieu mixte à base de lisier de porc et de perméat de lactosérum ;

---

<sup>1</sup> Le système d'aération n'utilise aucune composante mécanique pour comprimer ou souffler l'air. Le bioréacteur a été conçu pour éviter tout barbotage du milieu (aucun coût pour le contrôle de la mousse) et fonctionne comme une tour de refroidissement. Il en résulte un équilibre entre le refroidissement dû à

- d) Un rapport C/N de 10/1 (ce qui correspond à un mélange d'environ 55% de lisier avec 45% de perméat, vol/vol) suffit pour assurer une croissance abondante des levures ;
- e) Un pH 4.5 s'est montré concluant quant au contrôle de la mousse. En fait, le contrôle de la mousse n'entraîne aucun coût puisque le réacteur a été conçu de manière à prévenir toute turbulence ou barbotage du milieu de fermentation ;
- f) Nous avons contribué au développement d'un bioréacteur à cellules immobilisées présentant un certains nombres de caractéristiques qui font son originalité ;
- g) Le bioréacteur peut supporter divers stress sans conséquence irréversible sur ses performances et l'activité des cellules immobilisées (annexe D);
- h) Ce bioréacteur, bien que ne nécessitant aucun dispositif particulier (par de compresseur ou de soufflante) se révèle très performant quant à l'aération du milieu, et quant à la production de biomasse levurienne ;
- i) Le dispositif que nous avons mis au point pour produire le milieu fermenté s'avère très économique et facilement utilisable sur une ferme porcine ;
- j) Le dispositif a été testé avec succès pendant une année de fonctionnement continue à l'échelle pilote sans bris significatif ;
- k) Le procédé fonctionne en continu et peut être stabilisé par le contrôle de deux paramètres :
  - vitesse de pompage des substrats
  - l'ajout d'acide au moyen d'un titrateur automatique ;
- l) Le processus de fermentation conduit à la production d'un milieu désodorisé ;
- m) Il a été démontré que la biomasse levurienne produite à partir du lisier de porc est riche en protéines et présente un bon profil en acides aminés essentiels ;

---

l'évaporation partielle du milieu et l'élévation de la température. Le produit fermenté sera servi directement aux porcs, évitant ainsi les coûts de centrifugation ou de filtration.

Même si nous n'avons aucune inquiétude quant à l'impact d'une telle alimentation sur les porcs (certaines études précitées ayant établi que les porcs peuvent, sans conséquence sensible être alimentés de lisier simplement aéré), nous espérons tout de même qu'une prochaine étude s'intéressera plus spécifiquement à la question de savoir comment les porcs qui reçoivent la biomasse levurienne ainsi produite comme supplément alimentaire pourront en pratique se comparer avec ceux qui n'en ont pas reçue, en terme de poids, de masse musculaire, de graisse, de goût, de santé etc. Des études sur le caractère probiotique du milieu fermenté lorsque servi à des porcs en croissance pourrait être faite. En outre, une pasteurisation du milieu fermenté pourrait être envisagée de manière à minimiser les risques pour la santé des porcs de façon à inactiver les levures et améliorer leur digestibilité.

## *BIBLIOGRAPHIE*

Aarmink, A. J. A., Keen, A., Metz, J. H. M., Speelman, L. et Versteegen, M. W. A. 1995. Ammonia emission patterns during the growing periods of pigs housed on partially slatted floors. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 62:105-116.

Abreu, M. F. et Berton, R. S. 1996. Comparison of methods to evaluate heavy metals in organic waste. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27(5-8) : 1125-1135.

Adrian, J. et Frangine, R. 1991. *La science alimentaire de A à Z. Technique et Documentation-Lavoisier.* P. 281.

Anderson, G. A. , Smith, R. J. , Bundy, D.S. et Hammond, E. F. 1987. Model to predict gaseous contaminants in swine confinement buildings. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 37 : 235-253.

Andersson, M. 1996. Performance of bedding materials in affecting ammonia emissions from pig manure. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 65: 213-222.

Anonymous June 22, 1978. Feeding animal waste. Report N° 75, p. 1-41.

Anonymous 1972. Public health service. Center for Disease Control, Surveillance bulletin, table 2. Atlanta USA.

AOAC. 1990. Official methods of Analysis, 15<sup>th</sup> edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.

APHA. 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17<sup>e</sup> (ed). AWWA, WPCF. American public Health Association. New-York.

Aquatech, Société de gestion de l'eau Inc. Avril 1983. Traitement du lisier de porc- développement d'un procédé. Ministère de l'environnement du Québec.

Arogo, J., Day, D. L., Christianson, L. et Zhang, R. 1995. Cleaning emissions from confined livestock buildings. Proceedings of the Seventh International Symposium on Wastes 627-636.

Asselin, R. 1992. Gestion des fumiers : problématique à l'échelle de la ferme. Colloque sur la gestion des fumiers, Drummondville, 20 et 21 octobre 1992.

Atkinson, B. et Mavituna, F. 1991. Stoichiometric aspects of microbial metabolism. In Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. 2<sup>nd</sup> Ed., Stockton Press, New York, p.115-128.

Bailey, J. E. et Ollis, D. F. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. 2<sup>nd</sup> Ed., McGraw-Hill, New York.

Barnett, J. A., Payne, R. W. et Yarrow, D. 1990. Yeasts :characteristics and identification. 2<sup>nd</sup> edition. Cambridge University Press, P.1-2.



Beudet, R. et Bisaillon, J.-G. 1993. Étude microbiologique d'un traitement aérobie du lisier de porc à l'usine pilote de St-Elzéar. Centre de recherche en microbiologie appliquée. Institut Armand-frapier.

Bernier, P. J. et Bruneau, Y. 1982. Solutions et moyens.: In Manuel de Gestion Agricole des Fumiers, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation. Québec, p.227.

Bhattacharya, A. N., et Taylor, J. C. 1975. Recycling animal wastes as a feedstuff: A review. *Journal of Animal Science* 41 :1438-1455.

Bisaillon, J.-G, Beudet, R., Sylvestre, M., Ishaque, M., Morin A., Di Franco, E. et Guérin, A.-M. 1984. Aspects microbiologiques du lisier de porc. *Sciences et Techniques de l'Eau* 17(4) : 397-400.

Blouin, M., Bisaillon, J.-G, Beudet, R. et Ishaque, M. 1988. Aerobic biodegradation of organic matter of swine waste. *Biological Wastes* 25: 127-139.

Boggh-Sorensen, T. 1992. Cream pasteurisation technology. *Bulletin of the International Dairy Federation*, p. 32-39.

Borquez R., Espinoza, M. et Ormeno, R. 1994. Effect of storage time and chemical preservatives on the total volatile basic nitrogen content in chilean mackerel (*Trachurus murrphy*) prior to fish meal production. *J. Sci. Food Agric.* 66 :181-186.

Botton, B. 1991. La physiologie des levures. In *Biotechnologie des Levures*, p. 97-158.

- Bourgeois, C. M., Mescl,e J.-F. et Zucca, J. 1996. Pasteurisation et stérilisation thermique. *In* Aspects microbiologiques de la sécurité et de la qualité alimentaire. Microbiologie Alimentaire, tome1. Collection Sciences et Techniques Agro-alimentaires. Lavoisier, p.516.
- Boutin, P. , Tone, M. , Serceau, R. et Rideau, P.-J. 1988. Atmospheric bacteria contamination from land spreading of animal wastes : evaluation of the respiratory risk for people nearby. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 39 :149-160.
- Boze, H., Moulin, G., et Galzy, P. 1992. Production of food and fodder yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* 12 : 65-86.
- Brown, D. E. 1970. Aeration in the submerged culture of microorganisms. *In* *Methods in Microbiology*. Norris J. R. and Ribbons D. W. ed. Academic Press, volume 2: 127-171.
- Bui, K. et Galzy, P. 1990. Food Yeast. *In* *Yeast Technology*. Spencer J. F. T., Spencer D. M. (eds.). Springer-Verlag. p.241-265.
- Burrows, S. 1970. Baker's yeast. P.349-420. *In* A. H. Rose and J. S. Harrison (ed.), *the yeast*, Vol 3. Academic press, Inc.
- Burton, C. H. et Farrent, J. W. 1995. A comparaison of continuous thermophilic and mesophilic aerobic treatments of piggery slurry. *Seven International Symposium on Wastes*, p. 34-43.

Burton, C. H. et Farrent, J. W. 1998. Continuous aerobic treatment of pig slurry: evaluation of options based on long-treatment time and two-stages processing. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 69: 159-167.

Burton, C. H. 1992. A review of the strategies in the aerobic treatment of pig slurry : purpose, theory and method. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 53 : 249-272.

Caouette, P., Géraldo, B., Camil, D. et Sylvain, P. 1993. Le Québec se penche sur les odeurs de lisier. *Inventaire international. Porc magazine* 67, n°255.

Carantino, S. Janvier 1983. Les protéines d'organismes unicellulaires (un avenir mais des choix difficiles). *Biofutur*, p. 17-29.

Castillo, F. J. 1990. Lactose métabolism by yeasts. In : *Yeasts Biotechnology and Biocatalysis*. Ed. H. verachtert and R. De Mot. Marcel Dekker. New york, p. 297-320.

Caswell, L. F., Webb, K. E., Jr et Fontenot, J. P. 1977. Fermentation, nitrogen utilisation, digestibility and palatability of broiler litter ensiled with high moisture corn grain. *Journal of Animal Sciences* 44: 803-813.

Chahal, D. S. et Ishaque, M. 1988. Fermentation du lisier et résidus agricoles pour la production de protéines fongiques. *Sciences et Techniques de l'Eau* 21(1): 27-31.

Champagne, C. P. et Goulet, J. 1988. Growth of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in lactose-hydrolyzed cheese-whey ultrafiltrate. *Can. Inst. Food. Sci. Technol.* 21: 545- 548.

Charmley, E. and O'Reilly, E. 1997. Evaluation of sealmeal as a protein supplement for growing steers. *Canadian Journal of Animal Science* 77: 529-531.

Chen, A., Lias, P. H. and Lo, K. V. 1994. Headspace analysis of malodorous compounds from swine wastewater under aerobic treatment. *Bioresource Technology* 49 :83-87.

Church, D. C. 1991. *Livestock feeds and feeding*. John Wiley and Sons (Ed.).

Church, D. C. et Pond, W. G. 1988. *Basic Animal Nutrition and Feeding*. John Wiley and Sons (Ed.), p.161-221.

Cluis, D. et Couture, P. 1987. Problématique environnementale des rejets d'élevages porcins intensifs. *Sciences et Techniques de l'Eau* 20: (4) 311-314.

Cournoyer, M. S. et Bernier, P. J. 1993. *Porc Magazine* 69. no 255, avril 1993.

Cumby, T. R. 1987. A review of Slurry aeration. Mixing and foaming control. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 36:157-174.

Davidson, K. D., Westerman, P. W., Safley, L. M. et Barker, J. C. 1995. Relative odor levels from production facilities and lagoons. *Proceeding of the Seventh International Symposium on Agriculture and Food Processing wastes*. P. 616-626.

De Waele, M., Donis, P. et Legrand, E. 1974. *Le lisier : Des techniques de traitements*. Centre de Recherches Agronomiques de la Belgique. Ministère de l'agriculture.

Diggs, B. G., Baker, B. Jr. et James, F. G. 1965. Value of pig feces in swine finishing rations. *Journal of Animal Science* 24 :291.

Donhan, K. J., Yeggy J. et Dagne, R. R. 1985. Chemical and physical parameters of liquid manure from swine confinement facilities : health implications for workers, swine and the environnement. *Agricultural Wastes* 14 : 97-113.

Doyle, Y. et De La Noüe, J. 1987. Aerobic treatment of swine manure : Physico-chemical aspects. *Biological Waste* 22 : 187-208.

Doyon, L. 1998. Communication personnelle. Lallemand Inc. Montréal, Canada.

Elliot, L. F., Doran, J. W. et Travis, T. A. 1978. A review of analytic methods of detecting and measuring molodors from animal wastes. *Trans. Of ASAE* 21(1) :130-135.

Erdman, M. D. et Reddy, C. A. 1987. Batch fermentation of cheese-whey supplemented poultry, swine and cattle waste filtrates. *Biological Waste* 22 :23-37.

Evans, M. R., Svoboda, I. F. et Baines, S. 1982. Heat from aerobic treatment of piggery slurry. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 27 : 45-50.

Felsman, R. J., Wise, M. B., Harvey, R. W., et Banick, E. R. 1973. Effet of added dietary levels of copper sulfate and an antibiotic on performance and certains blood constituents of calves. *Journal of Animal Sciences* 31 :157.

Flachowsky, G. et Hennig, A. 1990. Composition and digestibility of untreated and chemically treated animal excreta for ruminants. A review. *Biological Wastes* 31: 17-36.

Legal, C. J., et Zindet, H. C. 1971. Dehydrated poultry waste as a foodstuff in poultry rations. A.S.A.E publ. Proceeding 271 :30.

Fontenot, J. P. 1979. Alternatives in animal wastes utilization-introductory comments. *Journal of Animal Science* 48:111-112.

Fontenot, J. P., et Webb, Jr. K. E. 1975. Health aspects of recycling animal wastes by feeding. *Journal of Animal Science* 40 (6):1267-1277.

Fontenot, J. P., Webb, Jr. K. E., Harmon, B. W., Tucker, R. E. et Moore, W. E. C. 1971. Studies of processing, nutritional value, and palatability of broiler litter for ruminants. *Livestock Waste Management and Pollution Abatement. Proc. Intern. Symp. On Livestock Wastes. Columbus, Ohio*, p. 301.

Fradette, S., Rho, D., Samson, R. et Leduy, A. 1994. Biodegradation of 2,4-Dichlorophen-oxyacetic Acid (2,4-D) by *Pseudomonas cepacia*: Stoichiometric Study. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 72:497-503.

Gangbazo, G. et Buteau, J. 1985. Analyse de la gestion des fumiers dans le bassin versant de la rivière Chaudière. Etat de la situation et élément de solution. Ministère de l'environnement, p.1-24.

Gangbazo, G., Pesant, A. R., Barnett, G., Charest, J.-P et Cluis, D. 1992. Effets des pratiques conventionnelles d'épandage du lisier de porc et des engrais minéraux sur la charge de nitrates dans les eaux de ruissellement et de drainage. Symposium sur la recherche et le développement en gestion environnementale des effluents d'élevage au Québec, 9 et 10 septembre 1992 : textes des conférences, Sainte-Hoy, Envirodoq EN920204, p 27-37.

Gershon, H. et Shanks, L. 1978. Antifungal activity of fatty acids and derivatives : structure activity relationships. In *The Pharmacological Effect of Lipids*. Kabara A. (ed.), p.51-62. Champaign, Illinois : The American Oil Chemists' Society.

Ginnivan, M. J., Woods, J. L. et O'Callaghan, J. R. 1981. Thermophilic aerobic treatment of piggery slurry. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 26: 455-466.

Ginnivan, M. J., Woods, J. L. et O'Callaghan, J. R. 1980. Survival of *Salmonella dublin* during aerobic thermophilic treatment in batch, cyclic and continuous systems. *Journal of Applied Bacteriology* 49 : 13-18.

Gonzalez Siso, M. I. 1996. The biotechnological utilisation of cheese whey : a review. *Bioresources Technology* 57 :1-11.

Gould, G. W., Brown, M. H. et Fletcher, B. C. 1983. Mechanisms of action of food preservation procedures. In *Food Microbiology : Advances and Prospects*. Roberts T. A. and Skinner F. A. (ed.). The society for applied bacteriology symposium series No. 11. P.76-78.





Groenestein, C. M. et Van Faassen. 1996. Volatilization of ammonia, nitrous oxide in deep-litter systems for fattening pigs. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 65:269-274.

Cuerin, A.-M. 1984. Aspect microbiologique du lisier de porc. *Sciences et Techniques de l'Eau* 17 (4) : 397-400.

**Guide Canadien pour l'utilisation du fumier.** 1984. Agriculture Canada, p.5-12.

Harmon, B. G. et Day, D. L. 1975. Nutrient availability from oxidation ditches. In the Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on Livestock Wastes. *Managing Livestock Waste*, p.199-202.

Harmon, B. G. et Day, D. L. 1974. Nutrition value of amino acids produced in an Oxidation Ditch from waste. In *Processing and Management of Agricultural Waste*. Proceeding of the Cornell Agricultural waste Management Conference, p.375-381.

Harmon, B. G., Day, D. L., Jensen, A. H. et Baker, D.H. 1972. Nutritive value of aerobically sustained swine excrement. *Journal of Animal Science* 34 : 403-407.

Heduit, M., Roustan, J. L., Lefèvre, B. et Bernard, C. R. 1978. Valorisation et dégradation des effluents d'élevage porcin. *Journées de la Recherche Porcine en France*, p. 335-361.

Hendrik, Van URK, Postma, E., Alexander, Acheffers, W. et Johannes, P. Van Dijken. 1989. Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *Journal of General Microbiology* 135: 2399-2406.

Henry, D. P., Frost, A. J., Samuel J. L., O'Boyle, D. A. et Thomson, R. H. 1983. Factors affecting the survival of Salmonella and Escherichia coli in anaerobically fermented pig waste. *Journal of Applied Bacteriology* 55 :89-95.

Hitzman, D. O. 1986. The provesteen process, an ultra-high density fermentation. In : *Microbial biomass proteins*, Moo-Young, M. et Gregory, K. F. (éds). Elsevier Applied Science, New-York p.27-32.

Hong, S. S., Pack, M. Y. et Lee, N. H. 1990. Growth of *schizosaccharomyces sp. HL* on supernatant from anaerobically fermented pig waste : effects of VFA concentration and pH. *Biotechnology Letters* 12(4) :309-314.

Horton, B. S. 1995. Whey processing and utilisation. *Bulletin of the International Dairy Federation*, no 308.

Iniguez-covarrubias, G., Robles-cabrera A. et Franco-Gomez, Ma de J. 1994. Continuous solid-substrate fermentation of swine waste recovered solids for pig feed. *Bioresource Technology* 50: 139-147.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). 1974. Proposed guidelines for testing S. C. P. destined as major protein sources for animal feed, technical Report N°12.

Jacob, H.-E. 1970. Redox potential. In *Methods in Microbiology*. Norris J. R. and Ribbons D. W. (ed.), Academic Press, volume 2:92-121.

Jacques, D. 1993. Valorisation des sous produits de l'industrie de transformation du lait. Centre Québécois de la Valorisation de la Biomasse (CQVB), p. 1-15.

Jongbloed, A. W. et Lenis, N. P. 1992. Alteration of nutrition as a means to reduce environmental pollution by pig. *Livestock Production Science* 31 :75-94.

Kamra, D. N. et Srivastava, S. K. 1991. Effet of organic acid and ensilage of cattle dung on the growth of *Clostridium perfringens*. *Bioresource Technology* 37: 115-119.

Kamra, D. N. et Srivastava, S. K. 1994. Effect of sugarcane molasses on fermentation of pig faeces and wheat straw inoculation with lactic acid producing bacteria. *Bioresource Technology* 47: 87-88.

Kilara, A. et Patel, M. T. 1992. Whey and lactose fermentation. In : *Whey and lactose processing*, Zadow, J. G. (éd), p.409-448. Elsevier Applied Science, New-York.

Kornegay, E. T., Holland, M. R., Webb Jr., K. E., Bovard, K. P. et Hedges J. D. 1977. Nutrient characterization of swine fecal waste and utilization of these nutrients by swine. *Journal of Animal Science* 44 : 608-618.

Kosaric, N. et Velayudhan, R. 1991. Biorecovery Processes : fundamental and economic considerations. In *Bioconversion of Waste Material to Industrial Products*, p.19.

Kosikowski, F. V. 1979. Whey utilisation and whey products. *Journal of Dairy Science* 62 :1149-1160.

Kreger-Van Rij, N. J. W. 1984. *The Yeast : a taxonomic study*, 3<sup>e</sup> (éd). Amsterdam. Elsevier Science Publishers.

**Krisop, B. E.** 1988. Culture and preservation in yeasts : In Living Ressources for Biotechnology p. 74.

**Kuroda, K., Osada, T., Yonoga, M., Kanematu, A., Nitta, T., Mouri, S. et Kojima, T.** 1996. Emissions of malodorous compounds and greenhouse gases from composting swine feces. *Bioresource Technology* 56: 265-271.

**Kurtzman, C. P.** 1988. Identification and taxonomy in yeasts : In Living Ressources for Biotechnology, P. 137.

**Laguë, C., Chénard, L., Lagacé, R. et Roy, P.-M.** 1994. Epandage en bandes du lisier de porcs par une rampe automotrice. Université Laval. Rapport final au programme d'aide à la recherche et au développement en environnement.

**Larpent-Gourgaud, M. et Sanglier, J. J.** 1992. Cinétique. *Biotechnologies : principes et méthodes*. Doin (ed.).

**Lefèvre, B., Heduit, M., Bernard, C.R. et Roustan, J. L.** 1978. Réduction des nuisances olfactives lors de l'épandage du lisier. Journées Recherche Porcine en France, p.363-383.

**Lemelin, M., Fillion, R. et Simard, T.-H.** 1992. La gestion de l'alimentation du porc: un moyen efficace de réduction des effluents et du volume de lisier. Colloque sur la gestion des fumiers. Drummondville, 20 et 21 octobre 1992.

**Lenis, N. P.** 1991. Lower nitrogen excretion in pig husbandry by feeding :current and future possibilities. Netherlands. *Journal of Agricultural Science* 37 ;61-70.

**Lin, Jih-Gaw, Chang Cheng-Nan et Chang, Shou-Chung.** 1997. Enhancement of anaerobic digestion of waste activated sludge by alkaline solubilization. *Bioresource Technology* 62: 78-84.

**Maheux, B., Paquin Y., Marinier, B., Savard, M. et Dermas, R.** 1996. Valorisation du lisier de porc et des résidus des scieries de la MCR de la Mitis. Université du Québec à Rimouski. Rapport final au plan vert du Canada # 22-873-257-01015. 47p.

**Mahmoud, M. M. et Kosikowski, F. V.** 1978. *Journal of Dairy Science* 61 :114.

**Massé, D. I., Droste R. L., Kennedy K. et Patni N. K.** 1995. Operation strategies for psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors. Seventh International Symposium on Agricultural and Food Processing Wastes 330-346.

**Mawson, A. J.** 1994. Bioconversion for whey utilisation and waste abatement. *Bioresources Technology* 47 : 195-203.

**McCaskey, T. A. et Anthony, W. B.** 1979. Human and Animal health aspects of feeding livestock excreta. *Journal of Animal Science* 48 : 163-177.

**McCaskey, T. A. et Antony, W. B.** 1975. Health aspects of feeding animal waste conserved in silage. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on Livestock Wastes, 21-24 April, Urbana-Champaign. II. ASAE.230-233.

- McCaskey, T. A., Sutton, A. L., Lincoln, E. P., Dobson, D. C. et Fontenot, J. P. 1985. Safety aspects of feeding animal wastes. *Agricultural Waste: Utilization and Management. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Livestock Wastes.* 16-17 December. Chicago IL, ASAE, 13-85, 275-285.
- Merkel, J. A. 1981. *Fundamental of Applied microbiology.* In managing Livestock wastes. Chapitre 3. AVI publishing Company, Inc.
- Miskiewicz, T., Oleszkiewicz, J. A., Kosinska, K., Koziarski, S., Kramarz, M. et Ziobrowski, J. 1982. Dynamic tests on yeast production from piggery effluents. *Agricultural Wastes* 4 :3-15.
- Moal, J. F. 1994. Mise en évidence des émissions ammoniacales issues des épandages de lisier en Bretagne. *Journées Recherche Porcine en France* 26: 117-122.
- Moon, N. J. 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology* 55: 453-460.
- Moulin, G. et Galzy, P. 1984. Whey, a potential substrate for biotechnology : In *Biotechnology and Genetic Engineering Review.* (ed .) Gordon E. Russell 1 : 347-367.
- Moulin, G., Legrand, M. et Galzy, P. 1983. The importance of residual aerobic fermentation in aerated medium for the production of yeast from glucidic substrates. *Process Biochemistry* 18 (5): 5.
- Nadeau, J. B. 1996. Maudits cochons (environnement). Dans la revue *L'Actualité*; décembre 1996, P. 42-52.

NCR. 1980. Mineral tolerances of domestic animals. National Academy of Sciences. Washington, D. C.

Oleszkiewicz, J. A., Kosinska, K. et Koziarski, S. 1979. Piggery wastewater fermentation by yeasts. *Environment Protection Engineering* 5(2) : 155-162.

Owen, P. W. 1989. Fermentation Raw materials. In *Fermentation Biotechnology: Principles, Processes and products*. Prentice Hall Advanced Reference Series, p 59-66.

Paca, J. 1980. Bioengineering aspects of aerobic microbial piggery waste treatment. Part II. Effect of controlled conditions on growth of microflora and efficiency of biodegradation. *Process Biochemistry* 15 :7-15.

Painter, H. A. 1985. Biochemistry of Waste Treatment. In *Comprehensive Biotechnology: The principles, Applications and regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medecine*. Murray Moo-Young (ed.), P. 776-777.

Pampul'ia, M. E. et Loureiro-Dias, M. C. 1990. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34 : 375-380.

Patel, C. et Madamwar, D. 1997. Biomethanation of salty cheese whey using an anaerobic rotating biological contact reactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83 (N°5): 502-504.

Pearce, G. R. 1975. The inclusion of pig manure in ruminant diets. *Managing Livestock Wastes* 218-221.

**Percheron, G., bernet, N. et Moletta, R.** 1997. Start-up of anaerobic digestion of sulfate wastewater. *Bioresource Technology* 61: 21-27.

**Perera, A., Ugalde, U., Rodriguez, I. and Serra J. L.** 1993. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: application in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme Microbiology and Technology*, 15 :418-423.

**Reed, G.** 1982. Production of bakers'yeast. In *Industrial microbiology*. Reed G. (ed.). Wesport, Avi, p. 593-633.

**Rivière, J.** 1975. *Les applications industrielles de la microbiologie*. Masson et Cie (éd.). Paris.

**Ritter, W. F.** 1989. Odour control of livestock wastes : State-of-the-Art in north America. *Journal of Agricultural Engineering Resources* 42 : 51-62.

**Robert, G. Y., Smith, L. W. et Calvert, C. C.** 1975. Recovery of nutrient from animal waste- An overview of existing options and potentials for use in feed. *Managing Livestock Wastes* 192-194.

**Robinson, K. , Saxon, J. R. et Baxter, S. H.** 1971. Microbiological aspects of aerobically treated swine wastes. *Proceeding of the international symposium on livestock wastes*. American Society of Agricultural Engineers, St. Joseph, Michigan, p.225-228.



**Roig, M. G., Rodrigez, M. J. M., Cachaza, J. M., Mendoza, Sanchez L. et Kennedy, J. F.** 1993. Principles of biotechnological treatment of industrial wastes. *Critical Reviews in Biotechnology* 13 (2) : 99-116.

**Roger, S. H.** 1970. U-S. Patent 3846558. Method for converting animal waste products into a food supplement.

**Rose, A. H. et Harrison, J. S.** 1987. In *The Yeasts : Yeasts and the environment.* (Rose A. H. and Harrison J. S., eds), 2<sup>nd</sup> edn, vol. 2, Academic Press, London

**Royce, P. N.** 1993. A discussion of recent developments in fermentation monitoring and control from a practical perspective. *Critical Reviews in Biotechnology* 13(2): 117-149.

**Russell, G. E. et Diez-Gonzalez, J. B.** 1998. The effect of fermentation acids on bacterial growth. In *Avances in Microbial Physiology.* Poole R. K. (ed.), Academic Press 39 : 206-230.

**Ryder, D. N.** 1988. Hydrolyse of lactose in whey products. *Bulletin of the International Dairy Federation*, P.45-52

**Senez, J. C. (ed.),** 1983. *Proceeding of the International Symposium on Single Cell Proteins*, Technical Document., Lavoisier, Paris, 9.

**Shay, L. K. et Weggner, G. H.** 1986. Nonpolluting conversion of whey permeate to food yeast protein. *Journal of Dairy Science* 69 (3): 676-683.

- Shukla, T. P. 1975.  $\beta$ -galactosidase technology : A solution to the lactose Problem. CRC Critical Review of Food Technology 5 : 325-356.
- Simard, R.-E. 1992. Technique de fabrication du cidre. Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation. Université Laval.
- Slaughter, J. C. 1988. Nitrogen metabolism. P.58-75. In Physiology of Industrial Fungi. D. R. Berry (ed.), Blackwell Scientific Publications.
- Smith, L. W. 1973. Recycling animal wastes as Proteine sources. In : Proceedings, alternative sources of proteine for animal production. National Academy of Sciences, p.146-173.
- Smith, L. W. et Calvert, C. C. 1976. Dehydrated broiler excreta versus soybean as nitrogen supplements for sheep. Journal of Animal Science 43 : 1286.
- Smith L., W. et Wheeler, W. E. 1979. Nutritional and economic value of animal excreta. Journal of Animal Science 48:144-156.
- Solomons, G. L. 1983. Single Cell Protein. CRC Critical Review in Biotechnology 1: 21-85.
- Spencer-Martins, I. 1994. Transport of sugar in yeasts : implications in the fermentation of lignocellulosic materials. Biotechnology Ressources 50 : 51-57.
- Spoelstra, S. F. 1980. Origin of the objectionable odorous components in piggery wastes and the possibility of applying indicator components for studying odorous development. Agriculture and Environment 5 : 241-260.

Sturley, S. L. et Young, T. W. 1988. In Yeast Biotechnology: genetic manipulation of commercial yeast strains, p 1.

Sylvestre, M. et Blais, S. 1986. Etude de la faisabilité de l'évaluation toxique des eaux souterraines brutes ou traitées de la ville de Mercier. Institut Armand-Frappier. RD-86-02.

Tahoun, M. K., El-merheb, Z., Salam, A. et Youssef, A. 1987. Biomass and lipids from lactose or whey by *Tricosporon beigellii*. Biotechnology and Bioengineering, 29(3) : 358-360.

Tiquia, S. M., Tam, N. F. Y. et Hodgkiss, I. J. 1997. Effet of turning frequency on composting of spent pig-manure sawdust litter 62: 37-43.

Tomoo, S. 1989. Microbiology conversion: production of single cell protein. In Biomass Handbook. Osamu Kitani and Carl W. Hall (ed.), P.243-254.

Turner, C. et Colin, H. B. 1997. The inactivation of viruses in pig slurries: A review. Bioresource Technology 61: 9-20.

Vartak, D. R., Engler, C. R., Mcfarland, M. J. et Riccke, S. C. 1997. Attached-film media performance in psychrophilic anaerobic treatment of dairy cattle wastewater. Bioresource Technology 62: 85-93.

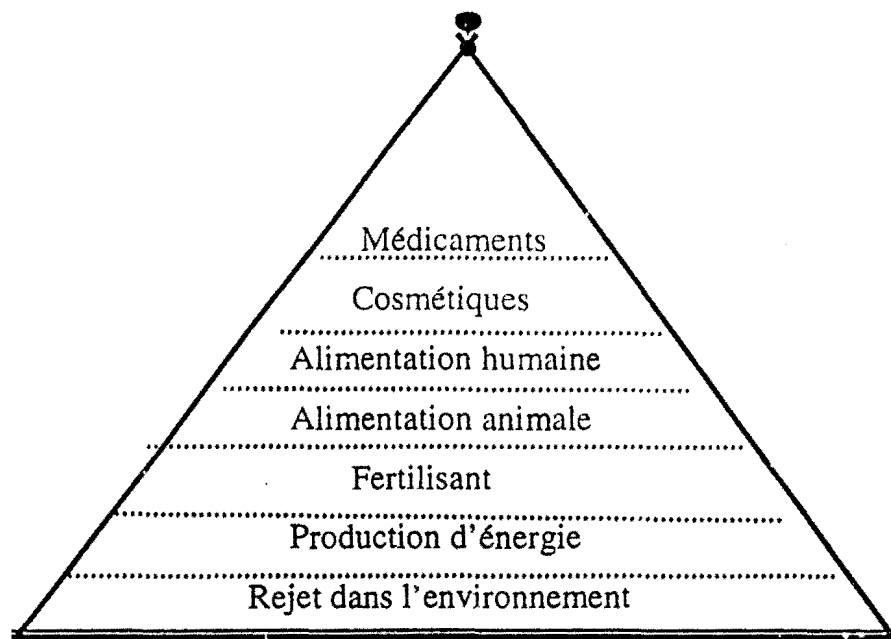
Vasey, R. B. et Powell, K. A. 1984. Single-Cell Protein. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, vol.2 : 285-311.

- Visser, R. A., Van den Boss, M. J. et Ferguson, W. P. 1988. Lactose and its chemical derivatives. Bulletin of the International Dairy Federation, p.33-44.
- Vriens, L., Nihoul, R. et Verachtert, H. 1989. Activated sludges as animal feed : A review. Biological wastes 27 : 161-207.
- Webb, K. E. JR. et Fontenot, J.P. 1975. Mediccinal drug residues in broiler litter and tissue from cattle fed litter. Journal of Animal Science 41 : 1212.
- Westerman, P. W., Safley, L. M., Jr. Baker, J. C. et chescheir, C. M. 1985. Available nutrients in livestock waste. Proceeding of the fith International Symposium on Agricultural wastes. 295-307.
- Williams, A. G. et Evans, M-R. 1981. Storage of piggery slurry. Agricultural Wastes 3:311-321.
- Zadow, J. G. 1984. Lactose : Properties and uses. Journal of Dairy Science 67 : 2654-2679.
- Zhang, R. H., Dugba, P. N. et Bundy, D. S . 1997. Laboratory study of surface aeration of anaerobic lagoons for odor control of swine manure. Transaction of the ASAE 40 : 185-189.

## ANNEXES

## Annexe A

## DIFFÉRENTS PALIERS DE VALORISATION DES SOUS PRODUITS INDUSTRIELS



**Annexe B****CALCUL DU RAPPORT CARBONE :AZOTE****LACTOSE**

342 g de lactose / mole de lactose et 144 g de carbone ( c ) / mole de lactose

$$\% \text{ massique} = \frac{144 \text{ g C/mole de lactose}}{342 \text{ g lactose/mole de lactose}} = 41\%$$

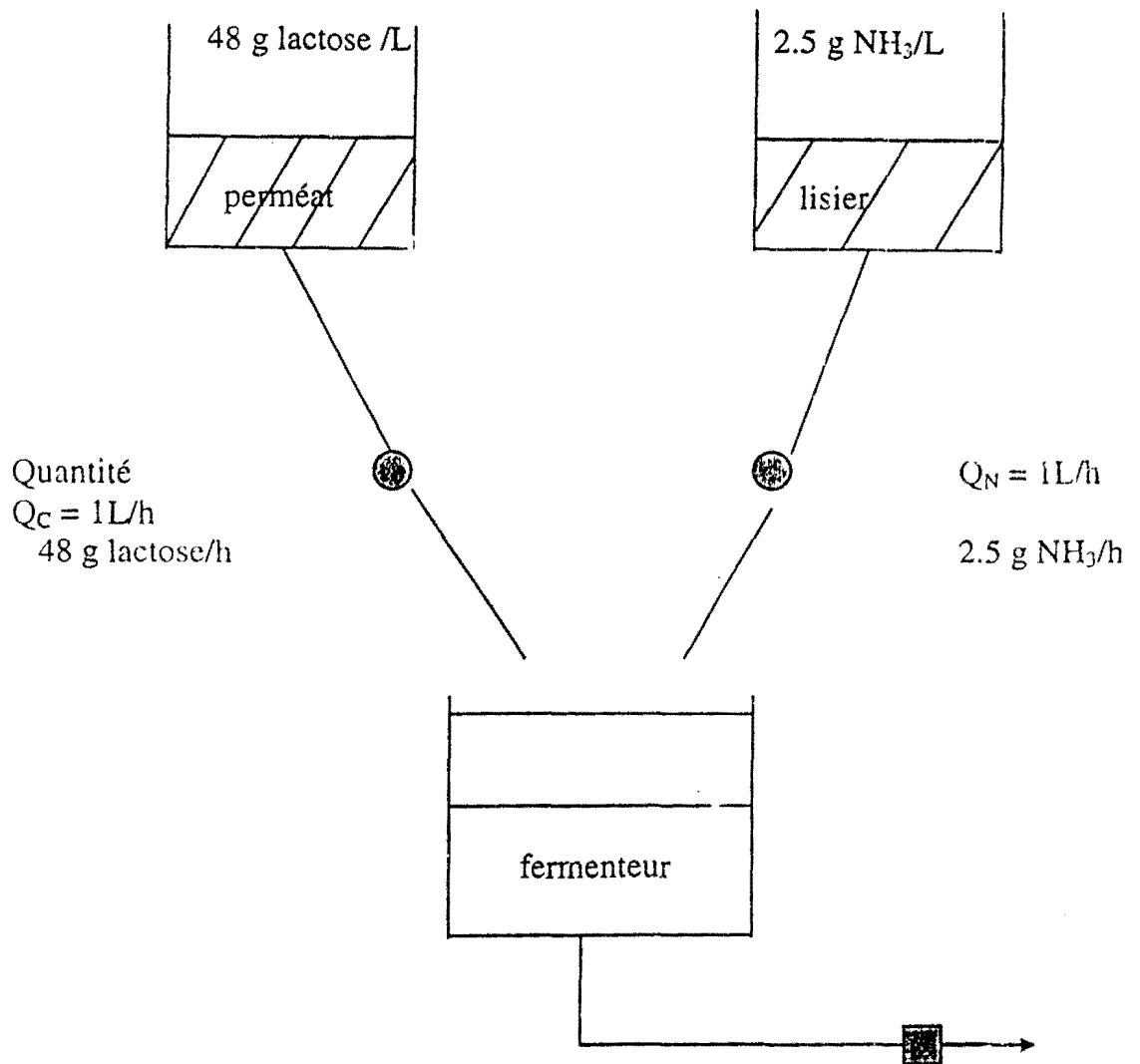
|                       |
|-----------------------|
| 41 g C /100 g lactose |
|-----------------------|

**AMMONIAC (NH<sub>3</sub>)**

17 g ammoniac /mole ammoniac et 14 g d'azote (N) / mole d'ammoniac

$$\% \text{ massique} = \frac{14 \text{ g N/ mole ammoniac}}{17 \text{ g ammoniac/mole ammoniac}} = 78\%$$

|                      |
|----------------------|
| 78 g N/100g ammoniac |
|----------------------|



Exemple A : composition du milieu LP

$$\frac{C}{N} = \frac{Q_c}{Q_n} = \frac{1 \text{ L solution perméat/h}}{1 \text{ L solution lisier/h}} \times \frac{48 \text{ g lactose}}{1 \text{ L solution perméat}} \lambda \frac{1 \text{ L lisier}}{2.5 \text{ g NH}_3}$$

$$= \frac{48 \text{ g lactose}}{2.5 \text{ g NH}_3} \times \frac{41 \text{ g C}}{100 \text{ g lactose}} \times \frac{100 \text{ g NH}_3}{78 \text{ g N}}$$

$$= \frac{48 \times 41 \times 100}{2.5 \times 100 \times 78} \frac{\text{g C}}{\text{g N}}$$

|   |
|---|
| $\frac{\text{g C}}{\text{g N}} = \frac{\text{C}}{\text{N}} \text{ massique} = 10$ |
|---|

Exemple B : composition de l'effluent (milieu fermenté)

150 mg lactose / L

100 mg NH<sub>3</sub> / L

$$= \frac{150 \text{ mg lactose}}{100 \text{ mg NH}_3} \times \frac{41 \text{ mg C}}{100 \text{ mg lactose}} \times \frac{100 \text{ mg NH}_3}{78 \text{ mg N}}$$

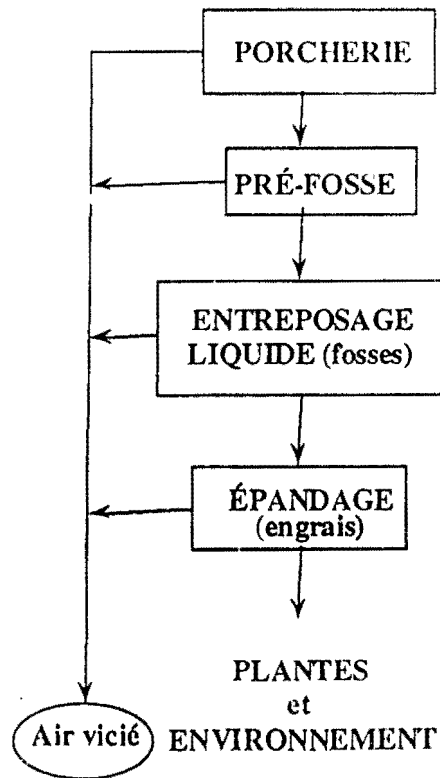
$$= \frac{150 \times 41 \text{ mg C}}{100 \times 78 \text{ mg N}} = 0.8 \frac{\text{mg C}}{\text{mg N}}$$

|  |
|--|
| $\frac{\text{g C}}{\text{g N}} = \frac{\text{C}}{\text{N}} \text{ massique} = 0.8$ |
|--|



Annexe C

SCHÉMA D'ÉCOULEMENT ACTUEL DU LISIER DANS LES PORCHERIES



## Annexe D

### STABILITÉ DU BIORÉACTEUR

Le bioréacteur peut supporter divers stress sans que ses performances en soient affectées de façon irréversible.

En effet le bioréacteur complet (coquille et supports) a été entreposé pendant trois semaines à des températures de congélation variant de  $-20^{\circ}$  à  $-5^{\circ}\text{C}$ . Une fois réinstallé à température ambiante ( $\sim 22^{\circ}\text{C}$ ), les cellules ont repris leur activité si bien que le bioréacteur n'a pas eu besoin d'un nouvel inoculum de levures pour continuer de fermenter efficacement le lisier et le lactosérum.

Le réacteur a aussi été soumis au cours des phases de démarrage en culture *batch* et *fed-batch*, à des fluctuations extrêmes de pH (2 à 8) sans conséquences irréversibles sur l'activité des cellules et l'efficacité de conversion des substrats. Tout au plus avons nous observé un certain ralentissement de l'activité qui redevenait normal en 24 à 48 h.

Les résultats obtenus en contrôlant grossièrement le pH du milieu (voir tableau 3.3) indiquent que le maintien de ce dernier à 4,5 a nécessité une forte consommation d'acide inorganique; en effet, il a fallu régulièrement en rajouter pour maintenir le pH au niveau désiré, celui-ci ayant constamment tendance à remonter au delà de 4,5, l'optimum visé. Cette situation, si elle n'était pas corrigée, pourrait engendrer des coûts de fermentation importants

## Annexe D

### STABILITÉ DU BIORÉACTEUR

Le bioréacteur peut supporter divers stress sans que ses performances en soient affectées de façon irréversible.

En effet le bioréacteur complet (coquille et supports) a été entreposé pendant trois semaines à des températures de congélation variant de  $-20^{\circ}$  à  $-5^{\circ}\text{C}$ . Une fois réinstallé à température ambiante ( $\sim 22^{\circ}\text{C}$ ), les cellules ont repris leur activité si bien que le bioréacteur n'a pas eu besoin d'un nouvel inoculum de levures pour continuer de fermenter efficacement le lisier et le lactosérum.

Le réacteur a aussi été soumis au cours des phases de démarrage en culture *batch* et *fed-batch*, à des fluctuations extrêmes de pH (2 à 8) sans conséquences irréversibles sur l'activité des cellules et l'efficacité de conversion des substrats. Tout au plus avons nous observé un certain ralentissement de l'activité qui redevenait normal en 24 à 48 h.

Les résultats obtenus en contrôlant grossièrement le pH du milieu (voir tableau 3.3) indiquent que le maintien de ce dernier à 4,5 a nécessité une forte consommation d'acide inorganique; en effet, il a fallu régulièrement en rajouter pour maintenir le pH au niveau désiré, celui-ci ayant constamment tendance à remonter au delà de 4,5, l'optimum visé. Cette situation, si elle n'était pas corrigée, pourrait engendrer des coûts de fermentation importants

L'utilisation d'une forte quantité d'acide pour maintenir le pH autour de 4,5 peut s'expliquer par un pouvoir tampon élevé du milieu (90-100 ml de HCl pour faire baisser le pH de 3 à 5 unités). A cet effet et selon Owen (1989), les orthophosphates (qui constituent une composante non négligeable du perméat de lactosérum) contribueraient au pouvoir tampon du milieu de culture.

Tableau 3.3: Influence d'un contrôle grossier du pH sur la croissance des levures en suspension dans le perméat de lactosérum en fermentation (30 L).

| Temps (jours) | Nombre de Levures (cfu/ml) | pH avant Neutralisation | HCl concentré ajouté (ml) | pH après neutralisation | Température (°C) |
|---------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------|
| T = 0         | $5.5 \times 10^5$          | 8.2                     | 90                        | 5.1                     | 32               |
| T = 1         | $1.2 \times 10^7$          | 8.2                     | 100                       | 2.8                     | 34.2             |
| T = 2         | $2.6 \times 10^7$          | 6.8                     | 50                        | 4.9                     | 33.3             |
| T = 3         | $5.7 \times 10^7$          | 5.9                     | 40                        | 4.2                     | 32               |
| T = 4         | $6.1 \times 10^7$          | 5.6                     | 20                        | 4.4                     | 29.3             |