

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Centre Eau Terre Environnement

**ÉTUDE, DÉVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ DE  
FERMENTATION DU LACTOSÉRUM POUR LA PRODUCTION DE  
BIOMASSE MICROBIENNE**

Par  
Amine Mahmoudi

Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
Philosophiae doctor (Ph.D.)  
en sciences de l'eau

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur externe

Denis Groleau  
Université de Sherbrooke

Examineur externe

Claude Champagne  
Centre de Recherche et Développement sur les Aliments

Examineur interne

Guy Mercier  
INRS Centre Eau Terre Environnement

Directeur de recherche

R. D. Tyagi  
INRS Centre Eau Terre Environnement

Codirecteur de recherche

José R. Valero  
INRS Centre Eau Terre Environnement



## PRÉFACE

La présente étude s'insère dans le cadre d'un projet de recherche ayant pour objet de solutionner une problématique industrielle liée à un procédé de fermentation du lactosérum (LS) pour la production de biomasse microbienne. Ce procédé (BIOCOMPACT) montrait d'importantes dérives au niveau de l'équilibre de la flore de fermentation, constituée à la base d'une culture mixte de deux levures et d'une bactérie lactique. Avec ces dérives, des rendements très faibles de production de biomasse et d'abaissement de la charge polluante caractérisaient le procédé. À partir de ce contexte industriel, une problématique a été dégagée afin de rechercher des réponses de fond sur l'amélioration de la performance d'un procédé de fermentation du LS à culture mixte. Il s'agit d'une problématique relativement complexe où l'adoption d'une approche méthodologique séquentielle s'imposait afin d'acquérir un niveau de connaissance permettant de cerner les paramètres critiques et de trouver des solutions extrapolables à l'échelle industrielle pour améliorer les performances du procédé.

L'approche de recherche adoptée dans ce projet a comporté une première phase d'observation portant sur l'équilibre de la flore microbienne dans le fermenteur industriel (Corporation HET, St-Prime, Lac-St-Jean, Qc), ainsi qu'une analyse des problématiques technologiques liées à l'étape de la fermentation. Au cours de cette phase, beaucoup d'efforts ont été investis afin de maximiser notre compréhension de la dynamique microbienne de la flore au cours de la fermentation. Elle a constitué une étape cruciale de collecte de données ayant permis de donner une orientation à l'axe de recherche et de dégager une problématique scientifique claire et objective.

Le présent manuscrit comporte, à la suite d'une revue de la littérature, un chapitre préliminaire mettant en évidence une compilation des données techniques et microbiologiques les plus marquantes, responsables des faibles performances du procédé industriel : la composition de la flore au cours des fermentations, la déviation de l'équilibre de la culture mixte et les limitations inhérentes à la composition du substrat et à la stratégie de traitement en amont (*Upstreaming*) adoptée. Par la suite, un récapitulatif permet d'intégrer les problématiques industrielles et prépare le terrain à l'approche de recherche à adopter.

L'approche adoptée a consisté, en premier recours, à étudier le noyau de base du procédé de fermentation en focalisant sur la souche principale de levure lactose positive, *Kluyveromyces marxianus*. La cinétique de croissance en culture pure de *K. marxianus* dans le lactosérum a donc été étudiée afin de caractériser son métabolisme (levure *Crabtree* négative et respirofermentaire). Par la suite, un remodelage de la flore de fermentation a été effectué en criblant plusieurs cultures mixtes, constituées à partir d'un pool d'espèces microbiennes isolées du procédé, en fonction de leurs capacités à produire de la biomasse et à dégrader la charge organique du rejet. Enfin, une approche de caractérisation des interactions régissant la relation entre les membres de la culture mixte sélectionnée a été effectuée à partir des cinétiques de production et de consommation des métabolites au cours de la fermentation du lactosérum.

Il est primordial d'attirer l'attention du lecteur sur les considérations suivantes : toutes les fermentations réalisées dans cette étude (en fiole ou en fermenteur, préliminaires ou principales) ont été effectuées à partir d'inocula bien caractérisés (souches pures), dans des conditions rigoureusement contrôlées. Aucune fermentation «spontanée» ou aléatoire n'a été effectuée au cours de cette étude.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Professeur R.D. Tyagi, de m'avoir accordé l'opportunité d'être le premier étudiant à travailler sur ce projet de recherche industriel dans le cadre du programme de doctorat en Sciences de l'eau du Centre Eau Terre Environnement de l'INRS. Merci de m'avoir aidé à développer les connaissances scientifiques requises pour mener à bien le projet de recherche.

Je remercie vivement la compagnie LactoScience inc., et à sa tête, M. François Courteau, pour la confiance accordée dans la réalisation de ce projet. La contribution de cette compagnie dans l'aboutissement de ce travail de recherche s'est concrétisée par un soutien logistique et financier importants grâce notamment à l'octroi de la bourse BMP Innovation, financée en collaboration avec le FQRNT et le CRSNG.

Plus particulièrement, j'adresse mes vifs remerciements à messieurs Jacques Goulet et Christophe Le Lay, avec lesquels j'ai collaboré au sein de LactoScience inc. Vos qualités scientifiques et humaines très distinguées m'ont été d'une grande aide lors de la réalisation de cette thèse de doctorat. Que notre collaboration puisse aboutir à l'industrialisation du procédé de production de biomasse à partir des rejets agroalimentaires.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont cordialement accepté d'évaluer ce travail, à savoir messieurs Denis Groleau, Claude Champagne, Guy Mercier et José Valero.

Mes remerciements vont ensuite à mes collègues et amis (François Chabot, Mathieu Drouin et Tarek Rouissi) ainsi qu'à tout le personnel administratif et scientifique du Centre ETE-INRS, et plus particulièrement à Jean-Daniel Bourgeault. Je remercie aussi les membres de mon équipe avec lesquels j'ai collaboré de près ou de loin tout au long de mes études.

Je remercie de tout cœur ma famille, mes parents et mon frère, ainsi que ma belle-famille, de m'avoir soutenu, et ce, malgré la distance qui nous a séparé. Finalement, je réserve un remerciement très particulier à celle qui m'a soutenu durant toutes ces années de doctorat pour son amour, son dévouement, sa solidarité et surtout sa patience, mon épouse Mariem. Cet ouvrage t'est spécialement dédié... pour la place que tu occupes dans ma vie.



## RÉSUMÉ

La gestion des déchets agroalimentaires représente un facteur limitant l'expansion des industriels dans le domaine de l'agroalimentaire. Le lactosérum représente un exemple type d'un rejet posant une problématique coûteuse et très exigeante sur le plan environnemental pour les producteurs de fromage. Cette problématique, principalement reliée au contenu en lactose du lactosérum, est combinée à un contrôle réglementaire de plus en plus strict auquel sont soumis les transformateurs. Malgré cela, une proportion significative des 180 milliards de litres de lactosérum produits à travers le monde sur une base annuelle reste non traitée. Il en résulte donc un manque à gagner significatif sur le potentiel nutritionnel du lactosérum suite à l'extraction des protéines sériques en raison de la faible valeur économique du lactose résiduel. Le présent projet s'articule autour du développement, de l'analyse et de l'optimisation d'un procédé de production de biomasse par fermentation du lactosérum. Dans un premier temps, l'analyse de la dynamique microbienne d'un procédé industriel de fermentation du lactosérum a permis de mettre en évidence la dégradation de l'équilibre de la flore mixte utilisée (composée de *K. marxianus*, *S. unisporus*, *L. fermentum*) se caractérisant par la contamination du fermenteur par une levure sauvage, *C. krusei*, rendant le produit fini non conforme à son autorisation réglementaire de commercialisation. D'un point de vue cinétique, la non-compétitivité de la flore due à sa dérive, couplée à un faible apport en oxygène, ont été à l'origine de rendements de conversion du lactose en biomasse et épuratoires très faibles et économiquement non rentables.

Dans un deuxième temps, l'étude de la cinétique de croissance de la souche principale du procédé, *K. marxianus*, a montré que les conditions optimales de pH, de température et de concentration en lactose pour une production optimale de biomasse (3.99, 31.2°C et 28.34 g/L, respectivement) sont différentes de celles requises pour une dégradation optimale de la DCO (3.16, 40.7°C et 16.6 g/L, respectivement). La maximisation des rendements du procédé requiert donc l'emploi de *K. marxianus* en association avec d'autres souches afin d'améliorer les capacités épuratoires du procédé et de contrer la contamination de la flore. Ainsi, un criblage de plusieurs mélanges microbiens a permis de choisir la culture mixte la plus efficace en termes de rendements en biomasse et épuratoires. L'optimisation des conditions de croissance du mix choisi a permis d'obtenir des rendements supérieurs à ceux exhibés par le mix composant la flore du procédé industriel (la production de biomasse et le rendement épuratoire sont de 45% et 55% plus élevés, respectivement). Finalement, l'étude des cinétiques de production et de consommation de métabolites au cours de la fermentation du lactosérum, basée sur l'analyse des profils des acides organiques et des glucides, a permis de dresser des profils de production et d'assimilation de ces composés, aboutissant ainsi à l'approfondissement des connaissances du métabolisme des levures *Crabtree* négatives (telles que *K. marxianus* et *C. utilis*) en termes de canalisation du flux carboné entre la production de biomasse et celle de métabolites. De même, les résultats rapportés ont permis de déterminer la nature des interactions microbiennes entre les différentes populations (commensalisme et compétition combinée au mutualisme) de la culture mixte et de s'assurer de la stabilité de celle-ci au cours de la fermentation du lactosérum.

Le procédé développé a abouti à la production d'une biomasse à valeur ajoutée et au potentiel nutritif très intéressant pour une application dans le domaine de l'alimentation humaine et animale. De plus, la qualité du rejet généré confère à l'utilisateur du procédé une solution de choix pour le traitement et la disposition du lactosérum avec un avantage économique certain.

Cette étude représente la première pierre angulaire dans le processus d'industrialisation du procédé dont la prochaine étape sera d'opérer sa mise à l'échelle afin d'assurer une bonne transition du laboratoire à l'usine.

## ABSTRACT

Whey is a costly and environmentally challenging issue for cheese makers. The issue is related to organic content combined with increased regulatory scrutiny. Notwithstanding, of the 180 billion liters of whey that are produced annually on a worldwide basis, a significant portion of it is not processed. As a result, there is a missed economic opportunity emanating from the extraction of the original protein content in whey and the generation of a highly polluting waste due to its lactose content. The reason is that it is capital intensive for smaller cheese makers due to the low economic value of the residual lactose after the original whey protein extraction.

The present project deals with the development, the analysis and the optimization of a microbial biomass production process through whey fermentation. First, the microbial dynamic analysis of an industrial whey fermentation process showed a significant flora deviation triggered by the contamination and the proliferation of the undesirable wild yeast *C. krusei* in the fermenter. This flora equilibrium imbalance resulted in the non-conformity of the final product according to its initial specifications stated by the regulatory approval. From a kinetic point of view, the low competitiveness of the flora due to its significant deviation, coupled to a low oxygen supply, resulted in low lactose to biomass conversion yields and purification efficiencies and thus rendering the process economically unprofitable.

Secondly, the kinetic study of the process flora main strain, the yeast *K. marxianus*, showed that optimal operational conditions, namely pH, temperature and initial lactose content, required for highest biomass production (3.99, 31.2°C et 28.34 g/L, respectively) and efficient polluting charge degradation was 3.16, 40.7°C et 16.6 g/L, respectively. Maximizing both of the responses requires the association of the lactose positive *K. marxianus* yeast with other strains in order to enhance biomass yields as well as purification efficiencies without being forced to operate a trade-off between them. Hence, a screening of several microbial mixes allowed selection of an efficient mixed culture in terms of biomass production and epuratory efficiency. Cultivation conditions optimization of the selected mix allowed higher yields and productivities compared to those exhibited by the industrial mix previously used (biomass production and epuratory efficiency are 45% and 55% higher, respectively). Finally, metabolite production and consumption kinetics during whey fermentation, based on the analysis of organic acids and carbohydrates profiles, allowed to draw up patterns of production and assimilation for these compounds. These patterns contributed in deepening the knowledge of the Crabtree negative yeasts (*K. marxianus* and *C. utilis*) metabolism in terms of carbon flux split between biomass production and metabolite secretion. Moreover, the reported results allowed determining the nature of the microbial interactions between the mixed culture microbial populations (commensalism and combined competition and mutualism) and, hence, verifying its stability during whey fermentation.

The developed process led to the production of a high value added biomass characterized by an interesting nutritive profile for an application in human and/or animal alimentation. Moreover, the quality of the residual process wastewater offers to the user a profitable solution for the treatment and the disposal of whey. The present study represents the first cornerstone in the industrialization strategy which the next step would be process scale up in order to ensure successful transition from the laboratory to the plant scale.



# TABLE DES MATIÈRES

PREFACE .....	iii
REMERCIEMENTS .....	v
RÉSUMÉ.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TABLE DES MATIÈRES .....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xxi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	3
1.1. Le lactosérum .....	3
1.1.1. Quantités produites et charge polluante .....	3
1.1.2. Utilisation du lactosérum .....	4
1.1.3. Procédés de production de biomasse à partir du lactosérum.....	9
1.2. Les cultures mixtes .....	19
1.2.1. Les cultures mixtes dans les procédés biotechnologiques .....	19
1.2.2. Types d'interactions microbiennes.....	21
1.2.3. Exemples de cultures mixtes pour la production de biomasse.....	25
1.2.4. Avantages de l'utilisation des cultures mixtes .....	29
CHAPITRE 2 : CONTEXTE DU PROJET ET ÉTUDE PRÉLIMINAIRE.....	31
2.1. Historique du projet – le procédé Biocompact .....	31
2.1.1. Dynamique de la flore microbienne de fermentation.....	32

2.1.2.	Cas de la levure <i>Candida krusei</i> .....	33
2.1.3.	Rendements épuratoire et de production de biomasse du procédé Biocompact .....	38
2.2.	Récapitulatif de l'étude préliminaire et contexte du projet .....	40
CHAPITRE 3 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE .....		43
3.1.	But du projet .....	43
3.2.	Hypothèses de recherche .....	43
3.3.	Objectifs de recherche .....	45
CHAPITRE 4 : MÉTHODOLOGIE .....		47
4.1.	Souches utilisées : isolement, identification et conservation .....	47
4.2.	Préparation du substrat de fermentation .....	48
4.3.	Conditions de fermentation pour les cultures en fioles agitées .....	48
4.4.	Procédure d'optimisation multivariée et analyses statistiques .....	49
4.5.	Fermentation en réacteur de laboratoire .....	52
4.6.	Analyses Physicochimiques et microbiologiques.....	53
4.6.1.	Préparation des échantillons et analyses physicochimiques .....	53
4.6.2.	Profils des acides organiques et des glucides.....	55
4.6.3.	Analyses microbiologiques .....	56
4.7.	Détermination des paramètres cinétiques .....	58
4.8.	Détermination des taux de transfert et de consommation de l'oxygène et du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène.....	59
CHAPITRE 5 : CINÉTIQUES DE DÉGRADATION DE LA DCO ET DE PRODUCTION DE BIOMASSE DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> CULTIVÉE SUR LE LACTOSÉRUM ....		61
5.1.	Approches d'optimisation multivariée .....	61
5.2.	Méthodologie du plan d'expériences et d'optimisation multivariée .....	64
5.3.	Résultats et discussion .....	66

5.3.1.	Caractérisation de la cinétique de croissance de KM.....	66
5.3.2.	Optimisation de la production de biomasse et de la dégradation de la DCO.....	73
5.3.3.	Mise à l'échelle du procédé optimisé.....	84
5.3.4.	Profils du taux de transfert d'oxygène (OTR) et du taux de consommation d'oxygène (OUR) lors de la culture de KM.....	89
5.4.	Conclusion.....	93
CHAPITRE 6 : DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION CINÉTIQUE D'UN PROCÉDÉ DE FERMENTATION DU LACTOSÉRUM UTILISANT UNE CULTURE MICROBIENNE MIXTE .....		97
6.1.	Approche méthodologique .....	98
6.1.1.	Criblage des consortiums microbiens .....	98
6.1.2.	Optimisation multivariée de la production de biomasse, de la teneur en protéine et de la dégradation de la DCO du mix sélectionné et analyses statistiques.....	99
6.2.	Résultats et discussions .....	100
6.2.1.	Criblage des mélanges microbiens.....	100
6.2.2.	Comparaison des performances du consortium sélectionné par rapport au consortium industriel.....	105
6.2.3.	Optimisation des conditions de croissance du mélange sélectionné.....	106
6.2.4.	Fermentation en batch du mélange KM-LF-CU en fermenteur de laboratoire.....	112
6.2.5.	Évaluation des performances du procédé.....	123
6.2.6.	Qualités du produit fini et de l'effluent de fermentation.....	127
6.3.	Conclusion.....	128
CHAPITRE 7 : ÉTUDE DES CINÉTIQUES DE PRODUCTION ET DE CONSOMMATION DES MÉTABOLITES DANS LA CULTURE MIXTE ET DÉTERMINATION DE LA NATURE DES INTERACTIONS MICROBIENNES.....		129

7.1. Méthodologie pour l'étude de la production et la dégradation de métabolites par les souches du mix microbien.....	129
7.1.1. Fermentations du lactosérum pour l'étude de la production et de la consommation de métabolites.....	131
7.2. Résultats et discussion.....	132
7.2.1. Cinétiques de production des métabolites par les souches lactose positives .....	132
7.2.2. Cinétiques de croissance de CU sur les substrats à base de métabolites de KM et KM-LF	137
7.2.3. Cinétique de croissance de KM cultivée sur les métabolites produits par LF .....	142
7.2.4. Identification des métabolites et étude de leurs cinétiques de production et de consommation .....	144
7.3. Discussion.....	160
CONCLUSION .....	167
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	173
ANNEXE 1 : Identification de souches microbiennes dans le procédé Biocompact.....	183
ANNEXE 2 : Profils biochimiques déterminés par API et séquences d'ADNr des souches identifiées .....	185
ANNEXE 3 : Métabolisme diauxique de KM et calcul du coefficient de maintenance.....	189
ANNEXE 4 : Qualité du produit fini et de l'effluent de fermentation.....	193
ANNEXE 5 : Paramètres d'agitation, de transfert et de consommation d'oxygène au cours de la culture de KM sur le PLS (Chap. 7).....	195

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1- Composition moyenne d'un LS doux.....	4
Tableau 2- Caractéristiques techniques de procédés industriels de production de biomasse .....	13
Tableau 3- Exemples de procédés à cultures mixtes pour la production de biomasse.....	25
Tableau 4- Taux de contamination de la flore Biocompact par <i>C. krusei</i> .....	34
Tableau 5- Niveaux des facteurs du Plan Central Composite appliqué à des cultures pures de KM sur le LS .....	64
Tableau 6- Paramètres cinétiques de <i>K. marxianus</i> cultivée pure dans le LS durant les expériences de criblage .....	70
Tableau 7- Conditions expérimentales et résultats du Plan Central Composite .....	75
Tableau 8- ANOVA sur la production de biomasse .....	76
Tableau 9- Analyse de régression avec les valeurs codées et non codées .....	77
Tableau 10- ANOVA pour le rendement épuratoire.....	82
Tableau 11- Expériences de validation de l'optimisation multi-réponses (KM cultivée pure sur le LS en fioles).....	83
Tableau 12- Caractérisation cinétique de KM cultivée pure durant les expériences en fermenteurs .....	87
Tableau 13- Niveaux des variables étudiées et leurs valeurs respectives .....	100
Tableau 14- ANOVA sur les résultats de criblage (Fig. 10) après 24h et 36h de fermentation*.....	102
Tableau 15- Comparaison entre les performances cinétiques des mélanges KM-LF-CU et KM-CK au cours de fermentations effectuées en fermenteurs de 5L.....	106
Tableau 16- Conditions expérimentales du plan central composite et ses résultats.....	107
Tableau 17- Résultats des ANOVA effectuées sur les facteurs significatifs .....	108
Tableau 18- Coefficients de régression des termes de chaque modèle.....	109

Tableau 19- Valeurs optimales de chaque facteur et estimation des réponses correspondantes pour le mélange KM-LF-CU.....	110
Tableau 20- Caractérisation cinétique de la culture mixte cultivée sur le milieu PLS avec différentes tailles d'inoculum.....	114
Tableau 21- Valeurs des paramètres cinétiques du mélange KM-LF-CU dans les conditions optimales de culture sur PLS.....	116
Tableau 22- Assimilation des sources de carbone par les 3 souches du mélange.....	130
Tableau 23- Protocole de fermentation pour l'étude de la production et de la consommation des métabolites .....	131
Tableau 24- Valeurs des paramètres cinétiques des cultures KM et KM-LF pour la production de métabolites .....	134
Tableau 25- Cinétiques de croissance de CU cultivée sur les métabolites des souches lactose-positives.....	139
Tableau 26- Composition du perméat de lactosérum en glucides et en acides organiques .....	144
Tableau 27- Taux de conversion du lactose en métabolites dans les cultures de souches lactose-positives (mg/g lactose).....	153
Tableau 28- Taux de consommation des métabolites (g/L.h) .....	153
Tableau 29- Principaux microorganismes identifiés au cours de la fermentation industrielle ...	183
Tableau 30- Profils API 20C AUX pour l'identification des levures .....	185
Tableau 31- Profils API 50 CHL pour l'identification des Lactobacilles.....	186
Tableau 32- Exemple de calcul du coefficient de maintenance m (g <sub>s</sub> /g <sub>x</sub> .h) de la culture de KM sur le PLS .....	191
Tableau 33- Composition physicochimique des biomasses produites par fermentation du LS..	193
Tableau 34- Composition physicochimique du LS et de l'effluent après séparation de la biomasse .....	194

## LISTE DES FIGURES

Figure 1- Différents procédés de valorisation du lactosérum (Panesar & Kennedy, 2012, Siso, 1996).....	5
Figure 2- Occurrence de la contamination par <i>C. krusei</i> et sa persistance dans la flore de fermentation .....	34
Figure 3- Différentes étapes de l'approche d'optimisation multivariée.....	51
Figure 4- Fermenteurs BioStat B Plus de 5L avec leur panneau de contrôle.....	53
Figure 5- Effet de la température sur (A) le taux de croissance spécifique ( $\mu$ ; h <sup>-1</sup> ) et (B) le quotient métabolique ( $q_{\text{lactose}}$ ; g/g.h), selon le modèle d'Arrhenius (La température est exprimée en °Kelvin) .....	69
Figure 6- Modèles polynomiaux de la production de (A) biomasse et (B) de la dégradation de la DCO en fonction du <i>pH</i> et de la concentration de lactose .....	79
Figure 7- Profils des taux de transfert et de consommation de l'OD et du $K_{La}$ au cours de la fermentation du lactosérum par KM en conditions optimales .....	90
Figure 8- Profils du taux de transfert et de consommation de l'OD et du $K_{La}$ au cours de la fermentation du lactosérum par KM en conditions optimales avec supplémentation en minéraux .....	91
Figure 9- Profils des taux de transfert (OTR) et de consommation (OUR) de l'OD et de $K_{La}$ au cours de la fermentation du perméat de LS dans les conditions optimales (les valeurs de 3 paramètres suivis correspondent à une moyenne de deux fermentations indépendantes) .....	93
Figure 10- Criblage des mélanges microbiens après 36h de fermentation du LS en fioles agitées .....	101
Figure 11- Fermentation de <i>C. utilis</i> sur le filtrat de centrifugation de KM-LF cultivés sur le perméat de LS Conditions de culture : <i>pH</i> =4.5; T=35°C.....	104
Figure 12- Courbes des modèles polynomiaux de (A) Production de biomasse, (B) Teneur en protéines et (C) consommation du lactose en fonction du <i>pH</i> et la température ( <i>T</i> ).....	111

Figure 13- Cinétiques de croissance du mix KM-LF-CU dans les conditions optimales de croissance. Les valeurs représentent des moyennes de 3 fermentations indépendantes effectuées dans un fermenteur de 5L sur le PLS, dans les mêmes conditions (pH=4.4; T=34.8°C; [lactose]=35g/L; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM) ..... 115

Figure 14- Profils de OTR, OUR et  $K_{La}$  durant les cultures batch de KM-LF-CU sur le PLS dans les conditions optimales. Chaque valeur est une moyenne de 2 mesures effectuées sur 2 fermentations indépendantes ..... 120

Figure 15- Cinétiques de croissance des souches du mélange durant la fermentation du PLS dans les conditions optimales de croissance. Les valeurs représentent des moyennes de 3 fermentations indépendantes effectuées dans un fermenteur de 5L, dans les mêmes conditions (pH=4.4; T=34.8°C; [lactose]=35g/L; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM)..... 122

Figure 16- (A) Cinétiques de fermentation de KM-LF-CU cultivé sur le PLS à 50g/L de lactose. (B) Cinétiques de croissance de chacune des souches du consortium durant la même fermentation. Les valeurs représentent une moyenne de 2 mesures effectuées sur 2 fermentations indépendantes. Conditions : pH=4.4; T=34.8°C; [lactose]=35g/L; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM..... 125

Figure 17- (A) Cinétiques de fermentation de KM-LF-CU cultivé sur le LS à 50g/L de lactose. (B) Cinétiques de croissance de chacun des souches du consortium durant la même fermentation. Les valeurs représentent une moyenne de 2 mesures effectuées sur 2 fermentations indépendantes. Conditions : pH=4.4; T=34.8°C; [lactose]=35g/L; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM..... 126

Figure 18- Cinétiques de production de biomasse, de consommation de lactose et de production de métabolites de KM cultivée sur le PLS. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM ..... 134

Figure 19- Cinétiques de production de biomasse, de consommation de lactose et de production de métabolites par la co-culture KM-LF cultivée sur le PLS. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM ..... 136

Figure 20- Détermination du coefficient de maintenance  $m$  (g/g.h) pour la culture KM-LF sur le PLS ..... 137

Figure 21- Cinétiques de production de biomasse de CU et de consommation de métabolites produits par KM Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM .....	138
Figure 22- Cinétiques de production de biomasse de CU et de consommation des métabolites produits par KM-LF. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM.....	140
Figure 23- Cinétiques de production de biomasse de CU et de consommation de métabolites produits par LF. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM.....	141
Figure 24- Cinétiques de croissance de KM cultivée sur un substrat à base de métabolites de LF. Le lactose contenu dans le surnageant au départ de la fermentation provient de la culture précédente. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM .....	143
Figure 25- Cinétique de production des métabolites par KM cultivée sur le PLS. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM .....	146
Figure 26- Cinétique des métabolites produits par le couple KM-LF cultivé sur PLS. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM .....	150
Figure 27- Cinétiques de consommation du lactose et des métabolites de LF par KM. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM..	152
Figure 28- Cinétiques de consommation des métabolites de KM par CU. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM .....	156
Figure 29- Cinétiques de consommation des métabolites produits par la co-culture KM-LF par CU. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM .....	158
Figure 30- Cinétiques de consommation des métabolites de LF par CU. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM .....	160
Figure 31- Mise en évidence du profil diauxique de KM .....	189
Figure 32- Détermination graphique des coefficients de maintenance $m$ (g/g.h) .....	190

Figure 33- Profils de OTR, OUR et  $K_{La}$  au cours de la culture de KM sur le PLS. Conditions :  
T=34.8°C; [lactose]=35g/L; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM..... 195

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACIA	Agence canadienne d'inspection des aliments
ANOVA	Analyse de la variance
CK	<i>Candida krusei</i>
CPL	Concentré des protéines de lactosérum
CU	<i>Candida utilis</i>
d.d.l	Degré de liberté
DBO	Demande Biologique en Oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
É.-U	États-Unis
FD	Fonction de désirabilité
$K_{La}$	Coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène
KM	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
LF	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LS	Lactosérum
$m$	Coefficient de maintenance cellulaire
MRS	Méthodologie des réponses de surface
Milieu MRS	Milieu de Man Rogosa et Sharpe
OD	Oxygène dissout
OTR	Oxygen Transfer Rate
OUR	Oxygen Uptake Rate
$P$	Probabilité associée à la valeur du test de Fisher

PCC	Plan central composite
$P_{\text{DCO}}$	Productivité de dégradation de la DCO
PLS	Perméat de lactosérum
$P_m$	Productivité en métabolites
$P_x$	Productivité en biomasse
$q$	Quotient métabolique
$R^2$	Coefficient de détermination
SA	Sulfate d'ammonium
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SU	<i>Saccharomyces unisporus</i>
$t$	Temps
TSB	Bouillon de soya tryptonée
UFC	Compte cellulaire (Unité formant une colonie)
Ur	Urée
$X$	Biomasse microbienne (g/L)
$Y_{P/X}$	Taux de protéines dans la biomasse
$Y_{X/\text{métab}}$	Taux de conversion des métabolites en biomasse
$Y_{X/S}$	Rendement de conversion du substrat en biomasse
$\mu$	Taux de croissance spécifique

## INTRODUCTION

Le lactosérum (LS) est un rejet hautement polluant produit principalement par les industries de production du fromage. Un lactosérum de fromage typique contient en moyenne 5% (p/v) de lactose et une demande chimique en oxygène entre 50 et 60 g/L. La disposition du LS représente une étape limitant l'expansion des industriels fromagers en raison des quantités substantielles générées durant les cycles de production, et de l'obligation de rencontrer des normes environnementales de plus en plus strictes. Présentement, plusieurs solutions technologiques sont disponibles afin de disposer de ce rejet. Principalement, ces technologies sont basées sur le fractionnement et la récupération des protéines sériques, suivi d'un traitement du lactose contenu dans le perméat généré. Au Canada, les procédés de valorisation existants sont basés sur les technologies de déshydratation pour la production de poudres de (perméat de) LS, utilisées comme additifs en alimentation humaine et animale. Le lactose et ses dérivés, extraits par cristallisation, trouvent des applications en alimentaire et en pharmaceutique.

La production de biomasse est une approche de valorisation du LS visant à convertir le lactose en biomasse microbienne, ciblant à la fois le traitement de la charge polluante du rejet et la génération d'un produit à valeur ajoutée potentielle. Dans ce contexte, un procédé industriel de fermentation (Biocompact), basé sur l'utilisation d'une culture microbienne mixte, a été implanté à St-Prime (Lac-St-jean, Québec) pour convertir le lactose du rejet en biomasse à usage alimentaire animal. Le procédé tel qu'il a été développé et opéré était caractérisé par des rendements de production de biomasse et de dégradation de la charge polluante non optimaux. Par ailleurs, une probable déviation de l'équilibre de la flore de fermentation et sa contamination par une levure sauvage au statut sanitaire controversé étaient suspectées. Ces deux caractéristiques risquaient de rendre le produit fini non conforme aux critères de vente et de compromettre la viabilité économique du procédé.

Les objectifs principaux du projet de recherche consistent, en premier lieu, à effectuer un suivi systématique de la cinétique de conversion du lactose en biomasse et de la dynamique de la culture mixte au cours de l'opération du fermenteur industriel. Cette phase du projet permettra de comprendre le fonctionnement du procédé et de diagnostiquer les failles à l'origine des rendements sous-optimaux.

La stratégie de recherche implique ensuite d'étudier la cinétique de la souche principale du procédé, la levure lactose-positive *Kluyveromyces marxianus*, afin d'approfondir notre connaissance de la physiologie de cette souche ainsi que les conditions optimales pour sa croissance. L'acquisition de ces connaissances fondamentales par rapport à *K. marxianus* permettra de faire le choix éclairé d'un nouveau consortium microbien pour la fermentation du lactosérum, assurant l'obtention de rendements optimaux. Le remodelage de la composition de la flore de fermentation sera corroboré par la définition des interactions microbiennes régissant l'équilibre entre les populations des microorganismes mis en co-culture. L'étude de ces interactions, basée sur l'analyse des profils de production et de consommation des métabolites (acides organiques et glucides), permettra d'accroître le niveau de compréhension des cinétiques de croissance des souches co-cultivées et de s'assurer de la stabilité du consortium au cours de la fermentation. La finalité du présent projet de recherche sera donc de mieux comprendre et mieux maîtriser un procédé de fermentation opérant avec une culture mixte, donnant ainsi les outils fondamentaux nécessaires pour optimiser ses rendements. De même, la connaissance acquise apportera une méthodologie applicable à d'autres procédés utilisant une culture mixte pour l'étude des interactions entre les populations microbiennes.

Le présent manuscrit se divise en sept chapitres. Le premier comporte une revue de la littérature sur la problématique reliée à la gestion du lactosérum ainsi que des technologies utilisées pour sa valorisation. Ce chapitre propose ensuite une analyse détaillée des procédés de production de biomasse utilisant les cultures mixtes et des interactions microbiennes les régissant. Un second chapitre expose la problématique du procédé industriel étudié en compilant les résultats des analyses systématiques effectuées au cours de l'opération du fermenteur afin de poser les hypothèses et les objectifs du projet qui sont décrits dans le troisième chapitre. Le quatrième chapitre décrit l'approche méthodologique adoptée. Enfin, les trois derniers chapitres présentent les résultats obtenus et leur interprétation ainsi que les conclusions qui en découlent.

# CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Dans ce qui suit, une revue de la littérature est présentée afin de mettre en contexte la problématique traitée par l'étude en ce qui a trait à l'exploitation du potentiel nutritif du lactosérum en tant que substrat pour la production de biomasse microbienne.

## 1.1. Le lactosérum

Le lactosérum (LS), ou petit-lait, est la fraction liquide issue de la coagulation et de l'extraction des caséines et/ou de la matière grasse du lait lors de la fabrication du fromage ou de la caséine. Ce sous-produit de l'industrie fromagère représente 85 à 95 % du volume total du lait et retient 55 % des nutriments qui y sont contenus (Siso, 1996). La composition du LS est variable et dépend essentiellement de l'origine du lait (vache, chèvre, brebis) et du procédé de coagulation de la caséine utilisé. Par convention, le LS peut être classé en deux principales variétés. Le LS doux ( $5 < \text{pH} < 7$ ) est obtenu suite à la coagulation des caséines sous l'action de la chymosine, enzyme contenue dans la présure issue de l'estomac des veaux. Le LS acide possède un pH inférieur à 5 et est généré à la suite de la coagulation des caséines par l'acidification du lait, en utilisant des acides (minéraux ou organiques), ou par fermentation lactique (Smithers, 2008). D'une manière générale, le LS est composé de 95 % d'eau et de 5 % de matières sèches, dont environ 70 à 80 % de lactose, 10 % de protéines solubles et le reste est partagé entre les lipides, les sels minéraux, l'acide lactique et les vitamines du groupe B (Tableau 1).

### 1.1.1. Quantités produites et charge polluante

En raison de sa faible teneur en résidu sec de nutriments du lait, le LS a communément été considéré comme un rejet. Le LS est produit en très grandes quantités de par le monde. La fabrication d'un kilogramme de fromage génère en contrepartie 9 kilogrammes de LS (Kosikowski, 1979, Panesar & Kennedy, 2012). En 2009, le Canada a produit environ 382 000 tonnes de fromage, dont 200 000 tonnes au Québec. Il en résulte donc un équivalent de 2.1 millions de tonnes de LS au niveau national, soit 1.2 millions de tonne au Québec (StatistiqueCanada, 2012). La production de larges quantités de LS, ajoutée à sa charge

organique due essentiellement à sa teneur élevée en lactose, fait du LS un polluant organique constituant un problème environnemental majeur pour l'industrie laitière. En effet, le LS possède une demande biologique en oxygène (DBO<sub>5</sub>) située entre 30 et 50 g/L, correspondant à une demande chimique en oxygène (DCO) entre 60 et 80 g/L. D'après Belem et Lee (1998b), environ 17 % de la quantité de LS produit au Canada est rejetée à l'égout et 26 % est destinée à l'épandage. Certains auteurs estiment que le rejet de 100 tonnes de LS correspondrait à une charge organique équivalente à celle rejetée par 55 000 habitants environ (Sienkiewicz & Riedel, 1990).

**Tableau 1- Composition moyenne d'un LS doux**

<b>Composés</b>	<b>Pourcentage (p/v)</b>
Solides totaux	5.71 – 6.5
Lactose	4.32 – 4.85
Protéines	0.54 – 0.8
Azote non protéique	0.18
Acide lactique	0.14
Lipides	0.05
Minéraux	0.48 – 0.8

D'après Siso (1996) et Estrella et al (2004)

### **1.1.2. Utilisation du lactosérum**

La majorité des pays producteurs de lait imposent des règles environnementales strictes aux industriels de la transformation laitière par rapport à la gestion et la disposition de leurs rejets et sous-produits. Plus particulièrement, le LS est soumis à des législations strictes de protection de l'environnement ayant forcé les transformateurs laitiers à repenser les approches utilisées pour sa disposition. Les approches utilisées pour le traitement et la valorisation du LS et de ses sous-produits sont nombreuses et très diversifiées (Figure 1). Elles vont de la simple opération unitaire (séchage, filtration, séparation) à des procédés plus élaborés et parfois complexes à mettre en œuvre (fermentation, hydrolyse enzymatique et/ou chimique, digestion anaérobie).

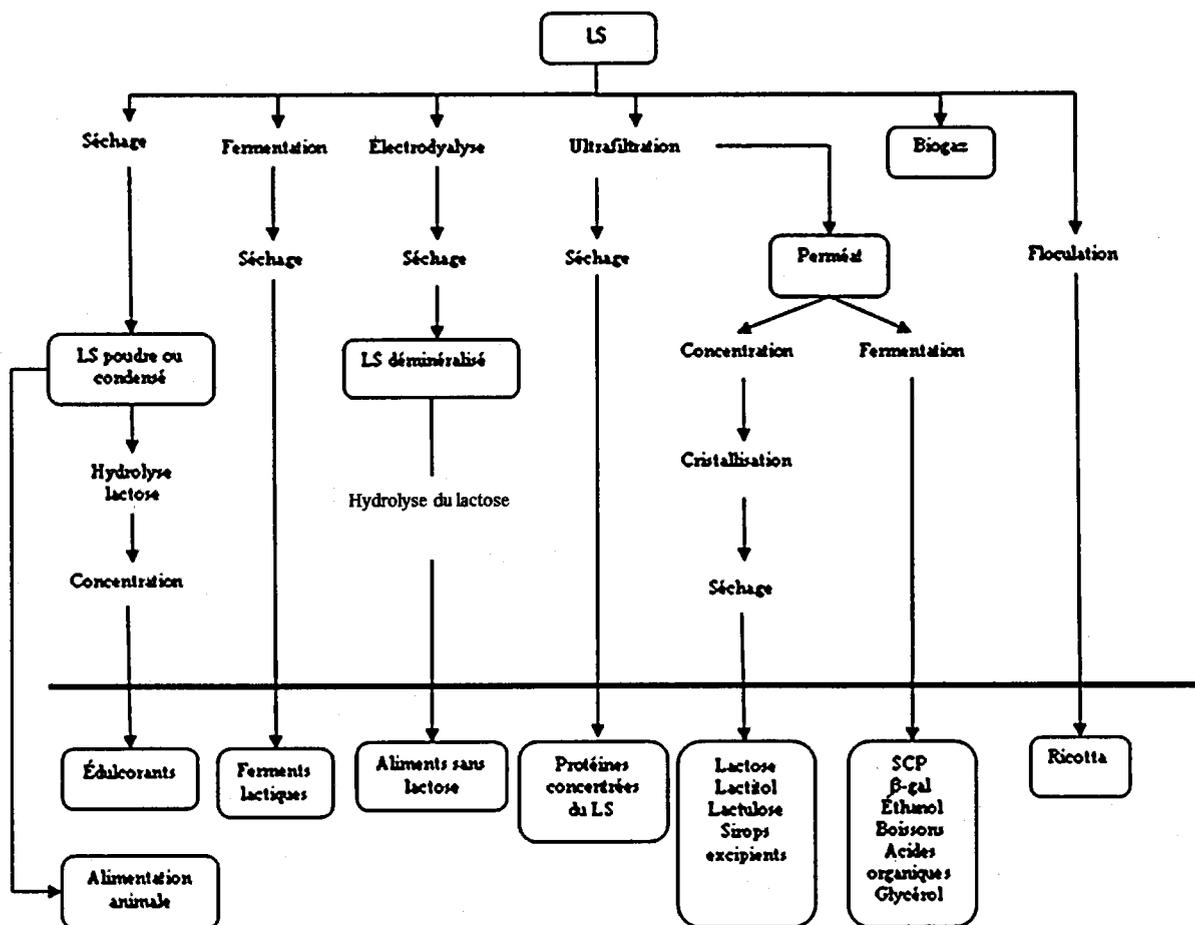


Figure 1- Différents procédés de valorisation du lactosérum (Panesar & Kennedy, 2012, Siso, 1996)

### a- Procédés conventionnels

Le concentré de protéines sériques, le LS en poudre, le perméat de LS en poudre ou encore le lactose sont les produits prédominants issus de la valorisation du LS. Ces produits sont le fruit de technologies très maîtrisées qui s'insèrent convenablement dans les sites industriels de fabrication des produits laitiers. La récupération des protéines représente la première étape de la majorité des procédés de valorisation du LS. En général, elle est effectuée par ultrafiltration, méthode économique, présentant l'avantage de préserver la qualité des protéines extraites, sans les dénaturer. Le produit issu de cette technologie peut être concentré par séchage pour aboutir à la production d'un concentré de protéines du LS (CPL), un produit ayant une valeur marchande garantie et reconnue en alimentation et en nutrition humaine de par son profil d'acides aminés très intéressant, et sa richesse en lysine et en cystéine (Bylund, 1995, Kosikowski, 1979).

L'extraction des protéines par ultrafiltration génère du perméat. Il s'agit de la fraction liquide retenant la quasi-totalité du lactose du LS (4 – 5% p/v), les minéraux et les vitamines. Le perméat, longtemps considéré comme sans valeur exploitable, pose d'énormes problèmes de disposition puisque les volumes générés suite à l'extraction des protéines représentent environ 80 % du volume total de LS traité, avec une charge organique polluante représentant 82 – 86 % de la charge totale du LS. Le LS ou le perméat de LS sont souvent concentrés par séchage afin d'en faire de la poudre à utilisation alimentaire, humaine ou animale. Le séchage par atomisation est la technique la plus utilisée pour la production de poudre de LS ou de perméat. Cependant, les coûts énergétiques élevés engendrés par le recours au séchage ont motivé la recherche de technologies alternatives plus économiques et plus rentables pour l'exploitation du LS et de son perméat. En effet, les données statistiques entre 2001 et 2011 ont montré que la production de LS en poudre a été réduite de plus de 60 % au Canada, prouvant le recours des industriels à d'autres technologies.

#### *b- Production du lactose et de ses dérivés*

Ayant vu le jour depuis les années 1940, la purification du lactose à partir du perméat de LS est une technologie très connue, et très employée par les leaders mondiaux de la transformation laitière (Moulin & Galzy, 1984). Le lactose est utilisé pour ses propriétés en tant qu'agent de remplissage et liant en alimentaire, et en tant qu'agent d'enrobage et d'adsorption en pharmaceutique. Il est généralement extrait par cristallisation à partir du perméat de LS, après récupération des protéines sériques. La cristallisation est une réaction lente consistant à concentrer le lactose afin de catalyser sa cristallisation. Elle est amorcée par l'évaporation du perméat à 60 – 62 % de matières sèches qui est ensuite acheminé vers des tanks de cristallisation. Les cristaux de lactose ainsi formés sont ensuite séparés par centrifugation du résidu de cristallisation, appelé liqueur mère, puis raffinés au besoin et séchés sur lit fluidisé (Bylund, 1995). Malgré le recours de plus en plus de transformateurs laitiers à la technologie de cristallisation du lactose, la quantité de LS utilisée pour satisfaire la demande du marché en lactose reste très faible. D'après Moulin et Galzy (1984), cette quantité est évaluée à 5 % de la production totale de LS. Pour cette raison, les recherches ont été poussées afin de développer des produits dérivant du lactose et ayant une valeur ajoutée plus importante. La majorité de ces recherches ont porté sur la synthèse chimique de nouvelles molécules à partir du lactose pur.

Ainsi, le lactulose, produit par isomérisation du lactose, possède une valeur élevée sur le marché mondial où il trouve une application en pharmaceutique. Le lactitol et l'acide lactobionique possèdent, respectivement, des propriétés émulsifiantes et acidifiantes très utiles en transformation alimentaire (Kosikowski, 1979).

*c- Technologies de valorisation basées sur la fermentation*

Les procédés de fermentation microbienne sont considérés comme les alternatives les plus profitables pour la valorisation du surplus de perméat de LS (Panesar & Kennedy, 2012, Siso, 1996). En effet, beaucoup de technologies ont été développées en se basant sur l'utilisation du perméat de LS comme substrat pour la culture et la production de plusieurs souches microbiennes ainsi que leurs bioproduits. En effet, son contenu en lactose représente une source de carbone de choix pour les microorganismes capables de l'assimiler. De même, son contenu en minéraux et en vitamines est susceptible de soutenir la croissance de plusieurs microorganismes. Il est très courant qu'une supplémentation du perméat en sources d'azote, en facteurs de croissance ou en éléments traces soit requis afin d'empêcher tout risque de limitation pouvant engendrer des rendements et des productivités non optimaux, avec des répercussions économiques conséquentes (Ugalde & Castrillo, 2002). Un bon nombre de revues scientifiques ont fait le point sur l'état de l'art des procédés biotechnologiques de production de biomasse ou de produits d'origine microbienne. Plusieurs d'entre eux n'ont pas dépassé l'étape de développement au laboratoire tandis que d'autres ont atteint l'étape de l'industrialisation. Nous nous limiterons dans cette section à lister des exemples de ces technologies. Pour une lecture détaillée, il est recommandé de consulter les revues de Kosikowski (1979), de Moulin et Galzy (1984), de Kosaric et Asher (1985), et plus récemment, celles de Smithers (2008) et de Panesar et Kennedy (2012).

- Bioéthanol : la conversion du lactose en éthanol sous l'action des levures a été étudiée par plusieurs auteurs (voir la revue scientifique de Guimares *et al.* (2010)). La conversion peut être directe, en utilisant principalement des levures du genre *Kluyveromyces* sp., capables de sécréter la perméase et la  $\beta$ -galactosidase (ou lactase), enzymes nécessaires pour le transport transmembranaire et l'hydrolyse du lactose, respectivement. La conversion du lactose peut également se faire indirectement, en hydrolysant le lactose en glucose et en galactose sous l'action de la lactase, puis en fermentant les deux glucides

par *S. cerevisiae*, par exemple (Champagne *et al.*, 1990). Cependant, le fait que l'assimilation du galactose par cette levure soit soumise à la répression catabolique par le glucose provoque l'avènement d'une diauxie dans la fermentation des deux glucides, entraînant ainsi une réduction des rendements de conversion en éthanol. Le recours à des souches recombinantes de *S. cerevisiae*, exprimant les gènes LAC4 et LAC12 codant pour la lactase et la perméase, respectivement, offre une perspective économique pour la production d'éthanol à partir de LS (Domingues *et al.*, 2001). Une des contraintes technologiques reliées à ce procédé consiste à concentrer le lactose dans le LS afin de rendre l'opération de distillation de l'alcool produit économiquement viable. Cependant, les concentrations de lactose requises pour atteindre des rendements de conversion optimaux (12 – 20 % p/v) engendrent des temps de fermentation trop longs, affectant ainsi la productivité du procédé.

- Biogaz : La digestion anaérobie pour la production de méthane, source d'énergie disponible *in situ*, a longtemps été utilisée en traitement des eaux usées industrielles (Siso, 1996). Au Québec, l'industrie fromagère Blackburn s'est dotée d'une unité de traitement anaérobie de ses rejets. Il s'agit d'une technologie française du nom de *Valbio Méthacore*<sup>®</sup>. C'est une technologie permettant de traiter les eaux blanches (eaux de lavage des laiteries), le LS, les perméats ou encore les produits déclassés et périmés. Selon les experts de cette technologie, 1m<sup>3</sup> de LS peut être transformé en 266 kWh de biogaz substituable à une énergie fossile. Le biogaz produit peut être utilisé comme combustible de chaudière servant pour le chauffage des installations de l'usine ou pour la maintenance de la température du digesteur. La production de méthane à partir de la digestion anaérobie du LS permet d'atteindre des taux d'abattement de la charge organique (DCO, mg/L) intéressants, allant jusqu'à 95 % (Mawson, 1994).
- Autres bioproduits : plusieurs acides organiques utilisés en alimentaires (lactique, acétique, propionique, citrique, gluconique), des vitamines (riboflavine et cobalamine), des acides aminés (glutamique, lysine, thréonine) ou encore des enzymes sont produits par fermentation du LS par différents types de microorganismes. L'acide lactique est produit par conversion du lactose sous l'action de bactéries lactiques telles que

*Lactobacillus bulgaricus*. L'acide citrique est en général produit par le champignon *Aspergillus niger* cultivé sur le perméat de LS enrichi en lactose afin de maximiser les rendements de production. La cobalamine (vitamine B12) a été produite par *Propionibacterium shermanii* cultivée sur le LS. L'enzyme la plus produite sur le LS est la  $\beta$ -galactosidase des levures du genre *Kluyveromyces* sp. D'autres procédés ont utilisé le LS comme substrat pour la production de protéases, d'amylases et de polygalacturonases (Panesar & Kennedy, 2012).

### **1.1.3. Procédés de production de biomasse à partir du lactosérum**

La commercialisation de procédés de production de biomasse microbienne à partir du LS a commencé dès les années 1940 (Siso, 1996). Elle a pris de l'ampleur en raison des problèmes de pollution générés par la production de LS, et de la demande de plus en plus accrue en aliments protéinés pour les animaux, puis pour les humains (Bayer, 1983, Kosikowski, 1979, Ugalde & Castrillo, 2002). Plusieurs procédés ont été développés à l'échelle pilote ou industrielle en France, aux États-Unis, en Allemagne et en Autriche. Les études scientifiques portant sur le développement de procédés de fermentation du LS sont nombreuses et diversifiées. La fréquence de parution de ces études a coïncidé avec le pic de publications scientifiques traitant de la production de biomasse microbienne durant les décennies 1970 et 1980. À la suite d'une revue exhaustive de la littérature sur le sujet, il a été possible de répertorier 4 procédés de fermentation du LS ayant atteint la phase d'industrialisation. Les exemples étant nombreux et diversifiés, nous nous limiterons dans la présente revue à une description portant sur les aspects technologiques et microbiologiques caractérisant ces procédés.

#### *a- Le procédé Bel*

Il s'agit d'un procédé de fermentation de LS développé par la fromagerie française Bel aux alentours des années 1956. Ce procédé se démarque par son ancienneté, sa novation et par le fait que c'est le procédé de production de levures sur LS qui a été opéré le plus longtemps (la date d'arrêt des opérations est inconnue; elle se situe vraisemblablement vers la fin des années 1990 et le milieu des années 2000). Ce procédé a été opéré dans trois unités industrielles situées en France pour produire 10 000 t/année de levure destinée à l'alimentation animale puis adaptée à

l'alimentation humaine (Moulin & Galzy, 1984). Les principales caractéristiques technologiques du procédé Bel sont décrites dans le Tableau 2. Principalement, le procédé a été développé pour fermenter du lactosérum déprotéiné (par ultrafiltration ou par thermo-coagulation à pH acide), ce qui permet de minimiser considérablement le risque de formation de mousse, due à la présence des protéines solubles du LS (lactalbumine et lactoglobuline), engendré par le fort taux d'aération appliqué au bouillon fermenté. De plus, les deux procédés de déprotéinisation du LS utilisé permettent d'assainir le substrat d'un point de vue microbiologique. En effet, l'ultrafiltration permet de retenir les bactéries de fermentation du fromage tandis que la thermo-coagulation, opérée à une température de 90°C, fait office d'une pasteurisation du perméat. La flore utilisée pour la conversion du lactose en biomasse est constituée principalement de 3 souches de levures. Une analyse détaillée des interactions régissant la croissance des 3 souches est rapportée dans la section 1.2 du présent chapitre.

L'inconvénient majeur du procédé Bel est vraisemblablement relié au fait que le rendement de production de biomasse soit très influencé par la concentration en lactose. En effet, le procédé, tel qu'il a été développé, requiert un LS dilué de moitié (pour une concentration en lactose de 20 – 25 g/L) pour pouvoir alimenter le fermenteur. Il a été rapporté qu'une augmentation de la concentration de lactose de 20 g/L à 27 g/L induisait une réduction du taux de conversion ( $Y_{X/lactose}$ ) de 0.61 à 0.47 g/g, respectivement (Moulin *et al.*, 1983). Par ailleurs, le taux de dilution devant être appliqué est très grand et requiert des quantités importantes d'eau, ce qui affecte directement le coût de l'opération. De ce fait, la dilution du LS représente un obstacle majeur à l'augmentation de la capacité de traitement de l'usine qui serait conséquente à une augmentation de la production de LS. De plus, la conduite du procédé en mode continu instaure des conditions favorables à l'entrée de contaminants dont la prolifération risque de déstabiliser la flore ou de dénaturer la qualité du produit fini (Ugalde & Castrillo, 2002).

#### *b- Procédé de Vienne*

Décrit pour la première fois par Mayrath et Bayer en 1979, il s'agit d'un procédé de fermentation du LS opéré à Vienne en Autriche, d'où il tient son nom. Identiquement au procédé Bel, ce procédé est opéré en continu, en utilisant un LS déprotéiné. Cependant, ce dernier ne requiert pas de dilution au préalable et est alimenté directement dans le fermenteur (à une

concentration en lactose de 45 g/L) (Tableau 2). À l'inverse de Bel, le procédé de Vienne est à souche unique, *Candida intermedia*. Il s'agit d'une levure lactose-positif, caractérisée par un métabolisme de type oxydatif vis-à-vis du lactose (Kurtzman & Fell, 1998). Dans le cas de la fermentation du lactose, cette propriété constitue un avantage technologique puisque la majorité du flux carboné entrant dans la cellule est complètement oxydé, à condition d'un approvisionnement suffisant en oxygène dissout. Les limitations liées au procédé de Vienne se situent principalement dans le fait qu'une fermentation en mode continu et en présence d'une monoculture rend le système vulnérable à la prolifération de contaminants indésirables. De plus, dans ce genre de procédés où l'oxygène dissout est un facteur limitant, les avantages physiologiques liés à la capacité oxydative de *C. intermedia* ne peuvent être exploitées pleinement ce qui, par conséquent, affecte considérablement le rendement de conversion du lactose dans des conditions de taux de dilution élevés (Moulin & Galzy, 1984).

#### c- Autres procédés

La compagnie Nutrisearch a développé un procédé de fermentation du LS hydrolysé pour la production de levure boulangère, *S. cerevisiae*. Étant donné que *S. cerevisiae* est incapable de métaboliser le lactose, le procédé comporte une étape pré-fermentaire d'hydrolyse enzymatique du disaccharide (Panesar & Kennedy, 2012). Le LS, pasteurisé et débarrassé de ses protéines par ultrafiltration, est alimenté dans des colonnes en acier inoxydable contenant une  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus niger*, immobilisée de manière covalente à un support de silice. Le perméat hydrolysé est ensuite pompé dans le fermenteur principal afin de convertir le glucose et le galactose en biomasse microbienne. Les opérations se déroulant en mode batch, sur une durée de 20h par jour, permettent de traiter 400 t de LS quotidiennement. La compagnie Nutrisearch, basée à Winchester (Kentucky, É.-U.), était considérée à l'époque comme la plus grande installation industrielle d'ingénierie des enzymes dans le domaine de la laiterie (Mans, 1984). Le procédé a été opéré de 1981 à 1987. La compagnie a depuis été vendue et ses activités en rapport avec la production de levure boulangère ont cessé.

Le procédé de fermentation décrit par Grandjacquet (1989) dans son brevet (EP 0338950 B1), déposé par la compagnie Kéfirana, implique l'utilisation de la levure lactose-positif *C. kefir* en co-culture avec *C. valida*. Il s'agit d'un procédé de fermentation en continu développé pour

traiter plusieurs types de substrats laitiers (LS doux d'Emmental, perméat de lait), puis étendu au traitement d'effluents de vinasses de mélasses, ou encore, de jus de drêches de brasserie. Aucune information sur l'existence d'une installation industrielle opérant ce procédé n'est disponible ni dans le texte du brevet ni en ligne.

Une entreprise québécoise du nom de HET (Horizon Environnement Technologies), fondée en 2003, a développé le procédé Biocompact pour la fermentation du LS (Tableau 2). Le procédé, implanté au Lac St-Jean (Québec) de 2009 à 2011, a été initialement opéré avec une flore microbienne complexe, composée d'une trentaine de souches de levures et de bactéries. Le produit fini étant destiné à l'alimentation animale, l'obtention d'une autorisation réglementaire de la part de l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA) était obligatoire afin de commercialiser le produit. Étant donné la complexité de la flore utilisée dans le procédé, une réduction du nombre de souches mises en culture s'imposait dans le but d'avoir un meilleur contrôle sur la qualité de la biomasse produite. La culture mixte a finalement été limitée à 3 souches, dont 2 levures, *K. marxianus* et *S. unisporus*, et une bactérie, *L. fermentum*. Dans ce procédé, le LS est dilué à environ  $30 \pm 2$  g/L de lactose et alimenté dans le fermenteur, sans déprotéinisation préalable. La présence des protéines sériques dans le bouillon fermenté a engendré l'occurrence de phénomènes de moussage intempestifs imposant la réduction de l'apport d'oxygène dissout par l'aération.

**Tableau 2- Caractéristiques techniques de procédés industriels de production de biomasse**

Caractéristiques techniques	Procédé		
	Bel	Vienne	Biocompact
Paramètres			
Substrat(s)	LS déprotéiné dilué (20 g/L lactose)	LS déprotéiné non dilué	LS dilué (30 g/L lactose)
Flore de fermentation	Mixte (3 souches)	Culture pure	Mixte (3 souches)
Mode de culture	Continu	Continu	Batch/continu
Volume utile (m <sup>3</sup> )	23	14	32
pH	3.2±0.1	3.5±0.1	3.5±0.2
Température (°C)	38±1	32±1	40±1
Aération (vvm)	1.3	0.7	0.6
Débit d'alimentation (m <sup>3</sup> /h)	7.6±0.1	4±0.2	3.3 ±0.2
Taux de dilution (h <sup>-1</sup> )	0.33±0.1	0.28±0.02	0.11±0.05
Source d'azote	sulfate d'ammonium	Ammoniac/sulfate d'ammonium	Urée
<b>Caractéristiques cinétiques</b>			
$Y_{x/lactose}$ (g/g)	0.57±0.03	0.53±0.01	0.33±0.03
Productivité en biomasse (g/L.h)	4.4	4.7±0.1	1.4±0.2
$Y_{prot/x}$ (g/g)	0.55±0.07	0.50	0.44±0.02
Produit fini	Poudre de levures atomisées  Flocons de levures (séchées sur un séchoir sur rouleaux)	Crème de levure concentrée par centrifugation à 12% de matières solides	Poudre de levures atomisées
Taux d'abattement de la DCO (%)	94±1	93±1	70±10
DCO finale de l'effluent (mg/L)*	1200±200	3500±500	12900±5500
Références	Moulin et al (1983); Moulin et Galzy (1984)	Bayer (1983); Moulin et Galzy (1984)	Cette étude

\* Les valeurs sont estimées dans le cas des procédés Bel et de Vienne; Pour Biocompact, les valeurs correspondent à une moyenne calculée sur les données d'un mois de production (mai – juin 2010).

d- Souches utilisées pour la fermentation du lactose en biomasse

Parmi les groupes de microorganismes connus jusqu'à date, les levures sont, sans équivoque, les microorganismes les plus utilisés pour l'étude de la conversion du lactose en biomasse microbienne (Ghaly & Kamal, 2004). La transformation directe du lactose en biomasse microbienne nécessite l'utilisation de souches de levure possédant la machinerie métabolique nécessaire pour absorber et assimiler le disaccharide. Dans les levures lactose-positives, le lactose est internalisé dans la cellule pour être hydrolysé en glucose et en galactose grâce à l'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase. Le glucose rentre directement dans la chaîne de la glycolyse, tandis que le galactose est transformé dans le cycle métabolique de Leloir afin d'intégrer celui de la glycolyse sous forme de UDP-Galactose. Une revue détaillée de la littérature a montré que l'espèce de levure la plus utilisée dans les procédés de production de biomasse à partir du LS est *Kluyveromyces marxianus* (KM) (Fonseca *et al.*, 2008, Ladet *et al.*, 1972, Lane & Morrissey, 2010, Moulin & Galzy, 1984, Ugalde & Castrillo, 2002). Par ailleurs, la souche *Candida intermedia* a été utilisée pour développer le procédé de Vienne, proposé par Bayer (1983).

- Propriétés métaboliques de l'espèce *K. marxianus*

Découverte par Hansen en 1888, l'espèce *K. marxianus* est une levure appartenant au genre *Candida*. KM est le téléomorphe de *Candida kefir*, elle possède de nombreux synonymes (plus de 70) dont les plus connus sont : *C. pseudotropicalis*, *K. fragilis*, *Saccharomyces marxianus* ou encore *Torula cremoris*, et jouit du statut de 'microbe domestique le plus célèbre' (Kurtzman & Fell, 1998, Lachance, 1998). Les levures peuvent être classées sur la base de l'avènement de la fermentation alcoolique en présence d'un excès de sucres en aérobiose. Ce phénomène est connu sous le nom de l'effet *Crabtree* ou de répression catabolique (Van Dijken & Scheffers, 1986). KM est classée parmi les souches résistantes à la répression catabolique (*Crabtree* négative). Elle est capable de croître sur plusieurs sources de carbone telles que le glucose, le galactose, le sucrose, le raffinose ou encore l'éthanol, et de fermenter d'autres glucides tels que le raffinose et l'inuline (Lachance, 1998). KM possède également la capacité de métaboliser certains polysaccharides tels que la pectine, l'inuline et le xylane (Hensing *et al.*, 1994). Sa propriété d'utiliser le lactose comme source de carbone et d'énergie place KM parmi les souches les plus

utilisées pour le traitement des effluents des industries laitières (Bellaver *et al.*, 2004, Castrillo & Ugalde, 1993).

La classification de *K. marxianus* parmi le groupe des *Crabtree* négatives a d'abord été proposée par Van Dijken et Scheffers (1986), puis confirmée plus tard par plusieurs auteurs (Bellaver *et al.*, 2004, Fonseca *et al.*, 2007, Van Urk *et al.*, 1990). Des études ont rapporté que, dans un contexte de production de biomasse, les souches résistantes à la répression catabolique montraient plusieurs avantages par rapport aux souches *Crabtree* positives (telles que *S. cerevisiae*, par exemple). Les comparaisons entre les états physiologiques des deux classes de levures ont montré que les souches *Crabtree* négatives possèdent, entre autres, la capacité de dégrader un large spectre de substrats (Van Dijken *et al.*, 1993) et de tolérer de fortes concentrations de substrat carboné, sans l'avènement d'un métabolisme fermentaire aboutissant à la production d'éthanol (en favorisant donc les voies métaboliques de synthèse de l'ATP) (Van Dijken *et al.*, 1993, Van Urk *et al.*, 1989, Van Urk *et al.*, 1990).

Les principales caractéristiques physiologiques de KM, rapportées par la littérature sont :

- La capacité d'atteindre des rendements en biomasse ( $Y_{x/s}$ ;  $g_{\text{biomasse}}/g_{\text{substrat}}$ ) intéressants et des taux de croissance spécifique parmi les plus élevés chez les levures. En effet, des taux spécifiques de croissance de  $0.44 \text{ h}^{-1}$  et  $0.56 \text{ h}^{-1}$ , obtenus lors de cultures en batch sur le lactose et le glucose, respectivement, ont été rapportés (Bellaver *et al.*, 2004, Fonseca *et al.*, 2007). Selon ces mêmes auteurs, Les rendements en biomasse varient entre  $0.45 g_{\text{biomasse}}/g_{\text{lactose}}$  et  $0.51 g_{\text{biomasse}}/g_{\text{glucose}}$ . En culture continue sur le saccharose, des rendements similaires ont été rapportés. Pour un taux de dilution de  $0.2 \text{ h}^{-1}$ , les rendements sont de  $0.48$  et  $0.40 \text{ g/g}$  à  $30^\circ\text{C}$  et à  $40^\circ\text{C}$ , respectivement (Hensing *et al.*, 1994).
- Une grande résistance à la fermentation alcoolique dans des conditions d'excès de carbone. En effet, dans des conditions de culture non limitées par l'oxygène, KM produit, dépendamment des souches, très peu ou pas d'éthanol lorsqu'elle est exposée à de fortes concentrations de glucose ou de lactose (Bellaver *et al.*, 2004). D'après Castrillo et Ugalde (1993), pour une culture en continu de KM sur un milieu à base de LS et à un taux de dilution adéquat, tant que la concentration en oxygène dissout est maintenue supérieure à 30 % de saturation, la production d'éthanol sera négligeable, même en

augmentant la concentration en lactose dans le milieu (jusqu'à 37 g/L). Dans le cas des levures *Crabtree* positives, dont *S. cerevisiae*, le seuil de déclenchement du métabolisme fermentaire est nettement plus bas (à partir d'une concentration de 9 g/L de la source de carbone) (Van Urk *et al.*, 1989, Van Urk *et al.*, 1990).

- Une grande capacité respiratoire et un métabolisme oxydo-réducteur (ou respiro-fermentaire) (Castrillo & Ugalde, 1993, Fonseca *et al.*, 2008). En effet, à partir d'une concentration critique de sucre, nous assistons au passage d'un métabolisme oxydatif vers un métabolisme oxydo-réducteur, où les catabolismes oxydatif et fermentaire du substrat carboné ont lieu en même temps (Belem & Lee, 1998a). La vitesse de ce *switch* métabolique est proportionnelle à la concentration en sucre dans le milieu extracellulaire (Castrillo & Ugalde, 1993). La capacité respiratoire élevée de KM lui confère la possibilité de maintenir le flux glycolytique constant en réponse à une augmentation de la concentration en carbone dans le milieu. En effet, il a été démontré que KM favorise les activités des enzymes du métabolisme de biosynthèse des glucides de réserve (phosphoglucomutase). Par ailleurs, la levure favorise la conversion de l'acétaldéhyde en acétate (acétaldéhyde deshydrogénase) ainsi que la synthèse d'acétyl-CoA (acétyl-CoA synthetase) aux dépens de la production d'éthanol à partir de l'acétaldéhyde (par l'alcool deshydrogénase) (Bellaver *et al.*, 2004, Van Dijken *et al.*, 1993, Van Urk *et al.*, 1990).

La production de métabolites extracellulaires par KM est un phénomène reconnu par plusieurs auteurs (Beausejour *et al.*, 1981, Fonseca *et al.*, 2007, Gilliland, 1979, Hensing *et al.*, 1994, Moresi *et al.*, 1989). Cette production de métabolites secondaires se déclenche avec l'occurrence du métabolisme respiro-fermentaire de KM en présence d'un excès de carbone. Peu d'études se sont intéressées à l'identification de ces métabolites. Beauséjour *et al.* (1981) et Moresi *et al.* (1989) ont mis en évidence la production de ces métabolites indirectement à travers la mesure de la DCO générée au cours d'une culture en batch de *K. fragilis*. Il a été suggéré que ces métabolites seraient de l'éthanol, des esters, du glycérol et des aldéhydes, sans recourir à leur identification. Hensing *et al.* (1994) ont montré que KM produisait l'acétate et le pyruvate au cours d'une culture en fed-batch. Fonseca *et al.* (2007) ont confirmé plus tard ce résultat en plus de montrer la production de 2-oxoglutarate. Par ailleurs, Bellaver *et al.* (2004) et Fonseca *et al.* (2007) ont rapporté que la même souche de KM a montré un comportement physiologique

variable, se traduisant par un taux de croissance spécifique et une sécrétion de métabolites différents lorsqu'elle est cultivée dans des conditions différentes. Les auteurs ont ainsi souligné la diversité intraspécifique caractérisant l'espèce *K. marxianus*, mise en évidence récemment par Lane et al. (2011) et Rocha et al. (2011).

- Propriétés métaboliques de l'espèce *L. fermentum*

La souche *Lactobacillus fermentum* est une bactérie lactique hétérofermentaire produisant plusieurs métabolites, dépendamment des conditions de croissance appliquées et de la source de carbone fournie dans le milieu. Le lactate et l'acétate sont les principaux acides organiques issus de la conversion du glucose ou du lactose utilisés comme sources de carbone. En tant que souche hétérofermentaire, LF est capable d'utiliser des composés tels que le pyruvate, le citrate, l'O<sub>2</sub> moléculaire ou encore le fructose comme accepteurs d'électrons externes, nécessaires pour la régénération du NAD(P)H. Le citrate, transformé en pyruvate, est ensuite réduit en lactate. L'O<sub>2</sub> moléculaire est réduit en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le fructose en mannitol (Lefebvre *et al.*, 2010, Zaunmüller *et al.*, 2006). Par ailleurs, il a été montré que, dans des conditions d'anaérobiose, des quantités plus importantes d'éthanol et d'acide succinique sont produites par rapport à des cultures conduites en microaérobiose (Mikelsaar & Zilmer, 2009, Rodríguez *et al.*, 2012).

En plus d'une source de carbone, la croissance de LF requiert l'ajout d'éléments nutritifs complexes dont principalement l'extrait de levure, des peptones, ainsi qu'une source complexe d'azote organique telle que la liqueur de trempage de maïs (*Corn steep liquor*) (Ding & Tan, 2006). Ces composés fournissent les acides aminés, les vitamines (principalement du groupe B) et les éléments minéraux nécessaires à la croissance du lactobacille (Gao *et al.*, 2009). Le milieu de Man Rogosa et Sharpe (MRS) est le plus communément utilisé pour la culture et le maintien des bactéries lactiques en général et de LF en particulier.

Une étude menée par Calderon et al. (2001), portant sur l'effet des sources d'azote sur la croissance de LF, a montré que l'utilisation d'une source d'azote minérale, le sulfate d'ammonium, dans un milieu basal (dont la composition s'inspire de celle du milieu MRS exempt de ses sources d'azote complexes, à savoir les peptones, l'extrait de viande et l'extrait de levure), a abouti à une croissance cellulaire quasi nulle. Malgré la supplémentation de cette

culture avec une solution de vitamines et d'acide aminés, la faible densité cellulaire obtenue ne dépassait pas 20 % de celle atteinte dans le milieu basal en présence d'extrait de levure comme source d'azote.

La caractéristique mentionnée ci-dessus, concernant l'incapacité de LF à croître convenablement sur des sources d'azote minérales, revêt une importance pratique capitale dans le contexte de développement de milieux de culture pour la quantification sélective des souches impliquées dans les cultures mixtes de la présente étude mettant en jeu des levures et LF. En effet, le compte cellulaire des levures pourra être déterminé sur un milieu azoté basal pour levures (*Yeast Nitrogen Base*, YNB) supplémenté d'une source de carbone appropriée. Ainsi, il sera possible de dénombrer sélectivement les levures, selon leur capacité à dégrader la source de carbone, en étant assuré que le lactobacille ne puisse former des colonies sur la gélose. Évidemment, des tests de vérification devront être effectués afin de confirmer cet aspect méthodologique.

Une culture mixte de LF et *L. plantarum* sur un substrat synthétique simulant la composition de la pulpe de cacao a engendré une production de lactate. Par contre, la quantité d'acétate produite était inférieure à celle produite par LF monocultivée sur le même substrat (Lefeber *et al.*, 2010). En considérant le fait que *L. plantarum* est homofermentaire, tout l'acétate produit dans le milieu est une résultante du métabolisme de LF. Il semblerait donc qu'en culture pure, les voies métaboliques de production de l'acétate soient affectées, entraînant une modification de la composition des métabolites produits en temps normal avec une culture pure.

L'inclusion d'une bactérie lactique dans la culture mixte du procédé industriel de fermentation du LS, composée principalement de levures, pourrait s'avérer utile à plusieurs égards. En effet, les composés résultant de la conversion de glucides (glucose, galactose, lactose) par LF représenteraient des sources de carbone de choix pour les souches lactose-négatives, leur offrant ainsi un support de croissance supplémentaire. Les principaux composés dans ce cas sont majoritairement l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et l'acide succinique.

Dans un contexte de culture en batch, l'assimilation du lactose par LF, et sa conversion en métabolites, fait qu'une compétition s'installe avec la levure KM, lactose-positif. En plus de baisser la teneur en lactose à des niveaux permettant d'atténuer la production d'éthanol par le métabolisme de la levure. Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène produit par le métabolisme de la bactérie servirait d'une part à enrichir le milieu réactionnel en oxygène, libéré par oxydation du

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sous l'effet de l'enzyme catalase, et à imposer un certain effet antibactérien permettant de minimiser d'éventuelles proliférations de bactéries indésirables. La production de bactériocines possédant un effet antibactérien pourrait aussi aider à limiter la contamination.

## 1.2. Les cultures mixtes

### 1.2.1. Les cultures mixtes dans les procédés biotechnologiques

Une culture mixte est une population microbienne composée d'au moins deux espèces microbiennes identifiables et différenciables, ayant été mises en culture d'une façon spontanée ou volontaire. C'est un mélange de souches de microorganismes vivant en équilibre dans une matrice biologique donnée, en étant gérées par des interactions biologiques complexes pouvant être bénéfiques, neutres ou défavorables, directes ou indirectes.

L'utilisation des cultures mixtes dans le domaine de l'alimentaire date de plusieurs siècles. En effet, plusieurs procédés de production d'aliments, destinés principalement à la consommation humaine, mettent en jeu l'action d'une panoplie de microorganismes dont les activités métaboliques combinées induisent des changements plus ou moins importants de la composition physicochimique de la matrice alimentaire, rendant l'aliment propre à la consommation. Le recours aux cultures mixtes pour la transformation des aliments n'était nécessairement pas une opération voulue et contrôlée, mais plutôt spontanée et aléatoire. Ce n'est qu'à partir de la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle que des procédés fermentaires industriels mettant en jeu des cultures mixtes contrôlées ont commencé à voir le jour. Les exemples de procédés alimentaires utilisant les cultures mixtes sont nombreux. En effet, les procédés de fermentation des produits laitiers, sous leurs divers aspects (yogourt, kéfir, beurre de lait, lait à l'acidophile etc.), sont tous basés sur l'action d'une culture mixte de microorganismes. Plusieurs de ces procédés existent depuis des décennies. L'évolution du savoir scientifique au fil du temps a permis d'orienter et de contrôler le déroulement des fermentations au sein de ces procédés afin d'atteindre les qualités organoleptique et nutritionnelle souhaitées. La fabrication du yogourt est sans doute l'exemple type d'un procédé de fermentation entièrement industrialisé, impliquant l'action d'une culture mixte. En effet, la transformation du lait en yogourt nécessite l'action combinée de *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus*, inoculés simultanément afin de

fermenter le lait en l'espace de 3 à 4 h, grâce à leur interaction synergique. D'une manière générale, *S. thermophilus* initie la fermentation en transformant le lactose en acide lactique et en produisant des composés stimulant la croissance de *L. bulgaricus* (formate, pyruvate, CO<sub>2</sub>). En contrepartie, la croissance de cette dernière induit la protéolyse des caséines libérant ainsi des acides aminés (la valine, par exemple) indispensables à la croissance de *S. thermophilus*. Une monoculture de chacune des espèces engendrerait une fermentation longue de 12 à 16 h afin d'atteindre le même degré d'acidité obtenu en 3 – 4 h grâce à la symbiose entre les deux espèces bactérienne (Branger, 2004). L'application des cultures mixtes est encore plus vaste et plus variée dans le domaine de la production du fromage, où des microorganismes de divers types sont co-cultivés dans des conditions très bien définies, afin de développer une panoplie de bouquets aromatiques lors de l'étape d'affinage. Dans le domaine de la transformation laitière en général, l'utilisation de ferments à cultures mixtes confère à l'écosystème de fermentation une résistance à l'action des bactériophages, virus infectant les cellules bactériennes. Dans ce genre d'écosystème, les espèces bactériennes impliquées ont tendance à développer des mécanismes de résistance contre les bactériophages, leur permettant ainsi de survivre dans un environnement infecté par ces derniers (Lodics & Steenson, 1993).

Dans le domaine de l'environnement, les procédés biologiques ou mixtes de traitement des eaux usées et des rejets industriels font obligatoirement appel à l'action de cultures mixtes. En effet, la dégradation de composés organiques complexes ne peut s'opérer qu'à l'aide de l'action combinée de plusieurs groupes microbiens aux propriétés métaboliques différentes, mais dont l'activité au sein d'un écosystème bien établi permet de mettre en place une cascade de réactions biochimiques induisant la transformation nécessaire de la matière organique, selon les normes de rejet requises. La digestion anaérobie est un exemple type d'un procédé biologique complexe, nécessitant la mise en place d'un écosystème composé de quatre groupes microbiens différents, organisés sous forme d'une structure physique biologiquement active, la boue (*sludge*). Ce procédé implique une cascade de réactions débutant par l'activité des bactéries hydrolytiques qui dégradent les composés organiques polymériques en composés plus facilement assimilables, grâce à leurs enzymes hydrolytiques. Ensuite, une étape d'acidification est enclenchée par les bactéries acidogènes afin de générer des acides gras volatils et des alcools, qui serviront à leur tour de substrat(s) aux bactéries acétogènes. Ces dernières génèrent de l'acétate, du H<sub>2</sub> et du

CO<sub>2</sub>, nécessaires pour la production de méthane par les bactéries méthanogènes. L'avantage d'un tel procédé réside dans le fait que son écosystème microbien, à la fois complexe et subtilement équilibré, constitue une barrière efficace contre l'introduction de microorganismes contaminants indésirables risquant de rompre la chaîne de réactions se déroulant en son sein (Kleerebezem & van Loosdrecht, 2007).

### 1.2.2. Types d'interactions microbiennes

Les interactions entre deux ou plusieurs populations de microorganismes constituent un ensemble complexe de phénomènes biologiques hétérogènes, dont la classification s'est avérée nécessaire, vu l'enjeu porté par l'utilisation des cultures mixtes dans les procédés biotechnologiques industriels. Historiquement, la classification des interactions a été basée sur une approche observatoire, où seuls leurs effets apparents sur les populations ont été répertoriés. Cette approche dite phénoménologique (Cornu, 2000) a été introduite par l'écologiste P. E. Odum (1953). Dans cette dernière, les interactions ont été classées selon l'observation de leurs effets bénéfiques (stimulation de la croissance par une levée d'une inhibition, production d'un substrat ou d'un facteur de croissance) ou défavorables (inhibition de la croissance par la production d'une toxine, déplétion d'un substrat, cannibalisme) sur chacune des populations impliquées dans la co-culture (Cornu, 2000). Deux décennies plus tard, et dans la foulée de la classification qualitative d'Odum, Fredrickson (1977) proposa une classification des interactions basée sur l'identification et la compréhension des mécanismes biologiques et physicochimiques mis en jeu. Cette approche traite les interactions impliquées entre paires de populations microbiennes, la plus simple organisation biologique au sein de laquelle des interactions interspécifiques peuvent être observées (Fredrickson, 1983). D'une manière générale, la classification de Fredrickson prend en considération une dimension supplémentaire, consistant à répertorier les interactions comme *directes*, impliquant un contact physique entre les membres de chaque population, et *indirectes*, de nature chimique, où des modifications du milieu abiotique opérées par une population affectent la croissance d'une autre.

### a- Les interactions directes

Les interactions directes se résument, d'après Fredrickson (1977), à la prédation et au parasitisme. Le parasitisme est une interaction entre une cellule parasite et une cellule hôte où la première pénètre totalement ou partiellement la seconde, en s'appropriant sa machinerie métabolique (cas des phages) ou son matériel cellulaire pour croître et se reproduire. L'exemple le plus connu de parasitisme est celui des bactéries du genre *Bdellovibrio*, des bactéries de très petite taille, capables de pénétrer l'espace périplasmique de bactéries Gram négatives et de s'approprier leur matériel cellulaire (acides aminés, gras et nucléiques) comme source de carbone et d'énergie. La prédation dans le règne microbien implique en général des protozoaires ou des myxomycètes qui s'alimentent de diverses espèces bactériennes (Harrison, 1978).

### b- Les interactions indirectes

Il s'agit de l'ensemble des interactions régissant la croissance de deux ou plusieurs populations microbiennes via une modification de l'environnement de la culture. L'étude des interactions indirectes est motivée par leur importance dans bons nombres d'écosystèmes naturels ainsi que dans plusieurs applications biotechnologiques des cultures mixtes à grande échelle. Nous énumérons ici les différents types d'interaction avec leur définition la plus élémentaire, en se basant sur les revues de littérature de Fredrickson (1977; 1983) et de Harrison (1978).

#### ➤ La compétition :

Toute interaction indirecte exerçant un effet négatif sur une population, dû à l'enlèvement de l'environnement commun d'un composé nécessaire à sa croissance par une autre population, est appelée compétition. La condition nécessaire pour observer un effet de compétition au sein de la dynamique du consortium est la présence de la substance commune en concentration limitante pour assurer le bon fonctionnement des processus métaboliques vitaux de l'une des populations ou des deux en même temps (Fredrickson, 1977). Il s'agit ici du cas le plus élémentaire d'une interaction de compétition dont l'occurrence aura pour résultat ultime l'exclusion de l'un des deux compétiteurs, dans le sens où la population dotée de propriétés métaboliques d'absorption plus rapides prendra le dessus sur la seconde (Harrison, 1978). La classification d'une interaction de compétition devient tout de suite plus complexe lorsque, par exemple, nous sommes en

présence de non pas une mais de  $n$  substances limitantes communes, affectant le taux de croissance des populations (cf. Fredrickson (1983)).

➤ Le commensalisme :

Ce type d'interaction implique qu'une population de microorganisme procure un bienfait à une deuxième. Le commensalisme est une relation unilatérale où le bénéfice est fourni par l'activité métabolique de la population hôte à la population commensale. Plusieurs mécanismes peuvent donner lieu à une relation de commensalisme entre deux populations : (i) l'hôte sécrète un composé métabolique requis pour la croissance du commensal; (ii) l'hôte produit des enzymes extracellulaires ayant une activité hydrolytique, facilitant l'accès du substrat au commensal; (iii) l'hôte possède l'activité métabolique pour dégrader une substance inhibant la croissance de la population commensale; (iv) l'hôte produit des enzymes extracellulaires dégradant un composé toxique pour la population commensale. Tous ces mécanismes impliquent une modification de la composition du milieu extracellulaire par la population hôte résultant en une stimulation de la croissance de la population commensale.

➤ Le mutualisme :

Le mutualisme est un terme utilisé pour qualifier les interactions entre deux populations engagées dans une culture mixte où chacune tire bénéfice de l'activité métabolique de l'autre. Le cas le plus simpliste de manifestation de cette interaction est le largage, par une population, d'un ou de plusieurs composés (substance(s) couplante(s)) dans le milieu commun que la seconde, incapable de le(s) produire ou de se le(s) procurer, assimile pour les besoins de sa croissance. L'exemple de la culture mixte pour la production du yogourt corrobore ce type d'interaction où chacune des souches bactériennes fournit des éléments nécessaires pour la croissance de l'autre, sans lesquels la productivité du procédé serait beaucoup moins intéressante. Cette définition serait plus large si l'on considérait les cas de co-cultures où l'une des populations dégrade un composé inhibiteur pour la seconde, et que cette dernière en produise un autre, bénéfique à la première, conséquemment à la levée de l'inhibition qui était exercée sur elle. D'après Harrison (1978), le mutualisme est commun aux associations entre bactéries et levures, où ces dernières fournissent des composés stimulateurs tels que les vitamines (biotine, thiamine) pour soutenir la

croissance des premières. En contrepartie, les sous-produits largués par les bactéries serviraient de sources de carbone pour les levures. Le cas des associations entre les bactéries lactiques et les levures dans les procédés fermentaires, tels que la production de kéfir ou de pain au levain, sont des exemples typiques de ce type d'association. En effet, la production d'acide lactique et de biomasse par les bactéries lactiques se trouve améliorée en présence de l'activité métabolique des levures. Ces dernières, en plus de fournir des facteurs de croissance pour les bactéries lactiques, leur fournissent des sources de carbone facilement assimilable grâce à leurs activités hydrolytiques (Gobbetti, 1998, Plessas *et al.*, 2008).

➤ L'amensalisme :

L'amensalisme est une interaction où la croissance d'une population a pour effet l'inhibition d'une autre. Cet effet peut être médié par la déplétion de nutriments essentiels ou la modification de l'environnement physicochimique de la culture, telle que le changement de pH, de la viscosité du milieu ou de la sécrétion de composés toxiques (éthanol, antibiotiques, bactériocines, acides organiques etc.). Il s'agit donc d'un moyen par lequel certains microorganismes protègent leur habitat contre l'invasion de contaminants risquant d'entrer en compétition avec eux vis-à-vis de leurs ressources nutritives. Étant donné que la population 'agressante' met en jeu un mécanisme d'élimination des autres populations à proximité, une prédominance de cette population est à prévoir, ce qui, par conséquent, conduit à un écosystème instable.

➤ Le neutralisme :

La raison pour laquelle le neutralisme ne paraît pas dans la classification de Fredrickson (1983) est le fait que celui-ci se définit comme étant l'absence d'interactions entre deux populations mises en co-culture dans un environnement donné. Il est évident que ce genre de relation est très peu probable entre deux ou plusieurs populations coexistant dans le même environnement. Cependant, l'absence d'interactions ne serait pas absolue, mais il s'agirait plutôt d'interactions très faibles, ayant des effets négligeables sur les populations concernées. Une culture mixte serait gérée par le neutralisme lorsqu'aucune différence significative n'est observée par rapport à une culture pure de chacun des microorganismes (Harrison, 1978).

### 1.2.3. Exemples de cultures mixtes pour la production de biomasse

Du fait que l'intérêt de la présente étude porte sur la production de biomasse microbienne, nous avons jugé pertinent de passer en revue quelques exemples de procédés biotechnologiques de fermentation, faisant appel à des cultures mixte, dans l'objectif de produire de la biomasse microbienne destinée à être utilisée en alimentation humaine ou animale (Tableau 3). Ces procédés ont été sélectionnés dans l'objectif de mettre en évidence la diversité et les mécanismes mis en jeu au sein des cultures mixtes utilisées. Certains de ces procédés seront analysés au regard des interactions développées au sein des consortiums en cours de fermentation.

Tableau 3- Exemples de procédés à cultures mixtes pour la production de biomasse

Cultures mixtes	Substrat (source de carbone)	Commentaires	Références
<i>T. cremoris</i> et <i>C. utilis</i>	Lactosérum déprotéiné (Lactose)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fermentation en mode batch et fed batch.</li> <li>- Inoculation simultanée des deux souches.</li> <li>- Souches sélectionnées par criblage.</li> </ul>	(Cristiani-Urbina <i>et al.</i> , 2000)
<i>E. fibuliger</i> et <i>C. utilis</i> (procédé Symba, Suède)	Rejets de l'industrie de transformation de la patate (Amidon)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fermentation en deux étapes : une étape de production de <i>E. fibuliger</i> (fermenteur Endo) puis une étape de fermentation avec la culture mixte (fermenteur symbiotique).</li> <li>- L'hydrolyse de l'amidon commence dans le premier fermenteur et se poursuit dans le fermenteur principal.</li> <li>- <i>C. utilis</i> utilise les glucides après saccharification de l'amidon.</li> <li>- Procédé limité par l'étape d'hydrolyse.</li> </ul>	(Skogman, 1976)
<i>S. fibuliger</i> et <i>C. utilis</i> (Procédé Symba)	Rejets de l'industrie de transformation des pommes (Pectine)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le procédé Symba a été adapté aux effluents de cidreries.</li> </ul>	(Fellows & Worgan, 1987)

<i>K. fragilis</i> , <i>T. bovina</i> et <i>T. sphaerica</i> (Procédé Bel)	Effluents laitiers / lactosérum (Lactose)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fermentation en continu.</li> <li>- Sélection spontanée de la flore (étude effectuée sur une période de 2 années).</li> <li>- Les souches sont inoculées simultanément en début de fermentation. la fermentation se déroulant en continu, la flore s'équilibre au fur et à mesure.</li> <li>- Les 3 espèces rapportées sont les plus dominantes dans le mélange de fermentation.</li> <li>- Hypothèses émises quant aux interactions : neutralisme entre <i>K. fragilis</i> et <i>T. sphaerica</i>; mutualisme entre <i>K. fragilis</i> et <i>T. bovina</i>.</li> </ul>	(Moulin <i>et al.</i> , 1983)
<i>C. kefir</i> et <i>C. valida</i>	Lactosérum (Lactose)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le procédé industriel implique l'inoculation séquentielle de <i>C. kefir</i> en premier lieu afin de transformer une fraction du lactose en éthanol. Ce dernier sert de substrat pour <i>C. valida</i>, inoculée après 4h.</li> </ul>	(Grandjacquet, 1989)
<i>K. marxianus</i> , <i>L. fermentum</i> et <i>S. unisporus</i> (Procédé Biocompact)	Lactosérum (Lactose)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flore sélectionnée spontanément à partir d'une flore complexe comportant une trentaine de souches.</li> <li>- Fermentation en continu.</li> </ul>	-
<i>G. candidum</i> , <i>C. krusei</i> et <i>H. anomala</i>	Vinasses de whisky (mélange de glucides, alcool, acides organiques et protéines)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sélection spontanée de la flore (étude sur une période de 2 années).</li> <li>- Culture en batch et en continu.</li> <li>- La flore est instable en fonction du temps avec une dominance de <i>C. krusei</i>.</li> </ul>	(Barker <i>et al.</i> , 1982)
Culture mixte de 13 levures du genre <i>Trichosporon</i> sp. et <i>Candida</i> sp.	Vinasse de mélasse de betterave (mélange de glucides, acides organiques et protéines)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Souches isolées du rejet et flore sélectionnée plus ou moins spontanément.</li> </ul>	(Malnou <i>et al.</i> , 1987)
Cultures mixtes de champignons du genre <i>Aspergillus</i> et de levures ( <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Trichosporon</i> sp.)	Eaux de procédés de transformation des moules (Amidon)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flore sélectionnée par criblage.</li> <li>- Les champignons dotés d'une activité amylolytique permettant la saccharification de l'amidon.</li> <li>- Les levures consomment les glucides libérés après hydrolyse de l'amidon.</li> </ul>	(Siso <i>et al.</i> , 1988)

Les procédés de fermentation du lactosérum tels que Bel, Biocompact et celui de Grandjacquet (1989) sont des procédés mettant en jeu l'action des cultures mixtes afin de catalyser la transformation du lactose en biomasse microbienne. Ces procédés ayant atteint la phase d'industrialisation ont été développés en se basant sur les propriétés physiologiques de certaines souches de levures à assimiler le lactose, couplées à d'autres souches lactose-négatives. Le procédé Bel est sans doute le procédé de fermentation du lactosérum ayant le plus longtemps opéré à l'échelle industrielle (depuis 1958). Ce sont Moulin et ses collaborateurs (1983) qui ont rapporté une étude portant sur la composition et l'équilibre de la flore employée dans ce procédé. Les résultats rapportés se basaient sur des analyses systématiques d'identification et de quantification des souches proliférant dans le fermenteur industriel, effectuées sur une période de 2 années. En se basant sur l'historique des données collectées, les auteurs ont pu qualifier la culture mixte en y rapportant principalement la prolifération de trois souches de levure : *K. fragilis*, *T. sphaerica* et *T. bovina*. Afin d'expliquer la robustesse et la stabilité de la flore, les auteurs ont émis des hypothèses dans le but de qualifier la nature des interactions mises en jeu au sein de la flore. Possédant la capacité d'assimiler le lactose, *K. fragilis* est la principale souche de la flore avec une proportion de 90 %. La souche *T. sphaerica*, pourtant lactose positive, n'est représentée qu'à 9 % dans la composition de la flore. Selon les auteurs, en autant que la source de carbone est concernée, une relation de neutralisme régirait ces deux levures, dans le sens où l'une consommerait le lactose tandis que l'autre assimilerait l'acide lactique présent dans le lactosérum. Une troisième levure, *T. bovina*, lactose négative, représente 1 % de la population et assimile exclusivement l'éthanol généré par *K. fragilis* de par l'activité oxydo-réductrice de son métabolisme. Les auteurs ont classé la relation entre ces deux levures de type mutualisme, puisque *T. bovina* permettrait probablement l'assimilation de l'éthanol produit en tant que source de carbone, empêchant ainsi son accumulation à des concentrations inhibitrices pour les autres levures. D'un point de vue microbiologique, l'évolution de la sélection de la flore du procédé Bel semble être marquée par deux phases au cours des opérations industrielles. Une première phase, s'étalant sur les 20 premières années d'opération, a été caractérisée par l'utilisation d'une flore mixte, sélectionnée plus ou moins spontanément mais relativement stable, capable d'assurer la conversion du lactose en biomasse microbienne. Une seconde phase, démarrante à la suite des travaux de Moulin et al. (1983), durant laquelle il a été possible de cribler scrupuleusement les

souches souhaitées en créant des flores adaptées à la nature du substrat traité (lactosérum doux, acide, ou hydrolysé).

Dans le procédé décrit par Grandjacquet (1989) dans son brevet, la flore de fermentation comprend deux levures sélectionnées à la suite d'un travail de criblage. Dans son étude de criblage, Carlotti et al. (1991) ont montré que lors de la culture de *C. kefir* sur le lactosérum, en présence de la flore endogène du LS provenant de la production d'Emmental, seule *C. valida* persistait dans la culture mixte. Ainsi une co-culture formée de *C. kefir* et *C. valida* a donc été retenue pour montrer le procédé de fermentation. La souche *C. kefir*, lactose-positive, est dotée d'un métabolisme oxydatif-fermentaire responsable de la transformation d'une fraction du lactose en biomasse ainsi qu'en métabolites intermédiaires servant de sources de carbone à la seconde levure, *C. valida*, incapable d'assimiler le lactose. L'auteur proposa ainsi le commensalisme pour qualifier l'interaction entre les deux espèces. Cette interaction s'apparenterait plutôt à une forme de mutualisme puisque la dégradation de l'éthanol permettrait de contourner une potentielle inhibition par le produit vis-à-vis de *C. kefir*.

Les hypothèses proposées par les chercheurs dans les deux procédés sont relativement simplistes au regard de la nature des composés utilisés comme substrats par les différentes populations de microorganismes. En effet, dans le procédé Bel, Moulin et al (1983) considèrent que la croissance de *K. fragilis* et *T. sphaerica* sont indépendantes puisque cette dernière assimile exclusivement l'acide lactique contenu dans le milieu. Cependant, la propriété métabolique d'assimilation du lactose de celle-ci n'a pas été prise en compte dans la formulation de l'hypothèse de l'interaction, malgré le fait que cette propriété ait été mise en évidence dans des travaux réalisés au sein du même groupe (Ladet *et al.*, 1972). De ce fait, il serait plus réaliste de considérer la possibilité d'une compétition vis-à-vis du lactose entre les deux levures, ce qui rajouterait un degré de complexité à la nature de l'interaction entre les deux populations. En ce qui concerne les interactions entre les espèces lactose positives et lactose négatives dans les deux procédés décrits, les auteurs n'ont considéré que l'éthanol comme substance couplante. Or, il est maintenant connu que les levures *Crabtree* négatives, dotées d'un métabolisme respiro-fermentaire, sont susceptibles de produire une panoplie de composés organiques issus de la conversion d'une fraction du flux carboné par voie fermentaire.

#### 1.2.4. Avantages de l'utilisation des cultures mixtes

Dans sa revue de la littérature sur l'utilisation des cultures mixtes dans les procédés biotechnologiques industriels, Harrison (1978) a souligné l'apport de l'emploi des cultures mixtes lors de la production de biomasse microbienne. Son analyse, exclusivement basée sur le cas spécifique des protéines des cellules microbiennes (*Single Cell Proteins*, SCP) produites à partir des substrats à base d'alcanes, a porté sur l'effet des cultures mixtes sur le rendement de conversion, la stabilité de la flore, la résistance à la contamination et la possibilité d'utiliser une large gamme de substrats. D'une manière générale, ces propriétés conférées par les cultures mixtes restent valables pour la majorité des bioprocédés de production de biomasse à partir de résidus agroalimentaires.

- Les cultures mixtes peuvent contribuer à améliorer le rendement de conversion du carbone en biomasse microbienne. L'un des mécanismes de régulation du flux glycolytique dans les levures consiste à canaliser une fraction du carbone entrant dans la cellule vers la production d'intermédiaires métaboliques par voie fermentaire. Le partage du flux carboné entre la production de biomasse et celle de métabolites a pour effet de diminuer le rendement de conversion (Saliceti-Piazza, 1996). La mise en culture d'une population de microorganismes possédant la propriété d'assimiler ces métabolites contribue à limiter les pertes de matière carbonée en les transformant en biomasse microbienne (Carlotti *et al.*, 1991).
- Les cultures mixtes peuvent, dans la plupart des cas, offrir une meilleure stabilité au procédé lors de l'occurrence de variations aléatoires affectant le substrat (changement de composition, présence de composés inhibiteurs) ou les conditions opératoires (pH, température, oxygène dissout) par rapport aux cultures pures. La flore du procédé Bel est un bon cas de figure (Moulin & Galzy, 1984). D'une manière générale, les populations régies par des interactions de commensalisme ou de mutualisme permettent d'atteindre un seuil de stabilité avancé. L'exemple illustrant le mieux cette propriété est celui des boues activées des procédés de traitement des eaux usées.
- Les cultures pures sont en général sensibles à la contamination par rapport aux cultures mixtes. En effet, le phénomène de séquestration des composés carbonés libérés dans le

milieu à la suite de l'action de(s) la souche(s) principale(s) du procédé le rend moins disponible pour d'éventuels contaminants pouvant facilement proliférer dans le fermenteur et perturber ainsi l'activité de la flore.

- Les substrats provenant des rejets industriels utilisés pour la production de biomasse microbienne montrent en général un faible degré de pureté. Dans la plupart des cas, ce sont des mélanges de plusieurs flux de rejets, contenant une large gamme de substances organiques. L'utilisation d'une culture mixte adaptée à ce type de substrat offre un avantage certain des points de vue stabilité et capacité à consommer une large gamme de sources de carbone, d'azote et de nutriments.
- Plusieurs microorganismes possèdent des exigences spécifiques en termes de facteurs de croissance ou de vitamines pour assurer une croissance optimale dans un milieu donné. La mise en culture de populations de microorganismes méticuleusement choisis peut aider à fournir les éléments de croissance nécessaires, permettant ainsi de minimiser grandement les coûts de production. Les associations entre levures et bactéries lactiques dans les procédés de fermentation laitière sont un exemple type illustrant ce phénomène (Cheirsilp *et al.*, 2003, Plessas *et al.*, 2008)

## **CHAPITRE 2 : CONTEXTE DU PROJET ET ÉTUDE PRÉLIMINAIRE**

La gestion des déchets agroalimentaires représente un facteur limitant l'expansion des industriels dans le domaine de la transformation agroalimentaire. Dans un contexte où la demande, toujours de plus en plus importante, se heurte aux exigences environnementales de respect des normes, les industriels sont dans l'obligation de trouver des solutions innovantes et économiquement viables pour la disposition de leurs rejets. Le lactosérum généré par les industriels de la transformation laitière n'échappe pas à cette règle. Son utilisation en tant que substrat pour la production de biomasse microbienne à valeur ajoutée est une excellente approche de valorisation de ce sous-produit polluant. La mise en place d'un tel procédé constitue une solution de choix pour les industries concernées en leur offrant la possibilité d'accroître leurs volumes de production tout en permettant d'exploiter le potentiel nutritif du lactosérum pour produire une biomasse microbienne possédant une valeur ajoutée.

### **2.1. Historique du projet – le procédé Biocompact**

Le présent projet de recherche a initialement pris naissance en 2009, à la suite du lancement du procédé de fermentation du LS, Biocompact, mis en œuvre au Lac St-Jean (Québec). L'usine de fermentation, installée à côté de la fromagerie Perron, traite l'équivalent de 40 m<sup>3</sup> de LS sur une base quotidienne. L'objectif initial de notre projet consistait à étudier la dynamique de la flore microbienne en cours de fermentation, à évaluer sa stabilité et à optimiser les rendements du système en termes de dégradation du lactose et de production de biomasse. Dans le présent chapitre, nous présentons une compilation des résultats obtenus dans le cadre d'un suivi de la dynamique de la flore, effectué depuis le lancement de l'usine et s'étalant sur une période de 8 mois d'opération. Une analyse de ces résultats, corrélée aux rendements du procédé, est ensuite présentée afin de mettre en évidence les limites technologiques de celui-ci.

### 2.1.1. Dynamique de la flore microbienne de fermentation

Depuis le démarrage des opérations de fermentation au printemps 2009, un suivi régulier de la flore microbienne de fermentation a été effectué afin d'analyser l'évolution de la composition de la culture mixte au cours du temps. Les techniques et les méthodologies utilisées pour la quantification et l'isolement des populations de microorganismes dans le bouillon fermenté sont décrites dans le chapitre 4 du présent manuscrit. La flore microbienne utilisée pour la fermentation du LS est une culture mixte composée de deux levures (*K. marxianus* et *S. unisporus*) et d'une bactérie lactique (*L. fermentum*). Cependant, une multitude d'autres souches microbiennes, en majorité des bactéries, ont été isolées au cours des dénombrements effectués au fil des cycles de fermentation (Annexe 1). Une fraction non négligeable (70 % environ) de ces souches n'était pas cultivable par les méthodes microbiologiques de routine (en utilisant des milieux de cultures usuels de type MRS ou TSB). Ces souches pourraient être considérées comme dans un état viable non cultivable (VNC), probablement causé par une exposition à des conditions de culture stressantes, défavorables à leur activité métabolique au sein du fermenteur (Oliver, 2005). En plus des souches du consortium, l'annexe 1 énumère certaines souches identifiées suite à leur isolement, en cours de fermentation, dans le substrat, dans le bouillon fermenté ou encore dans l'eau résiduelle obtenue suite à la séparation de la biomasse. Tel qu'observé dans les résultats de l'annexe 1, le LS a représenté une source potentielle d'apport de microorganismes indésirables vers le fermenteur. Les espèces microbiennes identifiées sont soit des microorganismes potentiellement issus du lait (*L. rhamnosus*) (Quigley *et al.*, 2013), soit des souches entrant dans la composition de ferments spécifiques de production de recettes fromagères (*S. cerevisiae* et *G. candidum*, par exemple) (Hui *et al.*, 2003). Ces souches ont été isolées de manière ponctuelle ou très sporadique au cours de cette étude; aucune d'entre elles ne semblait être capable de proliférer et de concurrencer les souches du consortium, très probablement, en raison des conditions environnementales défavorables à leur croissance (une température de 40°C et un pH de 3.5). Dans le mode d'opération du procédé, il n'existait pas d'étape de traitement du substrat avant son alimentation dans le fermenteur. En général, pour un procédé industriel utilisant un substrat tel que le LS, le traitement thermique de pasteurisation est très peu appliqué en raison des contraintes économiques et technologiques qui s'y rattachent. En effet, la pasteurisation du LS, sans extraction préalable des protéines sériques, induit des risques

de précipitation de ces dernières, augmentant ainsi les coûts conséquents à cette opération. L'extraction des protéines sériques par ultrafiltration (en utilisant des membranes de filtration au seuil de coupure < 50 kDa) ou par coagulation thermo-acide (90°C, pH 4.6) aurait joué, par la même occasion, un rôle d'assainissement permettant de maintenir une bonne qualité microbiologique du substrat. Par ailleurs, la peroxydation, technique utilisée dans l'industrie laitière sous certaines conditions, consiste à traiter le lait avec du peroxyde d'hydrogène (100 – 200 ppm (p/v)). Elle constituerait une bonne approche pour la maîtrise microbiologique de la contamination microbienne du LS avant sa fermentation en limitant surtout la conversion du lactose en acide lactique par les bactéries des ferments commerciaux.

### **2.1.2. Cas de la levure *Candida krusei***

La règle énoncée plus haut, stipulant que les microorganismes entrant dans le fermenteur soient incapables d'y croître et d'augmenter en concentration reste valable pour la totalité des souches isolées dans le bouillon fermenté à l'exception de la levure *C. krusei* (CK). Son isolement répétitif dans les échantillons de LS destiné à être alimenté dans le réacteur est vraisemblablement à l'origine de sa prolifération dans le fermenteur. Étant initialement absente à chaque redémarrage du fermenteur avec un nouvel inoculum (composé de KM, SU et LF), le délai moyen pour la détecter dans les échantillons de bouillon fermenté, relativement court, est de l'ordre de 2 à 7 jours. La Figure 2 montre deux démarrages typiques du fermenteur de Biocompact avec un nouvel inoculum où CK pénètre, prolifère et domine la flore originale, provoquant ainsi un débalancement de celle-ci. Le cas d'espèce illustré dans les graphiques de la Figure 1 est récurrent à chaque nouveau démarrage, tel qu'il est montré dans le Tableau 4. Ainsi, le bilan de l'équilibre de la flore de fermentation de Biocompact peut être résumé comme suit : l'inoculation avec une nouvelle culture en consortium est rapidement confrontée à la prolifération de CK qui colonise le milieu en cours de fermentation. En même temps, la croissance de deux des 3 souches du consortium de départ (LF et SU) est sévèrement affectée, d'où leur lessivage progressif du fermenteur. Il est difficile de montrer un lien entre la prolifération de CK et le lessivage des deux souches de la culture mixte. Enfin, la fermentation du LS se poursuit avec une culture remodelée, composée principalement des deux levures KM et CK.

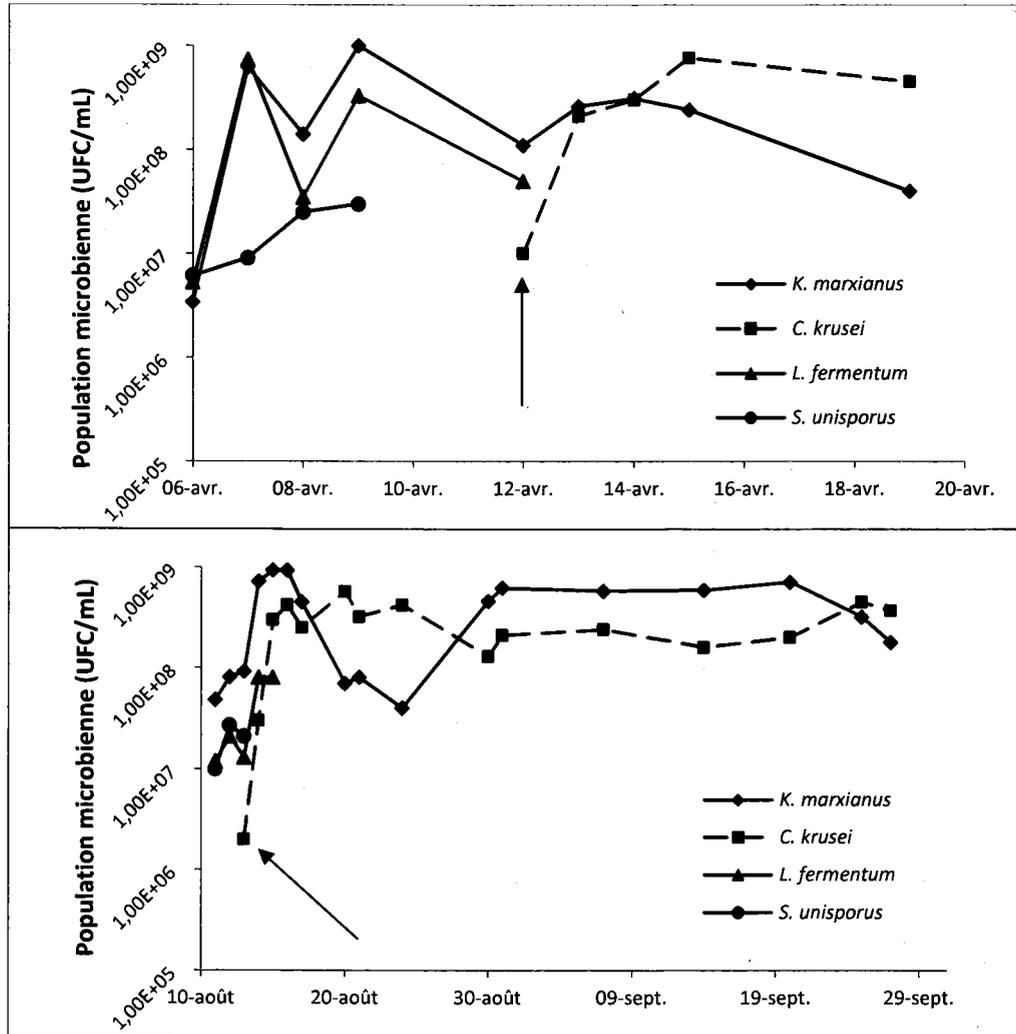


Figure 2- Occurrence de la contamination par *C. krusei* et sa persistance dans la flore de fermentation

Tableau 4- Taux de contamination de la flore Biocompact par *C. krusei*

Date	CK (UFC/mL)*	% CK	% KM	% LF	% SU
23 jan – 4 fév 2010	$2.3 \times 10^8$	60%	26%	13%	Indéetectable
23 avr 2010	$7 \times 10^8$	96%	4%	Indéetectable	Indéetectable
21 – 24 août 2010	$3.7 \times 10^8$	86%	14%	Indéetectable	Indéetectable
19 – 20 sept 2010	$2 \times 10^7$	3%	97%	Indéetectable	Indéetectable
25 sept – 3 oct 2010	$4.6 \times 10^8$	65%	31%	Indéetectable	Indéetectable

\* les valeurs représentent des moyennes des comptes cellulaires analysés sur toute la durée correspondante. Les données présentées dans le Tableau 4 sont différentes de celles figurant sur les graphes de la Figure 2 ci-dessus.

Une revue exhaustive de la littérature sur l'implication de CK dans les procédés biotechnologiques a permis de montrer plusieurs similitudes avec le phénomène observé dans le procédé Biocompact.

*a- Contamination des procédés de production de la levure boulangère :*

Le phénomène de contamination du procédé de production de *S. cerevisiae* par CK est une problématique industrielle réelle qui a été rapportée dans plusieurs études scientifiques menées dans des usines en Finlande, en Afrique du Sud, en Grande Bretagne ou encore en Autriche. En effet, il est très courant que la production de levure boulangère soit sujette à plusieurs types de contamination par des bactéries, des moisissures et surtout des levures. Ces dernières, appelées levures sauvages (*wild yeasts*), sont les plus nuisibles à la prolifération de *S. cerevisiae* en raison de leur temps de génération très court, leur permettant de coloniser les réacteurs et de gêner la multiplication de la levure boulangère (Fowell, 1965, Suihko & Makinen, 1981, Tracey *et al.*, 1984). Il a été rapporté que, dans des conditions de culture favorables et à un taux de contamination équivalent à 1 cellule sur  $10^6$  cellules de *S. cerevisiae*, le temps de génération de CK atteint environ 1 h, tandis que celui de *S. cerevisiae* est de 2.6 h lorsqu'elle est cultivée sur les mélasses de betterave (Suihko & Makinen, 1981). D'autre part, l'existence de plusieurs techniques microbiologiques, basées sur l'utilisation de différents milieux de cultures à base de lysine ou d'antibiotiques (Fowell, 1965, Kunz & Klaushofer, 1961, Tracey *et al.*, 1984), développées afin de détecter rapidement la contamination des réacteurs par CK, démontre l'importance du rôle joué par cette souche dans les environnements de production industrielle.

*b- Analogies avec le procédé Biocompact :*

Le phénomène de contamination observé dans les procédés de production de la levure boulangère impliquant la souche CK présente d'importantes similitudes avec le phénomène observé dans le procédé Biocompact de fermentation du lactosérum par une flore mixte, constituée principalement de la levure *K. marxianus*. Le point commun le plus intéressant est le fait que CK parvienne à proliférer dans un environnement où les sources de carbone principales, le saccharose des mélasses de betterave et le lactose du LS, ne sont pas assimilables par cette levure. En effet, d'un point de vue métabolique, la capacité assimilatrice en termes de sources de carbone est limitée au glucose, au glycérol, au N-

acétyl-glucosamine et à l'éthanol (Kurtzman & Fell, 1998). Lorsqu'elle est propagée en culture pure dans la mélasse, la levure CK montre une très faible production de biomasse vu que ce substrat contient principalement du saccharose et du maltose. Le glucose représente environ 1 % des sucres contenus dans les mélasses, présent sous forme de sucre inverti (Suihko & Makinen, 1981). D'autre part, des essais de production de biomasse par la propagation de CK dans le LS se sont avérés insatisfaisants par rapport à la culture d'autres levures lactose positives (Graham *et al.*, 1953), prouvant l'incapacité de la souche à assimiler le lactose (Skinner & Fletcher, 1960). Cependant, une fois mise en co-culture avec une souche dégradant la source de carbone principale, CK parvient à pousser d'une manière prolifique. En présence de *S. cerevisiae*, la conversion substantielle du saccharose en éthanol permet de fournir une source de carbone facilement assimilable pour CK (Suihko & Makinen, 1981). De même, la présence de levures lactose positives, telles que *T. cremoris* ou *K. marxianus*, permet le largage de métabolites secondaires (sous-produits de leur métabolisme oxydo-fermentaire), facilement assimilables par CK pour soutenir sa croissance (Cristiani-Urbina *et al.*, 2000).

*c- Interactions microbiennes entre CK et les flores microbiennes d'intérêt :*

De prime abord, les observations faites sur le phénomène de contamination des deux procédés de production de biomasse microbienne par la levure CK laissent prétendre à un type d'interactions où CK tire profit des activités métaboliques de la flore initiale de fermentation. Il s'agirait donc d'une interaction de type commensalisme qui régirait la relation de CK avec les souches de microorganismes impliquées dans la production industrielle, puisque ces dernières fournissent des sources de carbone supportant la croissance de CK. Cependant, l'effet de la prolifération de CK dans le milieu qu'elle contamine est questionnable et semble déroger à la neutralité caractérisant la relation de la population commensale (CK) vis-à-vis de la population hôte. En effet, l'introduction de CK dans le fermenteur du procédé Biocompact coïncide avec la perturbation de l'équilibre de la flore, caractérisée par le lessivage des souches *L. fermentum* et *S. unisporus*. Il s'agit d'un évènement récurrent à chaque démarrage du fermenteur avec un nouvel inoculum, tel qu'illustré par les deux exemples présentés dans la Figure 1. Ainsi, il est évident que tirer une conclusion éclairée vis-à-vis de la relation de CK envers les souches du consortium, sans

recourir à des investigations plus poussées sur les modifications physicochimiques de l'environnement de la fermentation, devient inapproprié. Néanmoins, l'hypothèse que CK influe négativement sur la croissance des souches de la culture mixte d'intérêt ne peut être écartée. En effet, une étude menée sur l'équilibre d'une culture mixte de levures (*G. candidum*, *H. anomala* et *C. krusei*) pour la production de biomasse sur la vinasse de whisky a montré, qu'une fois mise en co-culture, CK se multiplie intensément dans le fermenteur au point de dominer la flore mixte (50 % de sa composition), provoquant une rupture de sa stabilité (Barker *et al.*, 1982). Les auteurs ont émis l'hypothèse d'un phénomène de répression de la croissance de *G. candidum* et *H. anomala* lorsque les conditions de culture, en termes de taux de dilution et de composition de substrat, sont favorables à la multiplication de CK. Ces observations faites sur le comportement de CK, mise en présence d'une culture mixte, laisseraient suggérer une relation amensale entre CK et les autres microorganismes avec lesquels elle est cultivée, qu'elle réprimerait par son activité métabolique dans le milieu de fermentation. Ce type de relation entre les populations ne serait pas permanent, mais serait plutôt favorisé par des conditions environnementales bien précises. En résumé, la capacité de CK à supporter une croissance convenable dans un substrat dont la source de carbone principale est non assimilable (LS, mélasses) dépend exclusivement de l'activité métabolique des microorganismes avec lesquels elle est co-cultivée. Ce phénomène observé pour le procédé Biocompact a été vérifié par plusieurs études menées sur le procédé de fermentation de la levure boulangère, *S. cerevisiae*, ainsi que par celle rapportée par Cristiani-Urbina *et al.* (2000), portant sur la production de levure sur un substrat à base de lactosérum. Par ailleurs, les observations découlant des suivis microbiologiques de la stabilité de la flore dans le temps ont montré que la recrudescence de CK dans le fermenteur coïncidait avec une redéfinition de la composition de la flore du consortium, caractérisée par la perte de deux souches. Par conséquent, si une interaction d'amensalisme est vérifiée pour CK vis-à-vis des souches du consortium, la stabilité de la culture mixte serait compromise.

### 2.1.3. Rendements épuratoire et de production de biomasse du procédé Biocompact

Le procédé Biocompact utilise une flore mixte pour la conversion du lactose en biomasse microbienne. Le LS utilisé comme substrat est alimenté d'une manière continue, sans avoir été traité au préalable pour l'extraction des protéines sériques. Tel que résumé dans le Tableau 2 (Chapitre 1), le taux de conversion du lactose en biomasse est de  $0.33 \pm 0.03$  g/g, ce qui est relativement faible comparé à des procédés conventionnels de production de biomasse où les rendements sont de l'ordre de  $0.45 - 0.50$  g/g (Cristiani-Urbina *et al.*, 2000, Moulin *et al.*, 1983). Cette différence reste valable dans le cas de la productivité en biomasse ( $1.4 \pm 0.2$  g/L.h), de loin inférieure à celle rapportée pour les procédés industriels de Bel et de Vienne ( $4.4$  g/L.h et  $4.7$  g/L.h, respectivement). Malgré un contenu protéique de la biomasse intéressant ( $0.44 \pm 0.2$  %), les rendements de production du procédé Biocompact sont en deçà des rendements industriels obtenus pour des procédés similaires. Les procédés destinés à la production de biomasse sont développés et opérés de façon à assurer l'avènement et le maintien, dans la mesure du possible, d'un métabolisme purement oxydatif afin d'orienter la majeure fraction du flux glycolytique vers la production d'énergie, sous forme d'ATP, tout en minimisant la synthèse de sous-produits par les voies fermentaires. Cet objectif est atteignable en assurant le couplage entre les voies glycolytiques et les voies oxydatives subséquentes à travers le contrôle de la disponibilité des sources de carbone et d'oxygène d'une part, et le fonctionnement optimal des voies de biosynthèse d'autre (Ugalde & Castrillo, 2002). L'apport d'oxygène dissout est un élément primordial dans les procédés de production de biomasse. Dans le procédé Biocompact, l'apport d'oxygène est assuré par l'injection d'air dans le bouillon fermenté à travers une soufflante. La quantité d'air injectée dans le fermenteur ( $0.6$  vvm) est faible par rapport à celle rapportée dans le procédé industriel Bel ( $1.3$  vvm). Cette limitation est due principalement à la production excessive et aléatoire de mousse gênant l'injection d'air dans la cuve de fermentation. La production de mousse est un phénomène accompagnant les processus biologiques de fermentation où une aération et un mixage sont requis pour le bon déroulement du processus biologique. De plus, l'occurrence du moussage est nuisible à plusieurs niveaux puisqu'il entraîne une quantité substantielle de bouillon hors de la phase liquide et augmente les risques de bouchage des conduites de sortie des gaz et de la contamination (par l'humidification des filtres de sortie de gaz) (Najafpour, 2007). La formation excessive de mousse dans le fermenteur

Biocompact est principalement causée par la présence des protéines sériques, très utilisées dans les industries alimentaires pour leur pouvoir moussant (Foegeding *et al.*, 2006). En effet, leur maintien dans le substrat alimenté en cours de fermentation fournit un apport continu d'agent moussant rendant la production de mousse inévitable. Ceci impose à l'opérateur de réduire le débit d'incorporation d'air dans le bouillon ainsi que son volume (vol. utile / vol. total = 32 m<sup>3</sup> / 70 m<sup>3</sup>) afin de prévenir la montée de la mousse jusqu'aux événements du fermenteur. Par conséquent, il se produit un abaissement considérable de la teneur en oxygène dissout nécessaire pour l'activité métabolique d'oxydation du lactose, entraînant inévitablement le déclenchement des voies métaboliques fermentaires à l'origine de la production de métabolites secondaires, dont principalement l'éthanol (produit par *K. marxianus*), représentant une source de carbone de choix pour CK. En ce qui concerne les performances épuratoires du procédé, l'incapacité de la flore à oxyder totalement le lactose du LS, ainsi que la présence des protéines sériques non assimilées par celle-ci, sont responsables de la charge organique élevée à la sortie du fermenteur, après séparation de la biomasse. En effet, les protéines sont retrouvées à une concentration de 3.5±0.5 g/L dans le surnageant de fermentation, correspondant à un apport entre 3800 et 5000 mg/L de DCO supplémentaire à la charge apportée par le lactose non oxydé. La charge totale moyenne des effluents est de 12900 mg/L; elle est largement supérieure aux exigences normatives imposées par la réglementation municipale.

Une étape de traitement thermique du LS à alimenter a ensuite été intégrée parmi les opérations en amont de la fermentation afin de maîtriser l'apport de la levure sauvage CK. Des essais de pasteurisation en laboratoire ont montré que le barème de pasteurisation appliqué était capable d'éradiquer la flore endogène du LS ainsi que CK, inoculée intentionnellement pour les besoins de l'expérimentation. Au niveau du procédé industriel, le traitement implanté a consisté en une pasteurisation en ligne selon un barème de 72°C pendant 25 s, effectuée dans un échangeur de chaleur tubulaire. Subséquemment à la mise en place de l'opération de pasteurisation, les suivis microbiologiques effectués en cours de fermentation ont montré une légère réduction de la population microbienne dans le bouillon fermenté et provenant du substrat alors que le même profil de contamination de la culture mixte par CK a persisté. Malgré l'efficacité du traitement thermique contre la levure sauvage, sa multiplication continue dans le fermenteur laisse supposer qu'il existe une ou plusieurs autres sources à l'origine de l'apport de CK dans l'environnement de l'usine. En effet, dans les fermentations conduites en mode continu, le risque de

contamination avec le temps reste toujours élevé malgré la maîtrise de la qualité du substrat (Ugalde & Castrillo, 2002). Par ailleurs, la pasteurisation a engendré une contrainte technologique liée à la présence des protéines sériques dans le substrat. En effet, le traitement thermique a engendré la dénaturation des protéines sériques provoquant ainsi leur précipitation partielle au niveau des parois de l'échangeur de chaleur d'où la formation d'agrégats ayant augmenté les risques de colmatage. Conséquemment, la présence de protéines sériques précipitées dans le bouillon contribue à augmenter son contenu en matières en suspension et à limiter le transfert de l'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide, le rendant moins disponible aux cellules (Tyagi *et al.*, 2009). Il semblerait aussi que la précipitation des protéines solubles ne leur ait pas fait perdre leurs propriétés tensio-actives puisque le phénomène de moussage, malgré le fait qu'il soit difficilement quantifiable, reste toujours omniprésent.

## **2.2. Récapitulatif de l'étude préliminaire et contexte du projet**

Le procédé Biocompact a été développé afin de proposer une solution de valorisation d'un rejet agroalimentaire très polluant dans le but de traiter sa charge polluante, tout en produisant un produit à valeur ajoutée potentielle. Les défaillances inhérentes au procédé Biocompact ont été mises en évidence grâce à une analyse systématique des performances cinétiques du procédé, ainsi que de la stabilité de la flore de fermentation, effectuées sur une période de production de 8 mois. Ainsi, au regard des analyses effectuées, il a été possible de tirer les conclusions générales suivantes :

- Dans ce type de procédé utilisant une culture mixte, la stabilité de la flore de fermentation est un élément clé permettant d'assurer une performance robuste et compétitive ainsi qu'une qualité de produit élevée et reproductible. Les suivis microbiologiques effectués ont montré que la stabilité de la flore était compromise à chaque ré-ensemencement d'un inoculum frais. En effet, il s'en suit de manière récurrente un lessivage de deux souches du consortium et leur remplacement par la levure sauvage contaminante CK.
- La prolifération incontrôlée de CK provoque un débalancement de la flore du consortium qui dénature la qualité du produit fini de ses caractéristiques initiales, à savoir une biomasse formée des 3 espèces microbiennes *K. marxianus*, *S. unisporus* et *L. fermentum*.

- Les plus faibles rendements de production ainsi que la capacité épuratoire limitée du procédé le rendent industriellement non viable. Ces rendements limités sont principalement dus à la présence des protéines sériques dans le substrat, empêchant d'aérer correctement la culture en raison de la formation excessive de mousse.
- La difficulté de contrôler la production de mousse, ayant imposé un faible taux d'aération, a directement affecté la capacité oxydative de la flore en induisant le déclenchement des voies métaboliques fermentaires, peu rentables en termes de production de biomasse. La réduction de la capacité oxydative de la flore a imposé la dilution du substrat afin d'élever le seuil de déclenchement du métabolisme fermentaire et de réduire la fraction de lactose non dégradée.
- La dilution du LS a pour conséquence d'augmenter la consommation d'eau par le procédé ainsi que le volume d'effluent rejeté. La stratégie de dilution représente définitivement une limitation considérable à la possibilité d'élargir la capacité de traitement de quantités plus importantes de LS.

À la lumière des bilans effectués sur le fonctionnement du procédé Biocompact, il apparaît intéressant d'étudier de plus près le fonctionnement du procédé de fermentation du LS sous deux principaux aspects. Un premier aspect concerne l'étude de la cinétique de conversion du lactose en biomasse microbienne ainsi que la possibilité de remodeler la flore de fermentation afin de maximiser les rendements en biomasse. Le second aspect est plus fondamental; il s'intéresse à la détermination de la nature des interactions microbiennes régissant les populations de la culture mixte. Ceci aura pour conséquence d'acquérir un niveau de compréhension plus approfondi du fonctionnement d'un procédé de fermentation du LS avec une culture mixte et de proposer une version optimisée qui puisse aboutir à des rendements industriels exploitables commercialement. Le présent projet a été réalisé en étroite collaboration avec la compagnie LactoScience inc., désormais détentrice légale de la technologie Biocompact.



## **CHAPITRE 3 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE**

### **3.1. But du projet**

Le but de ce projet s'articule autour de l'étude, du développement et de l'optimisation d'un procédé de fermentation exploitant le potentiel nutritif du lactosérum pour la production de biomasse microbienne à valeur ajoutée, destinée à une application dans le domaine de la nutrition humaine et animale. La technologie développée représentera une étape cruciale d'un processus d'industrialisation d'un procédé de fermentation d'un sous-produit industriel de qualité alimentaire. La réussite de ce projet est inhérente à l'obtention de rendements de production de biomasse et épuratoires élevés, rendant le procédé économiquement viable. L'aboutissement à des performances rentables initiera la mise en place d'une approche de mise à l'échelle, étape primordiale dans le cheminement vers l'industrialisation des procédés biotechnologiques.

### **3.2. Problématique et hypothèses de recherche**

Plusieurs études ont rapporté l'utilisation de KM comme organisme assimilant et métabolisant le lactose afin d'épurer le LS de sa charge organique et produire une biomasse à valeur ajoutée. Cependant, le métabolisme respiro-fermentaire de KM induit la transformation d'une fraction du carbone assimilé en métabolites secondaires, affectant directement le taux de conversion du lactose en biomasse ainsi que les rendements épuratoires du procédé. Le recours à l'utilisation d'une culture mixte, découlant d'une sélection de souches performantes, peut jouer un rôle capital pour maximiser le rendement en biomasse en captant le carbone issu des métabolites produits par KM et en améliorant ainsi la qualité de l'épuration du rejet. Dans ce contexte, la littérature rapporte plusieurs études impliquant des cultures mixtes pour la production de biomasse, sans pour autant expliquer la nature des interactions entre les membres de celles-ci. Pour la majorité de ces études, les efforts consacrés à l'explication des interactions microbiennes ont porté sur des hypothèses et des assomptions sans se baser sur des analyses poussées, faisant en sorte que ces hypothèses reposent sur des bases fragiles. Pourtant, la détermination du type

d'interactions microbiennes donne beaucoup de poids lorsqu'il s'agit de juger de la stabilité de la culture mixte développée au cours de la fermentation du LS, surtout dans l'optique du développement d'un procédé industriel.

La problématique majeure liée au développement d'un procédé de conversion du lactose en biomasse microbienne consiste à atteindre des rendements de production et d'épuration satisfaisants. La revue de la littérature ainsi que l'étude préliminaire rapportées dans le présent manuscrit ont permis de dégager un nombre d'hypothèses que l'on se propose de vérifier par une expérimentation rigoureuse.

- 1) La levure KM est l'organisme clé du procédé. Il s'agit d'une levure lactose-positive caractérisée par un métabolisme respiro-fermentaire, très avantageux dans le contexte d'une production de biomasse microbienne. Une des caractéristiques importantes de ce métabolisme est la canalisation d'une fraction du flux de carbone vers la sécrétion d'intermédiaires métaboliques, pouvant servir de sources de carbone assimilables par des souches lactose-négatives.
- 2) Le procédé développé dans un contexte de culture mixte permet d'aboutir à de meilleurs rendements de production et d'épuration. En effet, la culture mixte offre plusieurs avantages par rapport à la culture pure, notamment, en créant une barrière à la contamination (plus particulièrement, contre l'intrusion de CK) et en améliorant les performances cinétiques du procédé de fermentation en assimilant les métabolites secondaires produits par KM à cause de son métabolisme respiro-fermentaire.
- 3) Les interactions microbiennes mises en évidence entre les populations proliférant au sein de la culture mixte déterminent la stabilité et la robustesse du procédé de fermentation visé et permettent de mieux comprendre le comportement de chaque population au cours de la fermentation du LS.

### 3.3. Objectifs de recherche

Ce travail comporte trois objectifs principaux :

- 1) Étude de la cinétique de croissance de KM en culture pure sur le lactosérum : étant la souche clé du procédé, KM est cultivée sur le LS dans différentes conditions afin de déterminer ses paramètres cinétiques de croissance et de dégradation du lactose.
  - a- Criblage des conditions de température, pH initial et de concentration de lactose sur les paramètres cinétiques de KM : le rendement de conversion du lactose en biomasse, le taux de croissance spécifique, la productivité en biomasse, les taux de dégradation du lactose et de la DCO, le quotient métabolique et le coefficient de maintenance.
  - b- Optimisation multivariée des variables production de biomasse et dégradation de la DCO par la méthodologie des surfaces de réponse (MSR).
  - c- Validation des conditions optimales dans un fermenteur de 5 L.
  - d- Étude de l'effet de certains facteurs (déprotéinisation du LS, sources d'azote, oligo-éléments) sur les paramètres cinétiques de KM cités ci-dessus.
  
- 2) Développement d'un procédé de fermentation du LS avec une culture mixte :
  - a- Criblage de consortiums microbiens en termes de production de biomasse et de consommation du lactose et sélection du consortium le plus efficace.
  - b- Optimisation multivariée des conditions de croissance (T, pH et concentration en lactose L) du consortium sélectionné pour les variables production de biomasse, contenu en protéine de la biomasse et consommation du lactose. Les expériences seront effectuées dans des fioles Erlenmeyer.
  - c- Optimisation de la quantité d'inoculum à ensemer et validation des conditions optimales par des essais dans un fermenteur de 5 L.
  - d- Étude des performances du procédé développé (fermentation d'un LS déprotéiné et non déprotéiné à 5 % p/v de lactose) et effet sur la stabilité de la flore lors d'une culture en batch.

- 3) Caractérisation du type d'interactions entre les souches de la culture mixte.
- a- Analyse des profils des acides organiques sécrétés suite à la conversion du lactose des souches KM et LF ainsi que du couple KM-LF, cultivés sur le LS déprotéiné (perméat de LS ou PLS).
  - b- Caractérisation de la cinétique de croissance de la souche lactose-négative cultivée sur les filtrats de fermentations des souches lactose-positives cultivées sur le PLS.
  - c- Détermination des types d'interactions microbiennes entre les différentes populations dans la culture mixte.

## CHAPITRE 4 : MÉTHODOLOGIE

Le présent chapitre décrit les techniques et méthodes d'analyses employées au cours de cette étude ainsi que les approches d'estimation des paramètres cinétiques lors de la fermentation du LS. Les chapitres 5 et 6 du présent manuscrit décrivent respectivement l'étude de la cinétique de croissance de la levure KM en culture pure dans le LS et la sélection d'un consortium microbien ainsi que l'optimisation de sa cinétique de croissance dans le LS. Le chapitre 7 présente l'étude des interactions microbiennes régissant la culture mixte sélectionnée cultivée sur le LS. Les principes méthodologiques spécifiques à chaque objectif de l'étude sont décrits dans les chapitres respectifs.

### 4.1. Souches utilisées : isolement, identification et conservation

Les espèces de levures (*Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* et *Candida krusei*) et de bactéries (*Lactobacillus fermentum*), formant le pool ayant servi à constituer les cultures mixtes binaires ou tertiaires utilisées au cours de la présente étude, ont été isolées à partir du substrat, du bouillon fermenté ou de l'eau résiduelle provenant du procédé de fermentation du LS (St-Prime, QC, CA). La technique d'isolement utilisée a consisté à étaler des fractions de 100 µL de chaque type d'échantillon sur des géloses de milieux de culture de Man Rogosa et Sharpe (MRS agar) et de soya tryptonée (TS agar), disposées dans des plats de Pétris. Après une incubation de 24 à 48h, les différentes colonies apparaissant sur les géloses ont été isolées, selon leurs morphologies, puis repiquées une première fois sur les mêmes milieux solides à l'aide d'une anse de platine. Après s'être assuré de leur pureté respective, les isolats ont été soumis à une observation microscopique (microscope optique Axio Observer de Carl Zeiss Microscopy, Allemagne) afin de déterminer leur type respectif. Ensuite, une colonie de chaque isolat a été prélevée avec l'anse puis inoculée dans les bouillons MRS et TS, selon qu'il s'agisse d'une bactérie, d'une levure ou d'un champignon. Ensuite, les cultures des isolats ont été incubées sous une agitation de 150 rpm pendant 24h afin de procéder à leur identification.

Les isolats ont été identifiés selon leurs profils biochimiques, établis via les galeries API 20C AUX et 50 CHL, et génétiques, par le séquençage de l'ADN ribosomal 16S pour les bactéries et 18S pour les levures. Les profils biochimiques déterminés par les galeries API sont rapportés dans l'Annexe 2. Les souches de levure et de bactérie ont été cultivées, respectivement, sur les milieux YMB et MRS, aliquotées puis conservées à -80°C en présence d'une solution de glycérol (25% p/v) comme cryoprotecteur.

## 4.2. Préparation du substrat de fermentation

La procédure de préparation du substrat décrite dans cette section a été appliquée à toutes les cultures en fioles agitées effectuées au cours de cette étude. Le substrat de fermentation est composé de lactosérum reconstitué à partir de poudres de lactosérum ou de perméat de lactosérum commerciales (Lactosérum Saputo, Saint-Hyacinthe, Québec), en ajoutant un volume d'eau de robinet afin d'atteindre la concentration de lactose ciblée. Le substrat reconstitué est ensuite supplémenté, selon le cas, par l'urée ou le sulfate d'ammonium de façon à atteindre une concentration d'azote d'1 g/L. Le mélange est enfin traité thermiquement à 100°C pendant 5 minutes à l'autoclave. Un volume de 100 mL du substrat est disposé dans une fiole Erlenmeyer de 500 mL et son pH est ensuite ajusté aseptiquement à la valeur désirée en utilisant l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1N) ou l'hydroxyde de sodium (NaOH, 1N). Dans certaines conditions, des minéraux et des éléments traces ont été ajoutés au milieu de culture (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L; MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 6 mg/L; FeCl<sub>3</sub> 3 mg/L; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5 mg/L; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.3 mg/L) (Bayer, 1983).

## 4.3. Conditions de fermentation pour les cultures en fioles agitées

### a- Fermentations de *K. marxianus* en culture pure

Une pré-culture de KM a été préparée dans le bouillon de soya tryptoné (TSB). Celle-ci est ensuite incubée à 35°C sous une agitation de 200 rpm pendant 14 – 18 h. Pour toutes les fermentations faites dans les fioles agitées, l'inoculation des substrats a été effectuée en incorporant un volume de pré-cultures permettant d'obtenir une concentration initiale en cellules entre  $2.5 \times 10^6$  –  $5 \times 10^6$  UFC/mL (équivalent à un taux d'inoculation de 1% v/v).

#### *b- Fermentations en culture mixtes*

Des mélanges binaires ou tertiaires de souches ont été constitués à partir des pré-cultures préparées dans le bouillon de soya tryptoné (TSB) pour *K. marxianus*, *C. krusei* et *C. utilis*, dans le bouillon d'extrait malté pour levures (YMB) pour *S. unisporus* et *S. cerevisiae* et dans le bouillon MRS pour la bactérie lactique *L. fermentum*, afin d'inoculer le LS. Les ratios des souches dans les cultures binaires ou tertiaires sont, respectivement, de 1:1 et 1:1:1. L'approche ayant servi à constituer ces mélanges est expliquée dans la section 6.1.1 du chapitre 6. L'ensemencement du substrat a été effectué avec un inoculum de 1 % (v/v) par rapport au volume de substrat dans la fiole. Le volume de chaque pré-culture, correspondant à un microorganisme donné, est de 0.5% (v/v) et 0.33% (v/v) pour les mix binaires et tertiaires, respectivement.

Pour tous les essais en fioles agitées, la fermentation du LS s'est déroulée dans un incubateur agitateur de type New Brunswick Scientific (CT, É.-U) sous une agitation constante de 180 RPM. Dans le cas des essais préliminaires de KM cultivée pure, les fermentations ont été conduites jusqu'à l'épuisement total du lactose dans le milieu. Les essais préliminaires avec les cultures mixtes ont duré de 24 à 36h. Par ailleurs, tous les essais d'optimisation par la méthodologie des surfaces de réponse se sont déroulés sur une durée de 24h. Les essais préliminaires et d'optimisation ont été effectués dans des plages de variations de pH, de température et de concentration en lactose comprises entre 3.5 – 5.5, 27°C – 40°C et 8 g/L – 43 g/L, respectivement. Le détail sur ces conditions opératoires est rapporté dans les chapitres 5 et 6 du présent manuscrit.

#### **4.4. Procédure d'optimisation multivariée et analyses statistiques**

La procédure d'optimisation des variables de production de la biomasse et de la dégradation de la DCO comporte une première phase durant laquelle les facteurs température (T), pH et concentration en lactose (L) sont criblés, variable par variable, afin de localiser approximativement leurs zones d'optimalité. Par la suite, l'optimisation est effectuée par l'exécution d'un plan d'expérience de type central composite (PCC) afin d'étudier les effets linéaires et quadratiques de chaque facteur, ainsi que les interactions possibles entre eux, sur les réponses à optimiser. Les résultats des expériences du PCC sont ensuite analysés par la

méthodologie des surfaces de réponse (MSR), couplée à l'application de la fonction de désirabilité (FD). Le schéma général de la procédure d'optimisation multivariée est représenté dans la Figure 3 Les résultats de l'optimisation sont ensuite validés par des expériences complémentaires, en fiole agitées puis en fermenteurs. La procédure d'exécution du PCC, de la MSR et de la FD pour chaque procédure d'optimisation est détaillée dans les chapitres 5 et 6. Toutes les analyses statistiques correspondantes à cette section ont été effectuées avec le logiciel Statgraphics Centurion (Version 15.1.02, Statpoint, Inc., US).

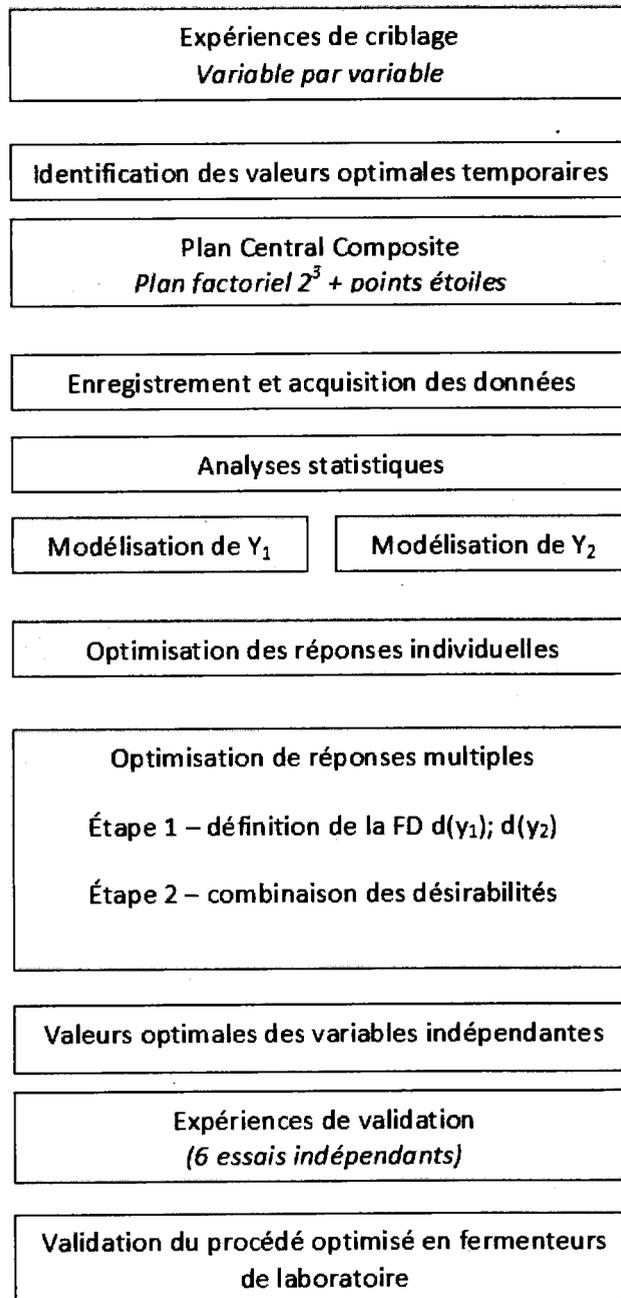


Figure 3- Différentes étapes de l'approche d'optimisation multivariée

## 4.5. Fermentation en réacteur de laboratoire

Toutes les cultures de KM, seule ou en cultures mixtes, sur le lactosérum ont été effectuées dans des fermenteurs BioStat B Plus de 5 litres de volume total (Sartorius Stedim Biotech, Allemagne) (Figure 4). Les fermenteurs sont munis d'un système de contrôle automatisé du pH, de la température, de l'oxygène dissout, de l'agitation et de l'aération. Les fermenteurs sont contrôlés via un automate programmable permettant la commande automatique des consignes pour chacun des paramètres cités, ainsi que l'affichage graphique de leur évolution en cours de fermentation. Préalablement au traitement thermique du substrat, l'électrode de pH est calibrée en utilisant des solutions tampons de pH 4 et 7 (Fisher Scientific, ON, Canada). La sonde à oxygène dissout (OD) est calibrée à zéro, à l'aide d'une solution de sulfite de sodium 1N, et à 100%, avec l'air saturé.

L'enceinte du fermenteur est stérilisée à 121°C pendant 15 minutes. En parallèle, le milieu de culture (3.5 L) est traité thermiquement à 100°C pendant 5 minutes puis disposé aseptiquement dans l'enceinte du fermenteur préalablement stérilisé. Le contenu du fermenteur est ensuite refroidi à la température de fermentation puis inoculé à un taux de 5% (v/v) à partir des pré-cultures préparées comme décrit précédemment (section 4.3). Un taux d'aération et une vitesse d'agitation variant respectivement entre 2 – 3.5 litres d'air par minute et 400 – 750 rpm, ont été appliqués afin de maintenir le taux d'OD au-dessus de 15 % de saturation, seuil critique pour la croissance optimale des microorganismes (Tribe *et al.*, 1995). La température est contrôlée via un système de circulation d'eau tempérée dans la double paroi de l'enceinte du fermenteur. Le maintien du pH est assuré par l'ajout automatisé de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N et de NaOH 4N via des pompes péristaltiques. La production de mousse est contrôlée par l'ajout d'un agent anti-moussant chimique, le poly-diméthylsiloxane (PDMS) (Chemco, Québec). Des échantillons sont prélevés de manière systématique et soumis aux analyses décrites ci-après. Au cours des expériences de fermentation dans les réacteurs de 5 L, certaines cultures ont été supplémentées en éléments minéraux (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L; MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 6 mg/L; FeCl<sub>3</sub> 3 mg/L; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5 mg/L; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.3 mg/L), (Bayer, 1983)) afin d'étudier l'influence de ces derniers sur le comportement physiologique des cultures (cette supplémentation n'a concerné ni les essais préliminaires ni ceux du PCC). Pour cela, une solution concentrée (100X) contenant les éléments à ajouter a été préparée dans de l'eau distillée stérile et utilisée pour supplémenter le substrat

préalablement stérilisé et refroidi, afin d'éviter la précipitation des minéraux sous l'effet de la chaleur.

Les essais en fermenteur dans l'étude de la cinétique de croissance de KM, cultivée en souche pure sur le LS, ont été effectués dans les conditions déterminées par la méthodologie des réponses de surface, à savoir un pH, une température et une concentration en lactose de 3.70, 40.2°C et 33.4 g/L, respectivement. Pour les essais en fermenteur utilisant la culture mixte, les conditions de pH, de température et de concentration de lactose respectives sont 4.43, 34.8°C et 35 g/L.



Figure 4- Fermenteurs BioStat B Plus de 5L avec leur panneau de contrôle

## 4.6. Analyses physicochimiques et microbiologiques

### 4.6.1. Préparation des échantillons et analyses physicochimiques

Au cours des fermentations, tous les échantillons de substrats et de bouillons fermentés à caractériser ont été prélevés dans des tubes coniques stériles de 50 mL de volume et rapidement stockés à 4°C afin d'inhiber l'activité des microorganismes. Un volume de 25mL de chaque échantillon a ensuite été centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 minutes, dans une centrifugeuse de type Sorvall RC 5C (Kendro Laboratory, CT, É.-U). Une fraction du surnageant est collectée dans des microtubes et stocké à 4°C jusqu'à son dosage. Pour la mesure de la biomasse produite,

le culot contenant la biomasse formée, ainsi que les protéines sériques coagulées, est suspendu dans l'eau distillée et séché à 105°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante. La concentration de la biomasse microbienne<sup>1</sup> produite est corrigée en soustrayant la masse obtenue avant inoculation.

L'estimation de la teneur en protéines de la biomasse est effectuée par le dosage de l'azote total par combustion totale de la matrice organique (Dumas, 1826). Les culots provenant respectivement de la centrifugation de 10 mL de bouillon fermenté et du substrat avant inoculation sont préalablement lavés à deux reprises avec de l'eau physiologique (NaCl; 0.9 % p/v) afin d'éliminer les traces d'azote résiduel, puis re-suspendus dans l'eau distillée. L'azote total du substrat et de la biomasse est ensuite dosé par combustion à 900°C en utilisant un analyseur de type Leco Truspec (St-Joseph, Michigan, É.-U). La teneur en protéines de la biomasse est déterminée en multipliant la concentration d'azote par un facteur de 6.25, après avoir soustrait la quantité de protéines contenue dans le culot du substrat avant inoculation. Ainsi, toutes les valeurs des protéines rapportées dans la présente étude représentent exclusivement la fraction des protéines issue de la biomasse microbienne.

La demande chimique en oxygène (DCO) est déterminée selon la méthode standard APHA (2005). La méthode est basée sur un dosage spectrophotométrique impliquant l'oxydation poussée de la matière organique par un puissant réactif oxydant, en présence de bichromate de potassium. Ce dernier change de couleur proportionnellement à la quantité de matière organique oxydée. Le dosage est effectué par une mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm. La DCO (mg/L) de l'échantillon est estimée selon une gamme étalon standard. Le rendement épuratoire est calculé selon l'équation (1).

La concentration de lactose résiduel dans le surnageant est déterminée par spectrophotométrie en utilisant l'acide dinitrosalicylique (DNS), tel que décrit par Miller (1959). Le DNS, de couleur jaune, réagit avec l'extrémité réductrice du lactose et vire à l'orange. L'intensité de la coloration est dépendante de la quantité de lactose disponible pour réduire le réactif. Une solution de

---

<sup>1</sup> Dans cette étude, le terme biomasse microbienne désigne le paramètre mesurant la quantité de biomasse formée, exprimée en g/L, au cours de la fermentation du LS. Ce terme est à distinguer de celui de compte cellulaire qui représente une analyse du nombre de cellules dans un échantillon donné.

lactose à 2 g/L est utilisée pour établir une gamme étalon contre laquelle la concentration en lactose de l'échantillon est déterminée.

$$\text{Rendement Épuratoire (\%)} = \frac{DCO_0 - DCO_f}{DCO_0} \times 100 \quad (1)$$

Avec :  $DCO_0$  : DCO initiale de l'échantillon;  $DCO_f$  : DCO finale de l'échantillon.

#### 4.6.2. Profils des acides organiques et des glucides

La caractérisation des profils des acides organiques et des glucides a été effectuée dans le but d'élucider les interactions régissant les souches de la culture mixte au cours de la fermentation du lactosérum. Les échantillons de bouillon fermenté, préalablement stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , ont été centrifugés à 10 000 RPM pendant 10 minutes dans une centrifugeuse de type Sorvall RC 5C Plus Microcentrifuge. Le surnageant a ensuite été filtré sur une membrane de difluorure de polyvinylidène de  $0.2 \mu\text{m}$  de diamètre (Ann Arbor, MI, É.-U), dilué au  $1/5^{\text{ième}}$  dans une solution d'acide sulfurique (0.0085 N) et entreposé immédiatement à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 1 h, jusqu'à son injection dans l'appareil de chromatographie.

L'identification et la quantification des composés organiques ont été réalisées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Waters, Milford, MA, É.-U). L'appareil est équipé d'une colonne d'exclusion d'ions de type Ion 300 (Transgenomic, Toronto, ON, CA) composée d'un copolymère de polystyrène sulfonaté et de divinylbenzène (PS/DVB). La détection des composés élués est effectuée grâce à un détecteur à indice de réfraction (Waters, modèle R410). L'avantage que présente la colonne utilisée reliée à ce type de détecteur est la possibilité d'effectuer la séparation des acides organiques, des glucides et des alcools sur une même colonne. La séparation des composés organiques s'effectue à une température de  $37^{\circ}\text{C}$  sous un débit de  $0.4 \text{ mL/min}$  d'éluant ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0.0085 N) pour un volume d'échantillon de  $100 \mu\text{L}$ .

Une gamme étalon avec les standards des composés à tester (Sigma Aldrich, MO, É.-U) a été effectuée aux fins de l'identification et de la quantification des composés organiques recherchés dans le bouillon fermenté des cultures. Les composés testés appartiennent à la classe des glucides (lactose, glucose, galactose, ribose), des acides organiques (acides oxalique, maléique, citrique,

pyruvique, succinique, lactique, acétique, adipique, (iso)-butyrique et (iso)-valérique) et des alcools (éthanol et glycérol). Pour les besoins de l'identification des métabolites produits, un échantillon de substrat de PLS reconstitué a été analysé par HPLC et utilisé comme contrôle positif.

#### **4.6.3. Analyses microbiologiques**

##### *a- Dénombrements de la levure KM cultivée sur le LS*

Dans les fermentations effectuées dans le cadre de l'étude de la cinétique de croissance de KM en culture pure sur le LS, le compte cellulaire de la levure pour chaque échantillon a été déterminé par étalement sur gélose de soya tryptoné (TSA) après avoir effectué des dilutions décimales de l'échantillon dans l'eau saline à 0.9 % (p/v). Les valeurs des comptes cellulaires rapportées pour chaque échantillon représentent une moyenne d'au moins 4 dénombrements.

##### *b- Dénombrements des microorganismes dans les cultures mixtes*

Des fermentations de LS ont été effectuées avec des consortiums de microorganismes. Dans cette section, nous nous limitons à détailler la méthodologie de dénombrement sélectif des souches impliquées dans ces cultures mixtes. L'explication du principe sur lequel s'est basée la constitution de ces mélanges est détaillée dans le chapitre 6.

D'une manière générale, la différenciation entre deux ou plusieurs souches dans une culture mixte a été réalisée en utilisant des milieux de culture spécifiques à chaque microorganisme. Plus particulièrement, les milieux de culture ont été développés en se basant sur la source de carbone assimilée exclusivement par chaque levure. Le choix des sources de carbone s'est basé principalement sur les données de la littérature ainsi que sur les profils biochimiques obtenus avec les galeries API (Annexe 2). La composition des milieux de culture ayant servi à dénombrer les levures contient 6.7 g/L de milieu azoté basal pour levures (*Yeast Nitrogen Base*, YNB, Difco). Ce milieu contient les minéraux et les oligoéléments ainsi qu'une source minérale d'azote (le sulfate d'ammonium), nécessaires pour promouvoir la prolifération des levures. À ce milieu basal, 5 g/L de la source de carbone adéquate est rajouté puis le mélange est ensuite supplémenté d'agar (15 g/L), stérilisé puis coulé dans des boîtes de Pétri.

- Parmi les microorganismes utilisés dans cette étude, deux sont lactose-positifs : la levure KM et la bactérie LF. Étant la seule levure assimilant le lactose, KM a été quantifiée sur le milieu Lactose-YNB où le lactose est la source de carbone. Il est important de mentionner à ce niveau que la bactérie LF est incapable de former des colonies sur ce milieu en raison de la carence en sources d'azote organique et en composés complexes, apportés par l'addition d'extrait de levure ou de peptone au milieu de culture, tel qu'il est expliqué dans la revue de la littérature (section 1.1.3 d). Ainsi, dans les mélanges impliquant KM et LF, l'utilisation du milieu Lactose-YNB permet de dénombrer exclusivement la levure KM.
- Parmi les espèces de levures utilisées dans cette étude, *C. utilis* (CU) et *C. krusei* (CK) assimilent de manière **exclusive** le cellobiose et le *N*-acétylglucosamine (NAG), respectivement (Tableau 30 de l'annexe 2). Ainsi, les milieux de culture Cellobiose-YNB et NAG-YNB permettent de dénombrer respectivement CU et CK de manière sélective lorsqu'elles sont cultivées en consortium.
- Les levures *S. cerevisiae* (SC) et *S. unisporus* (SU) assimilent le galactose. Le milieu Galactose-YNB a été utilisé afin de dénombrer ces deux levures lorsqu'elles sont cultivées en culture mixte. Dans les cultures impliquant une association entre SC ou SU avec KM (elle-même galactose-positive), le compte cellulaire des deux levures est déterminé indirectement en soustrayant le compte cellulaire de KM (obtenu sur Lactose-YNB) du compte total (KM+SU ou KM+SC) obtenu sur Galactose-YNB.
- Le dénombrement du lactobacille a été réalisé sur gélose MRS avec un temps d'incubation de 24 h. En effet, la limitation du temps d'incubation à 24 h permet de minimiser la formation de colonies sur la même gélose par les levures, plus lentes à se développer par rapport à la bactérie. De plus, sur cette gélose, LF forme des colonies à morphologie typique permettant de la distinguer facilement des autres colonies susceptibles d'être formées par les levures avec lesquelles elle est cultivée.

Dans tous les cas de figures d'essais avec des consortiums de microorganismes, des vérifications rigoureuses ont été effectuées afin de valider les techniques de comptages utilisées.

#### 4.7. Détermination des paramètres cinétiques

Au cours des fermentations du LS impliquant des cultures pures (chapitre 5) ou mixtes (chapitres 6 et 7), le suivi des différents paramètres physicochimiques (biomasse, g/L; lactose résiduel, g/L; DCO, mg/L, protéines g/L et acides organiques, g/L) et microbiologiques (comptes cellulaires, UFC/mL), moyennant des échantillonnages effectuées à des intervalles de 1.5 – 2h, a permis de calculer des paramètres cinétiques permettant de qualifier l'efficacité du procédé en termes de production de biomasse et de dégradation de la charge organique du LS. Les paramètres cinétiques ont été estimés selon Aiba et al. (1973) et Pirt (1975).

- Le taux de croissance spécifique maximal ( $\mu_{max}$ ; h<sup>-1</sup>) a été déterminé en estimant la pente de la courbe semi-logarithmique du compte cellulaire (UFC/mL) en fonction du temps de fermentation durant la phase exponentielle de croissance.
- Les productivités volumétriques de la consommation du lactose ( $P_{Lactose}$ ; g/L.h), de la production de biomasse ( $P_X$ ; g/L.h) et de la dégradation de la DCO ( $P_{DCO}$ ; g/L.h) ont été déterminées par différentiation des courbes respectives de concentration du lactose, de la teneur en biomasse et de la DCO en fonction du temps de fermentation.
- Le quotient métabolique, ou taux de consommation spécifique de lactose ( $q_{Lactose}$ ; g/g.h) représente la productivité d'assimilation du lactose pondérée à la quantité de biomasse microbienne. Il est calculé selon l'Équation (2).
- Le coefficient de maintenance cellulaire ( $m$ ; g/g.h) ainsi que les rendements en biomasse apparent et réel ( $Y_{x/s}$  et  $Y_{EG}$ ; g/g) ont été estimés selon l'Équation (3). Le traçage de la courbe représentant l'évolution de  $1/Y_{x/s}$  en fonction de  $1/\mu$  permet d'obtenir une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine représentent le coefficient de maintenance cellulaire  $m$  et le rendement de conversion réel de la souche ( $Y_{EG}$ ), respectivement.

$$q_{Lactose} = \frac{\mu_{max}}{Y_{x/s}} \quad (2)$$

$$\begin{cases} 1/Y_{x/s} = 1/Y_g + m/\mu \\ Y_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \end{cases} \quad (3)$$

Où :

$Y_{x/s}$  (g/g) : rendement de conversion du lactose en biomasse mesuré (apparent).

$Y_g$  (g/g) : rendement de conversion réel, lorsque le coefficient  $m$  est nul.

$X_0, X_f$  : concentrations de la biomasse en début et en fin de fermentation, respectivement.

$S_0, S_f$  : concentrations de lactose en début et en fin de fermentation, respectivement.

$m$  (g/g.h) : coefficient de maintenance cellulaire (taux spécifique de substrat dédié à la maintenance cellulaire).

$\mu$  ( $h^{-1}$ ) : taux de croissance spécifique à chaque temps  $t$ .

#### **4.8. Détermination des taux de transfert et de consommation de l'oxygène et du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène**

Le taux de transfert volumétrique de l'oxygène ( $K_{La}$ ) ainsi que les taux de transfert (*Oxygen transfer rate, OTR*; mg/L.h) et de consommation de l'oxygène (*Oxygen uptake rate, OUR*; mg/L.h) ont été estimés graphiquement à l'aide de la méthode dynamique de *Gassing in / Gassing off* (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009), appliquée sur les cultures réalisées dans les réacteurs de laboratoire. Le bilan massique de l'oxygène dissout en présence de microorganismes peut s'écrire selon l'Équation 4. L'arrêt de l'alimentation en air en cours de fermentation permet de déterminer le taux de consommation d'oxygène par la levure (Équation 5). Cette estimation se fait graphiquement, en mesurant la pente de la droite représentant la concentration en oxygène dissout ( $C_L$ ; mg/L) en fonction du temps durant la phase d'arrêt d'alimentation en air. Lors de la phase de réalimentation en air, le coefficient de transfert volumétrique de l' $O_2$  ( $K_{La}$ ) est estimé en réarrangeant l'Équation 4 du bilan massique, tel que décrit par l'Équation 6. Ainsi, la valeur de la pente de la droite représentant l'évolution de l'oxygène dissout ( $C_L$ ; mg/L) en fonction de  $(Q_{O_2}X + \frac{dC_L}{dt})$  permet d'estimer la valeur de  $K_{La}$ .

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR \quad (4)$$

En phase d'arrêt de l'aération :

$$\frac{dC}{dt} = -OUR \quad (5)$$

En phase de reprise de l'aération :

$$C_L = C^* - 1/k_L a \times (Q_{O_2} X + \frac{dC_L}{dt}) \quad (6)$$

Avec :

$$OUR = Q_{O_2} \cdot X \text{ et } OTR = K_L a \times (C^* - C_L)$$

Où :

$C^*$  : concentration d'O<sub>2</sub> dissout à saturation selon la pression et la température du liquide dans le fermenteur (mg/L).

$C_L$  : concentration d'O<sub>2</sub> dissout au temps  $t$  (mg/L).

$K_L$  : coefficient de transfert de masse (cm h<sup>-1</sup>).

$a$  : aire interfaciale d'échange gaz – liquide par volume de liquide (cm<sup>2</sup> cm<sup>-3</sup>).

$Q_{O_2}$  : taux spécifique de consommation d'O<sub>2</sub>.

$X$  : concentration de la biomasse dans le milieu au temps  $t$ .

## CHAPITRE 5 : CINÉTIQUES DE DÉGRADATION DE LA DCO ET DE PRODUCTION DE BIOMASSE DE *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* CULTIVÉE SUR LE LACTOSÉRUM

Le présent chapitre est en lien avec l'objectif 1, tel que décrit dans le chapitre 3.

La levure KM utilisée dans ce travail appartient au groupe des levures fermentaires facultatives et *Crabtree* négative en référence à son métabolisme résistant à la répression catabolique (Van Dijken *et al.*, 1993). Cette levure montre des caractéristiques physiologiques spécifiques conditionnant sa large utilisation dans les procédés biotechnologiques à l'échelle industrielle (Fonseca *et al.*, 2007, Lane & Morrissey, 2010). En effet, KM a été utilisée pour la production d'enzymes (Barnby *et al.*, 1990, Mahoney *et al.*, 1975), de bio-ingrédients tels que les extraits de levure, les oligo-saccharides, les oligo-nucléotides (Belem *et al.*, 1997, 1998a) ou de composés aromatiques tels que le 2-phenyléthanol (Wittmann *et al.*, 2002). Elle a largement été utilisée dans les procédés de fermentation du lactosérum pour la production de biomasse microbienne et la réduction de la charge organique en dégradant le lactose (Aktaş *et al.*, 2006, Ghaly & Kamal, 2004, Moresi *et al.*, 1980). Toutes ces applications biotechnologiques de KM ont été motivées par les propriétés métaboliques et physiologiques de cette levure. En effet, l'espèce *K. marxianus* est reconnue pour sa capacité à croître dans une large gamme de températures en plus d'être capable d'utiliser une large panoplie de substrats et d'atteindre des taux de croissance spécifiques élevés grâce à ses capacités respiratoires importantes (Bellaver *et al.*, 2004, Castrillo & Ugalde, 1993).

### 5.1. Approches d'optimisation multivariée

L'optimisation des bioprocédés requiert l'établissement de modèles décrivant avec une grande exactitude leur comportement global. La construction d'un modèle cinétique nécessite d'avoir un degré avancé de compréhension des mécanismes biochimiques du bioprocédé et de leur complexité. D'un point de vue expérimental, il est généralement difficile d'extraire des informations mécanistiques satisfaisantes concernant le procédé microbiologique aux fins de développement d'un modèle cinétique structuré le décrivant (Haaland, 1989). Du fait qu'elle se

base sur une approche simplifiée et des assumptions, la modélisation empirique (ou statistique) est connue pour être bien adaptée au design des bioprocédés, à leur contrôle et à leur optimisation, constituant ainsi une bonne alternative à la modélisation cinétique structurée (Lee & Gilmore, 2006).

L'approche classique d'optimisation variable par variable d'un procédé impose de faire varier un facteur à la fois en gardant les autres constants. Cette approche est longue à mettre en œuvre et peut s'avérer inefficace surtout lorsque plusieurs facteurs nécessitent d'être optimisés et que les interactions entre eux risquent d'influencer la réponse à optimiser. La méthodologie des surfaces de réponses (MSR) est une approche d'optimisation multivariée représentant un outil pratique constituant une alternative à la traditionnelle méthode d'optimisation variable par variable (Geiger, 1997). En effet, considérant l'extrême complexité du métabolisme microbien, le comportement d'un procédé de fermentation doit être décrit en prenant obligatoirement en compte les interactions entre les différentes variables. Cette approche constitue la base de l'optimisation multivariée où l'ensemble des facteurs étudiés sont variés simultanément afin de construire un modèle empirique décrivant le plus fidèlement possible la complexité élevée du procédé biologique, et permettant ainsi d'avoir un degré de compréhension satisfaisant de l'effet de chaque facteur sur la réponse étudiée (Ferreira *et al.*, 2007, Grothe *et al.*, 1999, Lee & Gilmore, 2006). Deux types de variables sont à considérer dans l'approche d'optimisation multivariée : les *Réponses*, ou variables dépendantes dont les valeurs dépendent des niveaux de variation des *Facteurs*, ou variables indépendantes.

Le défi de l'approche d'optimisation multivariée réside dans la construction d'un modèle fiable avec un nombre minimal d'expériences. En effet, il s'agit d'extraire le maximum d'information d'un nombre minimal d'expériences afin de réduire leur temps, leur coût et les ressources mises en œuvre pour les réaliser en utilisant les plans d'expériences. Le plan d'expérience le plus utilisé dans l'optimisation des bioprocédés est le plan Central Composite (PCC). Il s'agit d'un plan statistiquement monté autour d'un nombre limité d'expériences planifiées permettant d'en extraire le maximum de données. Il s'agit d'un outil ayant démontré son efficacité lorsque les niveaux des facteurs étudiés sont relativement proches de leurs valeurs optimales (Geiger, 1997, Goupy, 1999). Pour cela, il est nécessaire de procéder, au préalable, à l'application d'un PCC, à des expériences de criblage afin de localiser les régions d'optimalité des variables indépendantes.

L'approche de la MSR est limitée à l'optimisation des réponses individuelles, sans prendre en considération la possibilité de les optimiser conjointement. Cette situation pourrait s'avérer problématique lorsque les valeurs optimales des variables indépendantes pour chaque réponse étudiée ne sont pas localisées dans le même spectre (Derringer & Suich, 1980). Dans le cas de la présente étude, les deux réponses à étudier, la production de biomasse et la dégradation de la DCO, sont d'égales importances. Décrite par Harrington (1965), l'approche utilisant la fonction de désirabilité (FD) représente un outil statistique développé afin d'estimer les optimaux de chaque facteur en considérant conjointement les réponses étudiées. En d'autres termes, la FD permet de trouver le meilleur compromis entre les réponses lors de l'optimisation des variables indépendantes. La méthode d'optimisation utilisant la FD consiste à réduire la complexité d'un modèle d'optimisation multivariée en un modèle univarié, plus simple. En pratique, la FD transforme chaque réponse étudiée  $Y_i$  en un nombre adimensionnel de désirabilité  $d_i$  variant entre 0 (critère complètement indésirable) et 1 (critère entièrement désirable). Les désirabilités individuelles  $d_i$  sont combinées en une fonction de désirabilité globale  $D$  définie comme la moyenne géométrique des  $d_i$ . Les valeurs des variables indépendantes sont ensuite déterminées de manière à maximiser la désirabilité globale  $D$  (Berget & Næs, 2002, Derringer & Suich, 1980, Li *et al.*, 2007, Trautmann & Weihs, 2006).

Le présent chapitre s'intéresse à l'étude de KM en tant que souche clé dans le procédé industriel de fermentation du lactosérum pour la production de biomasse et la dégradation de la DCO. Dans sa description originelle, le procédé industriel Biocompact utilise une culture mixte composée de 3 souches incluant deux levures (KM et SU) et une bactérie lactique (LF) (Section 2.1.1). Avec le lactobacille, KM est la souche principale du consortium microbien industriel puisqu'il s'agit de la seule levure capable de dégrader le lactose. Grâce à son métabolisme respiro-fermentaire, cette souche est capable de fournir les nutriments nécessaires à la croissance des souches lactose-négatives (Cristiani-Urbina *et al.*, 2000). De ce fait, il devient primordial de caractériser cinétiquement la levure KM, ce qui permettra par la suite de modéliser et d'optimiser sa croissance dans le lactosérum. Ainsi, dans ce chapitre, il est question de se pencher sur l'étude de la cinétique de croissance de KM en culture pure dans le LS afin d'acquérir la connaissance des conditions optimales de croissance de KM permettant de procéder à l'optimisation de tout le

procédé de fermentation dans le sens d'une augmentation de la production de biomasse et d'une amélioration de la dégradation de la DCO, nécessaire pour la disposition du rejet.

## 5.2. Méthodologie du plan d'expériences et d'optimisation multivariée

L'approche expérimentale d'optimisation adoptée dans ce chapitre se divise en deux phases. La première phase de l'optimisation des conditions de croissance de la souche KM a consisté en une série d'essais de criblage variable par variable afin d'estimer les plages de variation des facteurs température de croissance ( $T$ ),  $pH$  et concentration initiale en lactose ( $L$ ), ainsi que leur influence sur les réponses étudiées à savoir la production de biomasse et la dégradation de la DCO. Durant cette phase, un échantillonnage systématique suivi des analyses mentionnées ci-dessus (Section 4.6) sont effectués afin d'étudier la cinétique de croissance de KM et de localiser à priori les zones optimales de variation de chaque facteur. La seconde phase de l'optimisation intervient une fois que les zones d'optimalité des facteurs aient été localisées. Elle consiste en l'application d'un PCC rotatif mis en place afin d'étudier les effets des variables indépendantes ( $T$ ,  $pH$ ,  $L$ ), leurs interactions et leurs effets quadratiques sur les variables dépendantes (la production de biomasse et le rendement épuratoire). Cette phase implique la réalisation d'un bloc dupliqué de 14 expériences de fermentation avec 6 réplicats au niveau du point central (pour un nombre total de 40 expériences). Les niveaux de variation de chaque facteur ainsi que leurs valeurs sont résumés dans le Tableau 5.

**Tableau 5- Niveaux des facteurs du Plan Central Composite appliqué à des cultures pures de KM sur le LS**

Plan Central Composite rotatif					
Niveaux des variables étudiées					
	$-α$	$-1$	$0$	$+1$	$+α$
Température (°C)	27.3	30	34	38	40.7
$pH^*$	3.16	3.5	4.0	4.5	4.84
Lactose (g/L)	16.6	20	25	30	33.4

\* Les valeurs désignent le pH initial de la culture. Il n'y a pas de contrôle de pH au cours de la fermentation.

Une fois les expériences du PCC effectuées, un modèle polynomial du second ordre est ajusté aux données relatives à chaque réponse (Équation 7). Ensuite une analyse de la variance (ANOVA) est effectuée afin de s'assurer de la qualité de l'ajustement du modèle et de déterminer la significativité des effets des facteurs étudiés.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1} \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} \beta_{ij} X_i X_j \quad (7)$$

Où :

$Y$  est la réponse prédite de la variable dépendante (production de biomasse et rendement épuratoire);  $X_i$  et  $X_j$  : les variables indépendantes influençant la réponse  $Y$ ;  $\beta_0$  : constante de l'équation du second ordre;  $\beta_i$  et  $\beta_{ii}$  : coefficients de régression linéaire et quadratique de chaque variable indépendante, respectivement.  $\beta_{ij}$  : coefficient de régression des interactions entre deux variables indépendantes.

Après avoir déterminé les valeurs optimales de  $T$ ,  $pH$  et  $L$  pour chacune des réponses étudiées séparément, l'étape finale de la procédure statistique est l'optimisation simultanée des deux réponses, basée sur l'application de la fonction de désirabilité sur les modèles mathématiques construits durant la MSR. Dans le cas de la présente étude, les deux réponses étudiées (production de biomasse et rendement épuratoire) sont à maximiser. La transformation appliquée dans ce cas est celle représentée par l'Équation (8) :

$$d_i = \begin{cases} 0 \\ \left( \frac{\hat{y} - y_{low}}{y_{high} - y_{low}} \right)^s \\ 1 \end{cases} ; \text{ if } y_{low} \leq \hat{y} \leq y_{high} \quad (8)$$

Où :  $d_i$  est la FD générée pour chaque réponse;  $\hat{y}$  est la réponse prédite;  $y_{low}$  et  $y_{high}$  sont les limites inférieures et supérieures pour les valeurs acceptables/non-acceptables spécifiées, respectivement; et  $s$  est le paramètre définissant la forme de la fonction. Dans notre cas,  $s = 1$  ce qui fait que la FD augmentera linéairement vers  $\hat{y}$ .

La désirabilité globale  $D$  est la moyenne géométrique des  $d_j$ . Elle est calculée comme suit (Équation 9) :

$$D = (d_1^{w_1} \times d_2^{w_2} \times d_3^{w_3} \times \dots \times d_n^{w_n})^{1/n} \quad (9)$$

Où :  $D$  : désirabilité globale,  $w$  : coefficient d'impact et  $n$  : nombre de variables dépendantes.

### 5.3. Résultats et discussion

#### 5.3.1. Caractérisation de la cinétique de croissance de KM

Des expériences de criblage ont été effectuées afin d'étudier l'effet de la température, du pH et de la concentration initiale de lactose sur la croissance de la souche KM cultivée sur le lactosérum en procédant à l'étude de sa cinétique de production de biomasse, de consommation du lactose et de dégradation de la DCO. Le choix de ces facteurs a émané de la simplicité de contrôle et de manipulation de ces paramètres durant les opérations industrielles.

##### *a- Effet de la température :*

La dépendance des paramètres cinétiques de croissance de KM vis-à-vis de la température de fermentation a été étudiée en appliquant la loi d'Arrhenius (Équation 10). Le traçage des courbes de variation du taux spécifique de croissance ainsi que du taux spécifique de consommation du lactose en fonction de la température (Équations 11) a permis d'obtenir les profils illustrés dans la Figure 5.

$$K = Ae^{-\frac{E}{RT}} \quad (10)$$

Avec :

$K$  : le coefficient de vitesse de la réaction

$R$  : la constante des gaz parfaits ( $8.31 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ )

$T$  : la température absolue ( $^{\circ}\text{K}$ )

$A$  : le facteur de fréquence (prend la même unité que  $K$ )

$E$  : l'énergie d'activation de la réaction ( $\text{J.mol}^{-1}$ )

$$\begin{cases} \log(\mu) = \log(A) - \frac{E_{\mu}}{2.3 RT} \\ \log(q_{lactose}) = \log(A) - \frac{E_q}{2.3 RT} \end{cases} \quad (11)$$

Une augmentation de la température a induit une augmentation exponentielle du taux spécifique de croissance de levure jusqu'au seuil de 35°C où il atteint sa valeur maximale (Figure 5-A). Entre 35°C et 45°C, la diminution du taux de croissance spécifique indique que la souche croît moins vite dû probablement à un effet létal de la température sur une fraction de la population cellulaire. Cette plage correspondrait à une zone de températures supra-optimales pour le taux de croissance spécifique qui tend à décroître (Van Uden, 1984). D'autre part, l'augmentation de la température induit une augmentation constante du quotient métabolique de KM ( $q_{Lactose}$ ; g/g.h) (Figure 5-B). L'estimation des énergies d'activation pour le taux spécifique de croissance et pour le quotient métabolique sont de 47.7 kJ/mol et de 60.9 kJ/mol, respectivement. Il existe très peu de rapports scientifiques indiquant des estimations d'énergie d'activation relatives au quotient métabolique. La valeur de  $E_{\mu}$  estimée pour la souche KM est comprise entre celle de *S. cerevisiae* cultivée sur la mélasse (34.6 kJ/mol) (Phisalaphong *et al.*, 2006) et celle rapportée pour la levure thermotolérante *Candida valida* (59.8 kJ/mol) cultivée sur l'éthanol comme source de carbone (Chistyakova *et al.*, 1983).

Le Tableau 6 regroupe les conditions de culture étudiées au cours de la phase de criblage ainsi que les valeurs des paramètres cinétiques de la croissance de KM sur le lactosérum. Dans la plage de température étudiée, il est possible d'observer une augmentation continue du taux de consommation du lactose ( $P_{Lactose}$ ; g/L.h) avec, cependant, une intensité plus importante entre 30°C et 32°C qu'entre 32°C et 40°C. À 40°C, le rendement épuratoire ainsi que le taux de dégradation de la DCO sont à leur maximum. L'augmentation de la température de fermentation est susceptible d'affecter le taux de croissance spécifique ainsi que le rendement en biomasse en provoquant des altérations au niveau des macromolécules (plus particulièrement, les enzymes et les lipides). Ceci a pour conséquence de créer des perturbations de voies métaboliques clés et de provoquer une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire favorisant ainsi la fuite des composés intracellulaires (Pirt, 1975, Van Uden, 1984). De ce fait, les voies métaboliques de la maintenance cellulaire seront de plus en plus sollicitées afin de compenser la perte du matériel cellulaire et les dégâts survenus au niveau de la membrane cellulaire augmentant ainsi le

coefficient global de maintenance cellulaire au dépend du rendement de production de biomasse (Verduyn, 1991). D'un point de vue ingénierie, de faibles températures de fermentation favorisent un meilleur transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide augmentant ainsi la disponibilité de l'oxygène dissout aux cellules en croissance (Saliceti-Piazza, 1996). Un rendement de dégradation de la DCO élevé serait en principe dû à une consommation efficace du lactose par la levure. Il a été observé qu'entre 35°C et 40°C, les valeurs de  $P_{\text{Lactose}}$  étaient relativement similaires (3.37 et 3.43 g/L.h, respectivement) et que le lactose était complètement dégradé après 16h de fermentation pour les deux températures. Par conséquent, une augmentation équivalente de la dégradation de la DCO serait attendue dans la même plage de température. Cependant, le rendement épuratoire du système à 35°C était d'environ 45% plus faible que celui à 40°C. En raison du métabolisme respiro-fermentaire de KM, particulièrement sous des conditions de limitation en oxygène, le flux glycolytique est partagé entre la croissance cellulaire et la production de métabolites (Castrillo & Ugalde, 1993). Il a été rapporté que plusieurs souches de KM exhibaient un métabolisme diauxique durant leur croissance; une fois que la source de carbone principale est épuisée, les cellules se tournent vers la consommation des métabolites produits (par exemple, le succinate, le pyruvate, l'acétate, l'éthanol) comme sources de carbone et d'énergie alternatives (Beausejour *et al.*, 1981, Fonseca *et al.*, 2007). Des expériences conduites dans le cadre de cette problématique ont montré que la souche KM exhibait un métabolisme diauxique en consommant ses métabolites à la suite de la déplétion du lactose (Annexe 3). Le taux de dégradation de la DCO élevé, observé à 40°C (0.59 g/L.h) par rapport à celui obtenu à 35°C (0.31 g/L.h), est possiblement dû à un phénomène de *stripping* (entraînement à l'air) des métabolites secondaires volatils produits par la culture (tels que les cétones, les alcools ou les aldéhydes) (Saliceti-Piazza, 1996).

Les expériences de criblage ont permis d'avoir une idée approximative du comportement de KM sous différentes conditions de température de fermentation 'industriellement' raisonnables. En effet, il a été possible de localiser les plages de température optimales pour la production de biomasse et la dégradation de la DCO à travers la consommation du lactose. Les observations faites à ce niveau sont identiques à celles rapportées par plusieurs références de la littérature concernant le comportement cinétique de KM en fonction de la température de fermentation; les températures optimales sont localisées dans des régions différentes, dépendamment si la

production de biomasse ou la dégradation de la DCO est l'objectif visé (Moresi *et al.*, 1980, Moresi & Sebastiani, 1979).

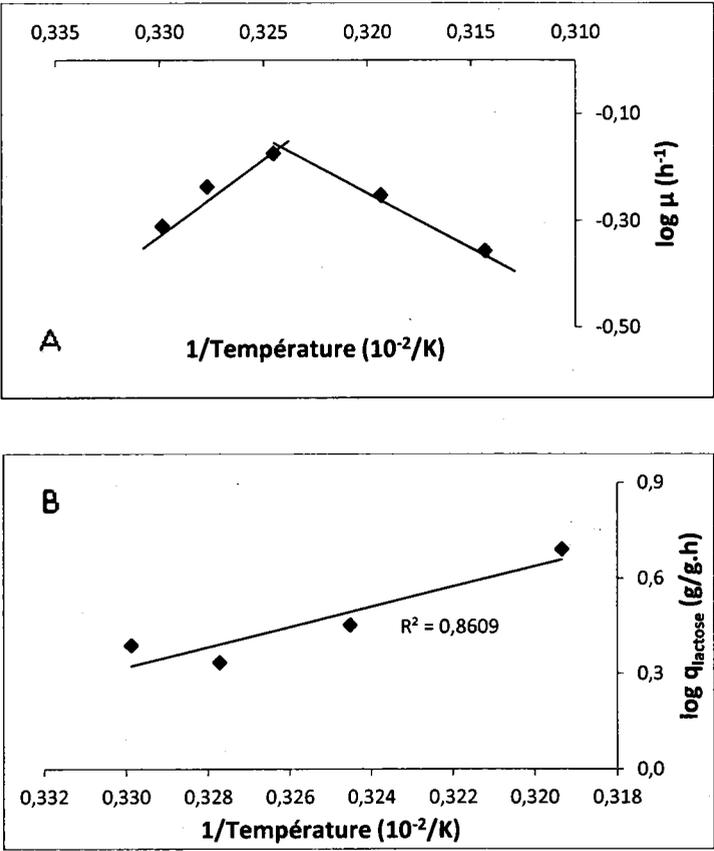


Figure 5- Effet de la température sur (A) le taux de croissance spécifique ( $\mu$ ; h<sup>-1</sup>) et (B) le quotient métabolique ( $q_{lactose}$ ; g/g.h), selon le modèle d'Arrhenius (La température est exprimée en °Kelvin)

Tableau 6- Paramètres cinétiques de *K. marxianus* cultivée pure dans le LS durant les expériences de criblage

Temp. (°C)	pH initial	[Lactose] (g/L)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Compte cellulaire (UFC/mL)	Biomasse (g/L)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	P <sub>Lactose</sub> (g/L.h)	q <sub>lactose</sub> (g/g.h)	P <sub>DCO</sub> (g/L.h)	Rendement épuratoire (%)
30	5.5	33.75	0.57	1.5×10 <sup>8</sup>	4.10	0.2	2.07	2.45	0.21	22
32	5.5	34.87	0.56	4.2×10 <sup>8</sup>	8.62	0.27	3.77	2.16	0.38	25
35	5.5	33.80	0.56	2.7×10 <sup>8</sup>	7.05	0.24	3.37	2.84	0.31	21
40	5.5	33.60	0.69	1.7×10 <sup>8</sup>	4.36	0.11	3.43	4.91	0.59	31
45	5.5	34.65	0.44	3×10 <sup>7</sup>	0.97	nd	nd	nd	0.26	9
50	5.5	33.87	nd	10 <sup>5</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
35	2.5	33.8	0.16	1.8×10 <sup>7</sup>	0.5	0.03	1.32	5.52	0.34	18
35	3.5	34.9	0.55	1.5×10 <sup>8</sup>	3.84	0.11	3.20	4.95	0.52	37
35	4.5	34.33	0.66	1.9×10 <sup>8</sup>	4.87	0.14	3.34	4.65	0.25	18
35	5.5	34.07	0.56	2.1×10 <sup>8</sup>	5.38	0.16	3.25	4.03	0.31	21
35	5.5	8.15	0.63	2×10 <sup>8</sup>	5.13	0.68	0.45	1.62	0.17	33
35	5.5	10.90	0.98	2×10 <sup>8</sup>	5.64	0.57	0.9	1.86	0.29	30
35	5.5	14.75	0.92	1.7×10 <sup>8</sup>	4.36	0.33	1.13	3.21	0.28	31
35	5.5	20.30	0.77	3×10 <sup>8</sup>	7.65	0.4	2.23	1.91	0.4	33
35	5.5	28	0.79	3×10 <sup>8</sup>	7.7	0.3	2.57	3.20	0.35	30
35	5.5	33.80	0.56	2.7×10 <sup>8</sup>	7.05	0.24	3.37	2.84	0.31	21

nd : non déterminé

*b- Effet du pH :*

En variant le pH initial du milieu lors de la culture de KM sur le lactosérum, il a été observé que le taux de croissance spécifique et le rendement en biomasse les plus élevés ont été obtenus entre des pH de 3.5 et 5.5 (Tableau 6). Il a été montré que cette plage de pH était optimale pour la production de biomasse pour plusieurs souches de KM (Ghaly & Kamal, 2004, Moresi *et al.*, 1979). Le taux de dégradation du lactose a augmenté significativement en passant d'un pH initial

de 2.5 à un pH initial de 3.5. Ce taux est ensuite demeuré constant entre des pH initiaux de 3.5 et de 5.5. Ceci montre que le métabolisme de la levure est bien adapté aux environnements acides grâce au rôle de régulation de l'homéostasie vis-à-vis du pH, assurée par l'activité de l'enzyme ATPase localisée dans la membrane plasmique (Pirt, 1975, Verduyn, 1991). Cette propriété de KM a un impact pratique important dans le sens où fermenter à de faibles valeurs de pH constitue une barrière efficace à la contamination bactérienne pouvant affecter les fermenteurs industriels dans les zones de pH proches de la neutralité.

Le suivi de la variation du pH a été effectué en cours de fermentation. Le constat majeur ayant découlé de ce suivi est le suivant : plus le pH initial du milieu est acide, moins la variation du pH durant la culture de la levure est prononcée. En effet, pour des pH initiaux de 2.50, 3.50 et 4.50, les valeurs des pH des bouillons fermentés en cours de fermentation étaient de  $2.47 \pm 0.08$ ,  $3.64 \pm 0.16$  et  $4.69 \pm 0.22$ , respectivement. La variation de pH la plus importante a été observée au pH initial de 5.5 ( $\text{pH} = 5.62 \pm 0.31$ ). Cette variation de pH est moins élevée que celle rapportée par De Sanchez et Castillo (1980) pour une culture de KM sur le LS effectuée à un pH initial de 5.5 ( $\text{pH} = 5.20 \pm 1.57$ ). Cette différence est probablement due au fait que dans la culture de De Sanchez et Castillo, le sulfate d'ammonium ait été utilisé comme source d'azote. En effet, la dégradation d'un ion ammonium par la levure pour assimiler l'azote sous forme de  $\text{NH}_4^+$  entraîne la libération d'un ion  $\text{H}^+$  qui se transforme en acide sulfurique en présence d'ions sulfates. Cependant, la dégradation de l'urée (utilisée comme source d'azote dans la présente étude) est neutre en terme de potentiel hydrogène (Ugalde & Castrillo, 2002). L'effet tampon exercé par les protéines solubles du lactosérum pourrait aussi contribuer à réduire l'amplitude de la variation du pH par comparaison à l'étude de De Sanchez et Castillo (1980) où les protéines solubles ont été extraites par coagulation thermo-acide préalablement à la fermentation.

L'étude de la dégradation de la DCO en fonction du pH a abouti à des observations similaires à celles faites lors de l'étude de l'effet de la température. En effet, des taux de dégradation du lactose ( $P_{\text{Lactose}}$ ) observés aux pH 3.5, 4.5 et 5.5 montrant une faible variation (Tableau 6) laissent présumer des rendements épuratoires similaires. Cependant,  $P_{\text{DCO}}$  est maximale à pH 3.5 (0.52 g/L.h) par rapport à pH 4.5 et 5.5 (0.25 et 0.31 g/L.h, respectivement). L'hypothèse proposée pour expliquer ce phénomène serait que la variation des taux de dégradation de la DCO semble dépendre non seulement du taux de consommation du lactose par la levure mais aussi de

sa capacité à dégrader les métabolites secondaires largués dans le bouillon fermenté. Il est admis que le pH environnemental de la culture affecte la composition du milieu ainsi que la surface cellulaire via la dissociation de composés acides ou alcalins. L'acide lactique, métabolites bactériens présent dans le lactosérum de fromagerie, est principalement transporté vers le cytosol de KM à travers la membrane plasmique sous sa forme dissociée (anion lactate), via un canal de transport actif spécifique aux composés mono-carboxyliques, afin d'être métabolisé comme source de carbone par la levure (Barnett, 2008, Fonseca *et al.*, 1991).

*c- Effet de la concentration initiale de lactose :*

L'étude de l'effet de la concentration initiale de lactose sur les paramètres cinétiques de KM a montré que les rendements de production de biomasse ( $Y_{x/s}$ ; g/g) élevés sont corrélés aux faibles concentrations de lactose dans le milieu (Tableau 6). Les rendements de production de biomasse pour des concentrations de lactose de 8 g/L et de 10.9 g/L sont de 0.68 et 0.57 g/g, respectivement. Ces rendements sont équivalents à ceux rapportés dans une étude similaire (0.66 et 0.55 g/g pour des teneurs initiales en lactose de 5 g/L et 10 g/L, respectivement) portant sur la fermentation du lactosérum par *K. marxianus* IMAT 1872 effectuée en fioles Erlenmeyer (Moresi *et al.*, 1979). Il s'agit d'une caractéristique typique du rendement en biomasse de plusieurs souches de l'espèce KM cultivées en batch ou en continu sur des milieux synthétiques ou complexes (Castrillo & Ugalde, 1993, Ladet *et al.*, 1972, Moresi & Sebastiani, 1979). Ces rendements supérieurs au rendement théorique de conversion du lactose en biomasse ( $Y_{théorique}=0.53$  g/g) pourraient s'expliquer par le fait que l'épuisement du lactose dans le milieu incite la levure à chercher d'autres sources de carbone, y compris les métabolites issus de son métabolisme suite à la transformation du lactose au cours de la fermentation. La variation de la teneur en lactose dans le milieu a été positivement corrélée au taux de consommation du lactose ( $P_{Lactose}$ ; g/L.h) qui augmente avec l'augmentation de la concentration initiale de lactose (Tableau 2). Ceci est en accord avec la classification de KM parmi les levures *Crabtree* négatives capables de promouvoir un flux glycolytique élevé lorsque la concentration de la source de carbone dans le milieu augmente. Une fois que la capacité oxydative de la levure est atteinte, l'excès de carbone pris en charge par la cellule est orienté vers la production de métabolites intermédiaires (Bellaver *et al.*, 2004, Castrillo & Ugalde, 1993). L'occurrence du *shift* d'une voie métabolique oxydative vers une voie respiro-fermentaire est directement responsable du déclin du rendement

en biomasse quand la concentration en lactose augmente dans le milieu. Le rendement épuratoire du système est resté constant malgré la variation de la concentration en lactose, sauf pour la concentration 33.8 g/L. Le taux de dégradation de la DCO ( $P_{\text{DCO}}$ ; g/L.h) a augmenté en fonction de la concentration en lactose pour atteindre sa valeur maximale de 0.4 g/L.h à 20 g/L de lactose puis décroît légèrement entre 20 g/L et 34 g/L.

Les expériences de criblage discutées ci-haut ont permis de caractériser l'isolat industriel de KM en termes de paramètres cinétiques relatifs à la production de biomasse et à la dégradation de la DCO. Le constat majeur découlant de ces expérimentations est que les valeurs optimales des paramètres opérationnels (température, pH et concentration en lactose) sont localisées dans des zones différentes selon que la production de biomasse ou la dégradation de la DCO soit l'objectif visé, ce qui est en accord avec d'autres études portant sur KM (Fonseca *et al.*, 2008, Ladet *et al.*, 1972, Moresi *et al.*, 1980). À la lumière de ces résultats, un plan d'expériences a été bâti afin de modéliser l'effet de chaque facteur sur la production de biomasse et la dégradation de la DCO et déterminer leurs valeurs optimales via l'approche statistique d'optimisation multivariée.

### **5.3.2. Optimisation de la production de biomasse et de la dégradation de la DCO**

Les résultats des expériences d'optimisation multivariée de la production de biomasse et de la dégradation de la DCO basées sur la réalisation d'un plan Central Composite (PCC) sont présentés comme suit. Les conditions opératoires du PCC ainsi que les résultats bruts obtenus sont résumés dans le Tableau 7. Des analyses de la variance (ANOVA) basées sur le test de Fisher (Test- $F$ ) ont été réalisées afin de déterminer la significativité des facteurs  $T$ ,  $pH$  et  $L$ , leurs interactions et leurs effets quadratiques sur les réponses étudiées. Les valeurs des probabilités  $p \geq 0.05$  indiquent que les termes du modèle ne sont pas significatifs. Finalement, une analyse de régression permettant de calculer les coefficients des modèles décrivant chaque réponse a été effectuée.

*a- Optimisation de la production de biomasse :*

Les résultats de l'ANOVA réalisée sur les résultats obtenus après l'exécution du PCC sont résumés dans le Tableau 8. La valeur du coefficient  $F$  calculée pour la production de biomasse est de 7.09 et correspond à une probabilité  $p < 0.01$  indiquant que le modèle quadratique généré est hautement significatif. Le coefficient de détermination du modèle ( $R^2$ ) ainsi que le coefficient de détermination ajusté au degré de liberté sont de 0.69 et 0.59, respectivement, et sont considérés satisfaisants.

**Tableau 7- Conditions expérimentales et résultats du Plan Central Composite**

#	bloc	T (°C)	pH*	L (g/L)	Biomasse (g/L)	Rendement épuratoire (%)
1	1	34.0	4.0	25.0	2.28	23.82
2	1	34.0	4.0	25.0	2.33	24.57
3	1	34.0	4.0	25.0	2.39	23.76
4	1	34.0	4.0	25.0	2.45	22.2
5	1	34.0	4.0	25.0	2.36	20.88
6	1	34.0	4.0	25.0	2.31	23.19
7	1	38.0	3.5	20.0	0.66	33.45
8	1	30.0	3.5	20.0	0.34	35
9	1	40.7	4.0	25.0	2.15	27.88
10	1	38.0	3.5	30.0	1.52	36.16
11	1	34.0	4.8	25.0	1.13	24.52
12	1	30.0	4.5	30.0	2.16	32.72
13	1	30.0	3.5	30.0	1.57	37.49
14	1	34.0	3.15	25.0	2.45	33.99
15	1	34.0	4.0	33.41	2.33	30.62
16	1	38.0	4.5	20.0	0.6	32.59
17	1	38.0	4.5	30.0	2.43	30.92
18	1	30.0	4.5	20.0	1.09	28.84
19	1	27.27	4.0	25.0	2.52	28.23
20	1	34.0	4.0	16.6	0.85	34.29
21	2	34.0	4.0	25.0	1.96	27.62
22	2	34.0	4.0	25.0	2.24	26.05
23	2	34.0	4.0	25.0	2.12	23.41
24	2	34.0	4.0	25.0	2.12	24.73
25	2	34.0	4.0	25.0	2.24	23.92
26	2	34.0	4.0	25.0	2.31	27.46
27	2	38.0	3.5	20.0	0.78	33.73
28	2	30.0	3.5	20.0	0.3	36.32
29	2	40.72	4.0	25.0	2.24	29.6
30	2	38.0	3.5	30.0	1.09	39.73
31	2	34.0	4.84	25.0	0.91	24
32	2	30.0	4.5	30.0	2.04	31.19
33	2	30.0	3.5	30.0	1.09	32.18
34	2	34.0	3.16	25.0	2.24	37.48
35	2	34.0	4.0	33.41	2.38	33.98
36	2	38.0	4.5	20.0	0.49	32.8
37	2	38.0	4.5	30.0	1.75	33.4
38	2	30.0	4.5	20.0	1.15	32.68
39	2	27.27	4.0	25.0	2.48	29.06
40	2	34.0	4.0	16.6	0.73	37.88

\* Les valeurs désignent le pH initial de la culture. Il n'y a pas de contrôle de pH au cours de la fermentation.

**Tableau 8- ANOVA sur la production de biomasse**

<i>Source</i>	<i>Sommes des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carrés moyens</i>	<i>Ratio-F</i>	<i>Probabilité P</i>
<b>ANOVA avec tous les facteurs (Biomasse)</b>					
Modèle	14.11	9	1.57	7.09	<0.01*
<i>T</i>	0.08	1	0.08	0.35	0.56
<i>pH</i>	0.0003	1	0.0003	0.00	0.97
<i>L</i>	6.68	1	6.68	30.20	<0.01*
<i>T</i> <sup>2</sup>	0.33	1	0.33	1.48	0.23
<i>T</i> × <i>pH</i>	0.23	1	0.23	1.04	0.32
<i>T</i> × <i>L</i>	0.005	1	0.005	0.02	0.89
<i>pH</i> <sup>2</sup>	3.36	1	3.36	15.21	0.005*
<i>pH</i> × <i>L</i>	0.22	1	0.22	0.98	0.33
<i>L</i> <sup>2</sup>	4.17	1	4.17	18.87	0.02*
blocs	0.27	1	0.27	1.20	0.28
Total erreur	6.41	29	0.22		
Total (corr.)	20.79	39			

$$R^2 = 0.69 ; R^2_{\text{ajust}} = 0.59$$

\* Facteur hautement significatif au seuil de probabilité  $p=0.05$

**ANOVA avec les facteurs significatifs (Biomasse)**

Modèle	13.26	4	3.31	15.51	<0.01
<i>pH</i>	0.003	1	0.003	0.00	0.97
<i>L</i>	6.68	1	6.68	31.24	<0.01
<i>pH</i> <sup>2</sup>	3.19	1	3.19	14.92	0.005
<i>L</i> <sup>2</sup>	3.98	1	3.98	18.64	0.001
blocs	0.27	1	0.27	1.24	0.27
Total erreur	7.26	34	0.21		
Total (corr.)	20.79	39			

$$R^2 = 0.65 ; R^2_{\text{ajust}} = 0.61$$

L'ANOVA a permis d'identifier les termes du modèle statistiquement significatifs dont les effets ont été estimés par une analyse de régression (Tableau 9). Le modèle polynomial de la production de biomasse est décrit par les Équations (12) et (13) avec les valeurs codées et non codées, respectivement. Après avoir retenu les termes ayant un effet significatif à l'exception du *pH*, maintenu pour supporter la hiérarchie du modèle (Box & Hunter, 1978), une seconde analyse de la variance (Tableau 8) montre un coefficient *F* de 15.51, supérieur à celui calculé avec tous les facteurs, indiquant un modèle plus significatif.

$$\text{Prod Biomasse} = 2.19 - 3.54 \times 10^{-3}pH + 0.49L - 0.33pH^2 - 0.37L^2 \quad (12)$$

$$\text{Prod Biomasse} = -30.68 + 10.58pH + 0.84L - 1.32pH^2 - 0.015L^2 \quad (13)$$

**Tableau 9- Analyse de régression avec les valeurs codées et non codées**

Termes	Valeurs codées	Valeurs non codées
<b>Production de Biomasse</b>		
Constante	2.19	-30.68
<i>pH</i>	$-3.54 \cdot 10^{-3}$	10.58
<i>L</i>	0.49	0.84
<i>pH</i> <sup>2</sup>	-0.33	-1.32
<i>L</i> <sup>2</sup>	-0.37	-0.015
<b>Rendement épuratoire</b>		
Constante	24.23	450.69
<i>T</i>	0.24	-8.63
<i>pH</i>	-2.47	-85.16
<i>L</i>	-0.16	-8.011
<i>T</i> <sup>2</sup>	22.05	0.13
<i>pH</i> <sup>2</sup>	2.51	10.03
<i>L</i> <sup>2</sup>	3.99	0.16

Lors de l'étude des effets des facteurs sur une réponse dans un modèle, il est important de prendre en considération les valeurs standardisées ou codées des coefficients de régression dans le but de comparer leur contribution respective. En effet, les valeurs non standardisées des coefficients sont influencées par les unités de chaque variable indépendante. Ainsi, afin d'éviter la mésinterprétation des effets de termes du modèle, la comparaison des valeurs codées des coefficients de régression est fortement conseillée. Le modèle indique que la concentration de lactose (*L*) a un effet linéaire positif significatif sur la production de biomasse. En d'autres termes, l'augmentation de *L* dans le milieu engendre une augmentation de la biomasse produite. Cependant, le terme quadratique *L*<sup>2</sup>, suivi du terme *pH*<sup>2</sup>, ont montré un effet négatif sur la réponse étudiée. Afin de comprendre l'influence de ces termes sur la production de biomasse, un graphe représentant la réponse du modèle polynomial a été généré (Figure 6-A). Selon ce graphe, la production de biomasse est maximale dans les conditions de *pH* comprises entre 3.5 et 4.5. Le pH du lactosérum dépend du type de fromage produit, il peut être soit doux (pH 5.9 – 6.3) soit acide (pH 4.4 – 4.6) (Kosikowski, 1979). Cependant, ce substrat tend à s'acidifier rapidement en raison de la contamination microbienne, surtout s'il n'est pas stocké à la température appropriée (<4°C). Ainsi, l'ajustement du pH en tant qu'étape de pré-fermentation afin de contrer la contamination ne représente pas une limitation dans le procédé puisque les

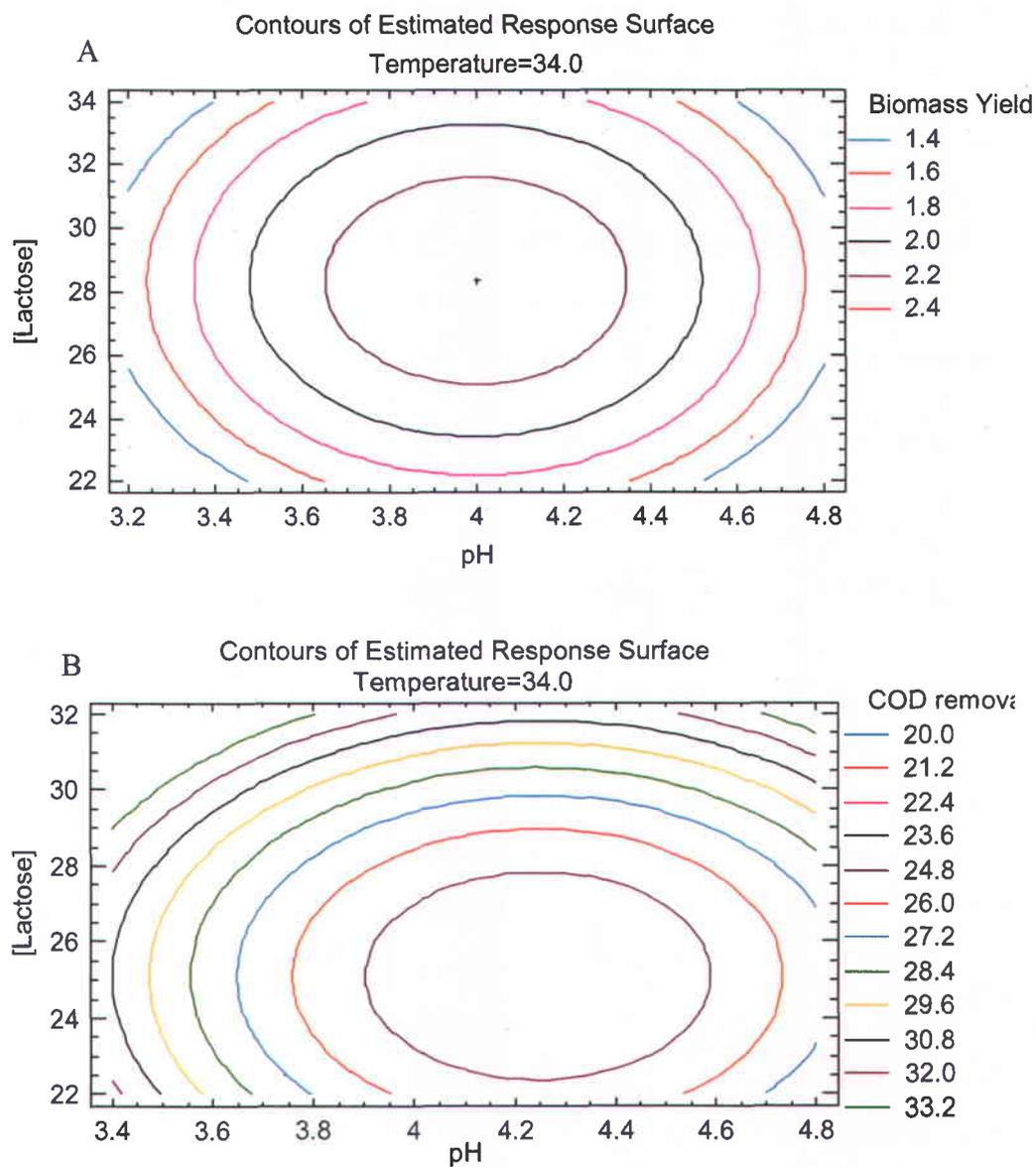
valeurs optimales de pH aboutissant à la production de la biomasse sont localisées dans la gamme acide.

Dans le cas de la concentration en lactose ( $L$ ), les valeurs optimales prédites par le modèle sont localisées dans la gamme entre 25 et 32 g/L. Au sein de cette gamme (28 g/L), KM a exhibé un taux de croissance spécifique élevé de  $0.79 \text{ h}^{-1}$  (Tableau 6). À de faibles concentrations de  $L$ , les taux de croissance spécifiques ainsi que les rendements de conversion du lactose en biomasse estimés prennent des valeurs plus élevées (Tableau 6) par rapport à celles calculées dans la plage de variation de  $L$  étudiée (Tableau 7). Cependant, fermenter à de faibles concentrations de lactose (8 – 10 g/L) par rapport à sa teneur initiale (45 – 50 g/L) n'est pas envisageable à une échelle industrielle (Mawson, 1988, Rocha *et al.*, 2011).

D'après le modèle polynomial proposé,  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) ne possède pas d'effet statistiquement significatif sur la production de biomasse. D'un point de vue physiologique, le fait que KM ne soit pas affectée par la variation de la température de fermentation confirme la capacité de cette levure à croître dans une large gamme de température (jusqu'à  $42^{\circ}\text{C}$ ) (Fonseca *et al.*, 2008). La fermentation peut donc être conduite à n'importe quelle  $T$  de la gamme étudiée.

La levure KM possède des caractéristiques physiologiques très intéressantes, promouvant sa large utilisation à l'échelle industrielle. En effet, son adaptation à une large gamme de température, couplée à sa résistance aux faibles pH, sont des propriétés très avantageuses dans les procédés industriels puisque des conditions de fermentation à température élevée et à des pH acides sont recommandées pour limiter les risques de contamination. D'autre part, la capacité de KM à exhiber un flux glycolytique important et sa résistance à la répression catabolique lui confèrent la capacité de résister à la production d'éthanol pouvant être déclenchée suite à la création de gradients de substrats et/ou d'oxygène dissout en raison d'une homogénéisation imparfaite dans les réacteurs industriels (Fonseca *et al.*, 2008, Van Dijken *et al.*, 1993). Le modèle développé a permis d'estimer les valeurs optimales de  $T$ ,  $pH$  et  $L$  à  $31.2^{\circ}\text{C}$ , 3.99 et 28.34g/L, respectivement, afin d'atteindre la production de biomasse la plus élevée. Des écarts considérables ont été enregistrés entre les valeurs optimales de la température de fermentation et du pH de la présente étude par rapport à celles rapportées par Moresi et Sebastiani (1979) ( $36.4^{\circ}\text{C}$  et pH 5.1, respectivement). En ce qui concerne la concentration initiale de lactose, la

valeur optimale rapportée par Moresi et Sebastiani (24.75 g/L) est proche de celle estimée dans la présente étude.



**Figure 6- Modèles polynomiaux de la production de (A) biomasse et (B) de la dégradation de la DCO en fonction du *pH* et de la concentration de lactose**

*b- Optimisation du rendement épuratoire :*

L'analyse de la variance des résultats du PCC résumés dans le Tableau 10 révèlent une valeur du test  $F$  de 17.36, correspondant à une probabilité  $p < 0.01$ , indiquant une significativité élevée du modèle. Le coefficient de détermination du modèle estimé à 0.84 montre que le modèle généré est capable d'expliquer 84% de la variabilité observée au sein des données expérimentales. Le coefficient de détermination ajusté au degré de liberté est de 0.79. En considérant les termes significatifs déterminés par l'analyse de la variance sur la capacité épuratoire de KM, le modèle proposé a permis de retenir les facteurs significatifs à l'exception de  $T$  et  $L$ , maintenus conformément à la méthodologie de Box et Hunter (1978). Une analyse de régression (Tableau 9) a permis de générer le modèle polynomial exprimé dans ses valeurs standardisées (Équation 14) et actuelles (Équation 15).

$$COD\ removal = 24.23 + 0.24T - 2.47pH - 0.16L + 2.05T^2 + 2.51pH^2 + 3.99L^2$$

(14)

$$COD\ removal = 450.7 - 8.63T - 85.16pH - 8.01L + 0.13T^2 + 10.03pH^2 + 0.16L^2$$

(15)

Une seconde analyse de la variance, effectuée après avoir retenu les facteurs significatifs, a montré une augmentation du coefficient  $F$  de 17.36 à 27.58, indiquant un modèle plus robuste. Le modèle indique que le facteur  $pH$  a un effet linéaire sur la capacité épuratoire de KM. En effet, le rendement épuratoire augmente lorsque le pH diminue jusqu'à la limite inférieure de la gamme investiguée (Figure 6-B).  $T$  et  $L$  ont exhibé des effets quadratiques significatifs sur la réponse étudiée. Par ailleurs, il est notable de mentionner qu'aucun effet interactif entre les paires de facteurs n'a été significatif sur la capacité de dégradation de la DCO. Selon le modèle généré, les valeurs optimales permettant d'atteindre le meilleur rendement épuratoire dans la gamme de variation étudiée sont une température de 40.7°C, un pH de 3.16 et une concentration initiale de lactose de 16.6 g/L.

Au meilleur de notre connaissance, seuls Moresi et al. (1980) ont étudié la dégradation de la DCO par la souche KM IMAT 1872, cultivée sur le lactosérum, en utilisant une approche statistique basée sur des plans d'expériences. Ils ont rapporté dans leur étude qu'une température

de 33.76°C et une concentration initiale en lactose de 21.56 g/L sont les conditions optimales pour atteindre la capacité maximale de dégradation de la DCO. Aktaş et al. (2006) ont optimisé la consommation du lactose par la souche *K. marxianus* Y-8281 en utilisant la MSR. Ils ont montré qu'une température de 31°C, un pH de 6 et une concentration en lactose de 45 g/L ont été optimaux pour consommer 95% du lactose, considéré comme le principal élément polluant autour duquel le procédé était bâti. Cependant, le métabolisme respiro-fermentaire de *K. marxianus* sp. impose la nécessité de considérer les métabolites produits par la levure lors de la fermentation du lactosérum durant l'optimisation du procédé, ce qui n'a pas été fait par Aktaş et al. (2006).

D'une manière générale, la comparaison entre les résultats de l'optimisation de la production de biomasse et de la capacité épuratoire de la levure KM de la présente étude et celles rapportées par Moresi et al. (1979) (pour KM IMAT 1872) a montré des différences notables surtout en regard des facteurs Température et pH. Ces différences proviennent principalement des variations physiologiques pouvant exister entre les souches d'une même espèce. En effet, l'espèce *K. marxianus* est caractérisée par un degré d'intraspecificité important engendrant des comportements métaboliques variables pouvant affecter les besoins et les conditions de croissance de chaque souche (Fonseca *et al.*, 2007, Rocha *et al.*, 2011). D'autre part, le fait que les deux souches aient été isolées de procédés industriels rajoute une dimension supplémentaire à la variation physiologique. En effet, dans les fermenteurs industriels, une mauvaise homogénéisation, causée par un brassage imparfait du bouillon fermenté, est à l'origine de la création de gradients de substrat (source de carbone, oxygène dissout, minéraux), de pH et de température. L'occurrence de ces gradients expose les cellules à des conditions de stress susceptibles d'induire des mutations dans le génome de la levure au fil des générations (Humphrey, 1998). Par ailleurs, l'ajout de suppléments nutritifs (extrait de levure et suppléments minéraux) aux cultures de l'étude de Moresi et al. (1980) est susceptible de solliciter des voies métaboliques différentes par rapport à des cultures non supplémentées (cas de la présente étude).

**Tableau 10- ANOVA pour le rendement épuratoire**

<i>Source</i>	<i>Sommes des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carrés moyens</i>	<i>Ratio- F</i>	<i>Probabilité P</i>
---------------	--------------------------	------------	----------------------	-----------------	----------------------

**ANOVA avec tous les facteurs (rendement épuratoire)**

Modèle	825.55	9	91.73	17.36	<0.01*
<i>T</i>	1.63	1	1.63	0.31	0.58
<i>pH</i>	166.9	1	166.9	31.58	<0.01*
<i>L</i>	0.69	1	0.69	0.13	0.72
<i>T</i> <sup>2</sup>	120.6	1	120.6	22.82	<0.01*
<i>T</i> × <i>pH</i>	0.30	1	0.30	0.06	0.81
<i>T</i> × <i>L</i>	2.98	1	2.98	0.56	0.46
<i>pH</i> <sup>2</sup>	181.1	1	181.1	34.27	<0.01*
<i>pH</i> × <i>L</i>	2.06	1	2.06	0.39	0.54
<i>L</i> <sup>2</sup>	458.9	1	458.9	86.82	<0.01*
blocs	25.8	1	25.8	4.87	0.03
Total erreur	153.3	29	5.28		
Total (corr.)	1004.6	39			

$R^2 = 0.84$  ;  $R^2_{\text{ajust}} = 0.79$

\* Facteur hautement significatif au seuil de probabilité  $p=0.05$

**ANOVA avec les facteurs significatifs (rendement épuratoire)**

Modèle	820.21	6	136.70	27.58	<0.01
<i>T</i>	1.63	1	1.63	0.33	0.5699
<i>pH</i>	166.9	1	166.9	33.67	<0.01
<i>L</i>	0.69	1	0.69	0.14	0.7109
<i>T</i> <sup>2</sup>	120.6	1	120.6	24.33	<0.01
<i>pH</i> <sup>2</sup>	181.1	1	181.1	36.54	<0.01
<i>L</i> <sup>2</sup>	458.9	1	458.9	92.58	<0.01
blocs	25.76	1	25.76	5.20	0.03
Total erreur	158.6	32	4.96		
Total (corr.)	1004.6	39			

$R^2 = 0.84$  ;  $R^2_{\text{ajust}} = 0.81$

*c- Optimisation simultanée de plusieurs réponses :*

Il a été montré que les valeurs optimales des facteurs  $T$ ,  $pH$  et  $L$  étaient localisées dans des zones différentes selon que l'objectif soit la production de biomasse ou la dégradation de la DCO. L'optimisation de réponses multiples est requise pour trouver un compromis entre les réponses optimisées individuellement dans le but de maximiser conjointement les deux réponses étudiées. Le Tableau 11 résume les conditions pour chaque réponse optimisée individuellement et pour les réponses optimisées conjointement. D'après l'analyse de la fonction de désirabilité, le meilleur compromis entre les deux variables étudiées (correspondant à une désirabilité max.  $\approx 0.79$ ) pourrait être obtenu à  $T=40.7^{\circ}\text{C}$ ,  $pH=3.70$  et  $L=33.4$  g/L. L'application de ces conditions expérimentales aboutirait à une production de biomasse et un rendement épuratoire théoriques de 1.86 g/L et 43.8 %, respectivement. Afin de valider les optimaux estimés respectifs, six fermentations indépendantes ont été effectuées en suivant un protocole identique à celui du PCC. Une production de biomasse moyenne de  $1.96$  g/L $\pm 0.52$  et un rendement épuratoire moyen de  $37\% \pm 6$  ont été obtenus. Ces valeurs sont localisées dans la même gamme que les valeurs estimées par la FD, montrant que l'approche d'optimisation de réponses multiples a bien modélisé les performances de la levure KM cultivée dans le lactosérum.

**Tableau 11- Expériences de validation de l'optimisation multi-réponses (KM cultivée pure sur le LS en fioles)**

	$T (^{\circ}\text{C})$	$pH$	$L$ (g/L)	Réponses estimées*	Validation expérimentale**
Production de biomasse	31.2	3.99	28.34	2.36 g/L	
Rendement épuratoire	40.7	3.16	16.6	53.2 %	
Optimisation multi-réponses	40.7	3.70	33.4	1.86 g/L 43.8 %	1.96 g/L $\pm 0.52$ 37% $\pm 6$

\* ces réponses sont estimées par la fonction de désirabilité en considérant les modèles multivariés de chaque réponse

\*\* les valeurs représentent les moyennes et les écart-types correspondant à 6 répétitions indépendantes

### 5.3.3. Mise à l'échelle du procédé optimisé

L'extrapolation des résultats d'optimisation multivariée effectuée en fioles Erlenmeyer à des cultures en fermenteurs représente une étape importante pour leur validation puisque les conditions de culture peuvent varier considérablement d'un type de réacteur à l'autre. Ces changements touchent principalement le pH du milieu de culture et les taux de transfert d'oxygène dissout (OD), qui sont des paramètres contrôlés en ligne dans les fermenteurs et non dans les fioles Erlenmeyer. Il a été démontré dans cette étude que le pH du milieu ne variait pas significativement durant les expériences de fermentation en fioles. Ce facteur a donc moins d'effet sur la culture comparé à l'OD dans le milieu durant la fermentation. D'une manière générale, un transfert d'OD amélioré serait susceptible de favoriser les voies oxydatives de dégradation du lactose aux dépens du métabolisme respiro-fermentaire, responsable de la production de métabolites et déclenché suite à une alimentation en OD inférieure au seuil critique du métabolisme de la levure. Les résultats des essais de validation réalisés dans des fermenteurs de laboratoire de 5L de volume (4L de volume utile) sont résumés dans le Tableau 12. Au cours de ces essais, une comparaison entre la fermentation de deux substrats; le lactosérum (LS) et le lactosérum déprotéiné (perméat de lactosérum; PLS) en termes de propriétés cinétiques et de rendement de procédé a été effectuée. Cette comparaison a été motivée par des considérations économiques dans le sens où les protéines de lactosérum possèdent des propriétés nutritives reconnues dans le domaine de l'alimentation humaine et animale et le modèle d'affaires de plusieurs usines laitières modernes est bâti autour de leur extraction du lactosérum et de leur exploitation.

Des différences notables dans les taux de consommation du lactose et dans la productivité en biomasse ont été observées entre les cultures réalisées dans le LS versus celles dans le PLS. En effet, une diminution de 26 % et de 37 % a été observée pour  $P_X$  et  $P_{\text{Lactose}}$  (g/L.h), respectivement, tandis que le rendement en biomasse a diminué de 37 % (Exp.2 et 6). Cette diminution est considérable pour un procédé dédié à être industrialisé puisque la viabilité économique, dans le cas de la production de biomasse, dépend exclusivement des rendements de conversion. Les rendements de dégradation de la DCO de KM sont comparables pour les cultures réalisées dans le LS ou le PLS (64 et 65 %, respectivement) et supérieurs à la valeur

estimée par le modèle empirique (43.8 %). Cette différence est vraisemblablement due à une amélioration du transfert de l'OD dans le fermenteur par rapport à la fiole Erlenmeyer. De même, il a été noté que le temps nécessaire pour la déplétion quasi-totale du lactose (93 %) était de 14h pour la culture dans le LS contre 22h pour celle dans le PLS (Exp. 2 et 6). De toutes les expériences réalisées, seule celle où le sulfate d'ammonium a été utilisé comme source d'azote dans le PLS (Exp. 5) a montré une consommation incomplète du lactose (85 %) après 24h de fermentation.

La présence de certains ions métalliques et éléments minéraux est essentielle pour supporter la croissance cellulaire. Ces éléments occupent un rôle majeur dans le métabolisme de la levure, entre autres, en tant que transducteurs de signal soutenant le développement du cycle cellulaire permettant d'initier le bourgeonnement et le développement nucléaire, ou en tant que cofacteurs nécessaires pour amorcer les activités enzymatiques catalysant les réactions des voies métaboliques de dégradation des substrats et de synthèse des composés cellulaires (Loukin & Kung, 1995). L'effet de la supplémentation en minéraux sur la cinétique de la culture a donc été vérifié (Tableau 12). Durant la fermentation du LS (Exp. 2 et 4), des augmentations de 63 %, 67 % et 27 % touchant la productivité en biomasse, le taux de consommation du lactose et le rendement en biomasse, respectivement, ont été observées en faveur de la culture ayant reçu la supplémentation en minéraux. Par conséquent, le temps nécessaire pour la dégradation complète du lactose a été raccourci de 4h tandis que le rendement épuratoire a été maintenu constant.

Le coefficient de maintenance (Pirt, 1975) a été estimé afin de déterminer si une corrélation existe entre l'absence de minéraux dans le milieu de culture et les exigences en terme de maintenance cellulaire. Il a été observé que le coefficient de maintenance estimé était 5 fois et 6 fois plus faible lorsque les éléments minéraux étaient ajoutés au PLS et au LS, respectivement (Exp. 2, 4 et Exp. 6, 7). D'une manière générale, quelque soit le substrat utilisé (LS ou PLS), les cultures ayant reçu une supplémentation en minéraux ont montré des coefficients de maintenance faibles et équivalents, avec une valeur moyenne  $m$  de  $0.0297 \pm 0.001$  g/g.h (Exp. 3, 4 et 7). Cette valeur de  $m$  est comparable à celles rapportées pour *S. cerevisiae* cultivée en conditions d'anaérobiose (0.036 g/g.h) (Watson, 1970) et *C. utilis* cultivées sur les polissures de riz sous des conditions préalablement optimisées (0.03 g/g.h) (Rajoka *et al.*, 2006). Étant donné que certains métaux constituent des cofacteurs d'enzymes catalysant des voies métaboliques responsables de

la dégradation des glucides (enzymes des voies de la glycolyse, des pentoses phosphate, par exemple) et de la production d'ATP (cycle de l'acide citrique), des activités enzymatiques suboptimales dues à une déplétion de métaux seraient susceptible de ralentir les flux de ces voies oxydatives et d'initier des voies alternatives moins efficaces en termes de croissance cellulaire. À titre d'exemple, la déplétion du milieu en zinc est susceptible d'affecter la structure de plusieurs protéines telles que la superoxyde dismutase, jouant un rôle dans la détoxification des cellules de levure. Le manganèse est un cofacteur important requis pour les enzymes du cycle de l'acide citrique (ou cycle de *Krebs*). Il est entre autres le cofacteur de la pyruvate carboxylase, enzyme responsable de la synthèse d'oxaloacétate, intermédiaire important dans le cycle du citrate et dans la voie de la néoglucogenèse (Jitrapakdee & Wallace, 1999). La carence du milieu en magnésium risque d'entraver l'activité d'enzymes clés telles que la pyruvate déshydrogénase, catalysant la conversion du pyruvate en acétyl-Coenzyme A, ou l'hexokinase catalysant la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate, intermédiaire essentiel dans la voie de la glycolyse. L'absence de métaux entrave aussi le développement du cycle cellulaire durant les différentes phases de la mitose tel que rapporté par Loukin et Kung (1995).

**Tableau 12- Caractérisation cinétique de KM cultivée pure durant les expériences en fermenteurs**

Conditions	Biomasse X (g/L)	$P_{\text{lactose}}$ (g/L.h)	$t_{\text{lactose}}$ (h)	$P_x$ (g/L.h)	$\mu_{\text{max}}$ (h <sup>-1</sup> )	$q_{\text{lactose}}$ (g/g.h)	Rendement épuratoire (%)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_g$ (g/g)	m (g/g.h)	$E_\mu$ (kJ/mol)
1- LS+SA	9.99	2.19	16	0.81	0.53	2.22	56	0.24	0.48	0.133	50.1
2- LS+Ur	9.75	2.65	14	0.81	0.53	2.10	64	0.25	0.48	0.189	51.2
3- LS+min.+SA	11.29	3.07	12	1.14	0.64	2.12	67	0.30	0.32	0.029	51.2
4- LS+min+Ur	11.43	4.42	10	1.32	0.57	1.78	63	0.32	0.31	0.031	50.8
5- PLS+SA	5.66	1.62	nd	0.6	0.55	3.45	57	0.16	0.42	0.175	51.0
6- PLS+Ur	6.34	1.66	22	0.58	0.49	3.08	65	0.16	0.36	0.155	51.7
7-PLS+min.+Ur	8.53	4.55	14	0.99	0.54	2.17	76	0.25	0.22	0.029	51.1

LS+SA: Lactosérum supplémenté avec le sulfate d'ammonium; LS+Ur: Lactosérum supplémenté avec l'urée; LS+min.+SA: Lactosérum supplémenté avec le sulfate d'ammonium et des éléments minéraux. Les mêmes conditions s'appliquent pour les cultures dans le PLS.

En comparant l'effet de l'ajout de minéraux à la culture, il a été noté que le rendement de conversion du lactose en biomasse ( $Y_{x/s}$ ; g/g) était plus affecté lorsque le substrat de base est le PLS par rapport au LS. En effet, une baisse de 36 % du rendement  $Y_{x/s}$  a été enregistrée pour les cultures sur PLS (Exp. 6 et 7), tandis qu'elle est de 21 % pour les cultures sur LS (Exp. 2 et 4). L'effet de la supplémentation en minéraux de ces deux substrats est encore plus significatif en termes de consommation du lactose. En effet, une augmentation de 67 % de  $P_{\text{Lactose}}$  (g/L.h) a été observée pour la fermentation du LS (Exp. 2 et 4). Ce taux a augmenté plus de 2.5 fois dans le cas de la culture sur PLS (Exp. 6 et 7). Les taux de consommation du lactose atteints après ajout de minéraux sont identiques dans le cas des deux substrats. Une diminution de 14 % du rendement épuratoire a été observée durant les cultures sur PLS tandis qu'il reste invariable pour les cultures sur LS.

Les différences observées dans les valeurs des paramètres cinétiques entre les cultures sur LS et PLS par rapport à la supplémentation en minéraux et en éléments traces s'expliqueraient en considérant la différence majeure entre ces deux substrats, qui consiste en la prépondérance de protéines sériques (lactoglobulines et lactalbumines) dans le LS. Il a été prouvé que ces métalloprotéines possèdent la propriété de complexer des minéraux tels que  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  (Baumy & Brule, 1988). Ces éléments traces, considérés comme 'contaminants' en raison de leurs très faibles concentrations dans le LS, sont capables de supporter les activités des voies métaboliques de biosynthèse et de soutenir le cycle de développement cellulaire (Loukin & Kung, 1995). La déprotéinisation du LS contribuerait très probablement à l'enlèvement de ces cations complexés aux protéines, provoquant ainsi une diminution de l'activité de plusieurs fonctions cellulaires durant la culture de KM sur le PLS.

Le lactosérum contient environ 0.15 % (p/v) d'azote réparti en azote organique (82 – 89 %) et ammoniacal (11 – 16 %) (Ghaly *et al.*, 1992). La fraction d'azote organique est constituée principalement des protéines lactoglobulines et lactalbumines qui possèdent la propriété de coaguler sous l'effet du traitement thermique acide. Une étude a montré que la supplémentation du milieu de culture en azote est primordiale pour assurer l'activité métabolique de la levure, et ce malgré le contenu du lactosérum en azote. L'étude a montré que seulement 25 % de l'azote total du lactosérum, correspondant à une fraction soluble non-précipitable, a été assimilé par la levure *Saccharomyces fragilis* (classifiée *K. marxianus*) (Wasserman, 1960). Étant donné que la levure est incapable de métaboliser les protéines précipitées sous l'effet du traitement thermique effectué à un pH proche de leur pH isoélectrique (pH=4.5), ces dernières ne peuvent être considérées comme source d'azote appropriée pour assurer le maintien de l'activité métabolique des cellules. D'une manière générale, l'ammoniac et les sels d'ammonium sont les sources d'azote les plus fréquemment utilisées vu qu'ils sont assimilables par la majorité des levures et des champignons communément cultivés (Ugalde & Castrillo, 2002). Dans le contexte de l'optimisation du procédé, il a été convenu de comparer l'utilisation d'urée (Ur), utilisée comme source de carbone dans le procédé industriel, et celle du sulfate d'ammonium (SA) sur les paramètres cinétiques de KM (Tableau 12). Les principales observations faites suite à cette comparaison sont des taux de consommation du lactose plus élevés de 21 % et de 44 % en faveur de l'urée durant les cultures sur le LS en absence ou en présence de supplémentation en

minéraux, respectivement (Exp. 1 et 2; Exp. 3 et 4). La variation de la source d'azote ne semble par avoir d'effet sur les rendements de conversion du lactose en biomasse ( $Y_{x/s}$ ; g/g) qui ont été maintenus constants tandis que les rendements épuratoires ont montré de très faibles variations. Comme mentionné plus haut, le SA est assimilé par la majorité des levures tandis que l'assimilation de l'urée requiert des activités enzymatiques spécifiques de type uréase ou urée amydolase (Ugalde & Castrillo, 2002). En général, KM a montré des constantes cinétiques améliorées en présence d'urée ce qui favorise son utilisation comme source d'azote. De plus, l'assimilation des molécules d'azote du SA entraîne la libération de protons  $H^+$ , augmentant ainsi la demande en NaOH comme base pour le maintien du pH en cours de fermentation. Par contre, l'assimilation de l'urée est neutre par rapport à la balance de protons. Il s'agit là d'un aspect important au niveau industriel puisque l'utilisation du SA contribue à augmenter la force ionique du milieu risquant ainsi d'affecter les cinétiques de croissance de la flore en plus des répercussions économiques significatives se rapportant aux volumes de neutralisants utilisés.

#### **5.3.4. Profils du taux de transfert d'oxygène (OTR) et du taux de consommation d'oxygène (OUR) lors de la culture de KM**

La mesure de la quantité d'oxygène dissout dans le milieu au cours des fermentations a permis d'estimer les taux de transfert et de consommation d'oxygène (*oxygen transfer rate* OTR et *oxygen uptake rate* OUR; mg/L.h) ainsi que le coefficient de transfert volumétrique ( $K_{La}$ ;  $h^{-1}$ ) pour les fermentations du lactosérum en absence et en présence de minéraux (Exp. 1 et 3, respectivement) (Figures 7 et 8) et du perméat de lactosérum (Exp. 5) (Figure 9) dans les conditions optimales déterminées par l'optimisation multivariée. Toutes les fermentations ont été effectuées sous un taux d'aération constant de 1 vvm. La quantité d'OD dans le milieu a été contrôlée en variant la vitesse d'agitation afin d'essayer de la garder au-dessus du seuil de 10 % de saturation. D'après la Figure 7, les 2 premières heures de fermentation sont caractérisées par des taux de transfert et de consommation d' $O_2$  constants et faibles. Cette phase correspond à une période de latence durant laquelle la souche adapte son métabolisme au milieu de culture. À partir de la 2<sup>ème</sup> heure, correspondant au début de la phase exponentielle de croissance, OTR et OUR commencent à augmenter progressivement. L'agitation est augmentée de 400 à 500 rpm puis à 550 rpm afin de fournir à la culture l'OD nécessaire à la croissance. Les deux paramètres atteignent leurs valeurs maximales à  $t = 6h$  et demeurent ensuite constants jusqu'à  $t = 8h$ . Durant

cette phase, l'agitation est à sa valeur maximale de consigne (650 rpm). Le déclin observé entre 8 – 10 h marque la fin de la phase exponentielle de croissance de la levure, durant laquelle elle a atteint son compte cellulaire le plus élevé. La phase de déclin d'OTR et OUR est ensuite suivie d'une légère augmentation des deux paramètres entre 10 – 14 h de fermentation. Cette phase survenant durant la phase stationnaire correspondrait à l'enclenchement d'une ou de plusieurs voies métaboliques, différentes de celles impliquées durant la phase exponentielle de croissance de la levure. À partir de 16h, les taux de transfert et de consommation de l'OD diminuent significativement indiquant la fin de la fermentation induite par la rupture de la source de carbone principale de la culture.

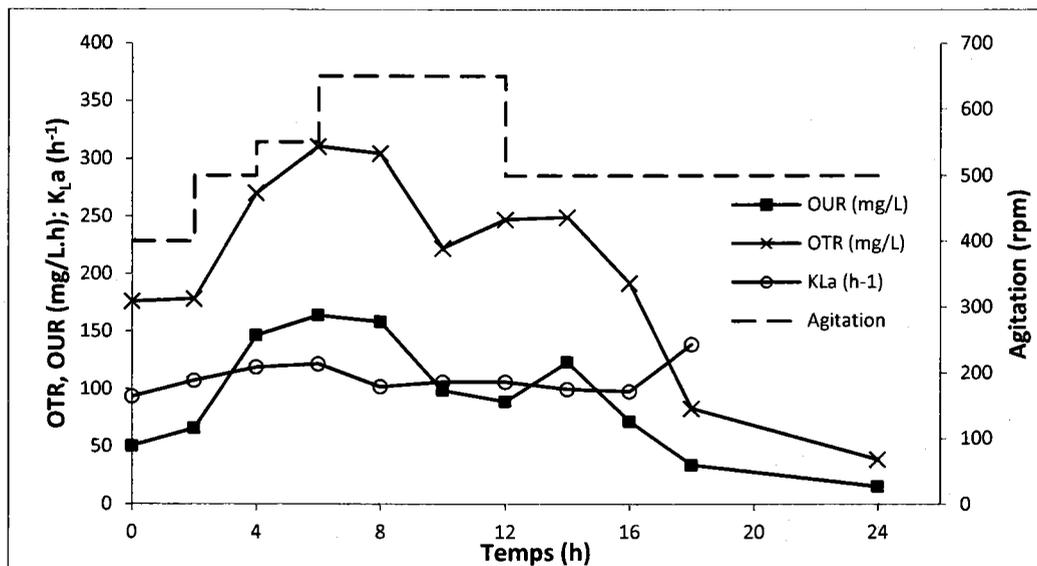


Figure 7- Profils des taux de transfert et de consommation de l'OD et du  $K_{L,a}$  au cours de la fermentation du lactosérum par KM en conditions optimales

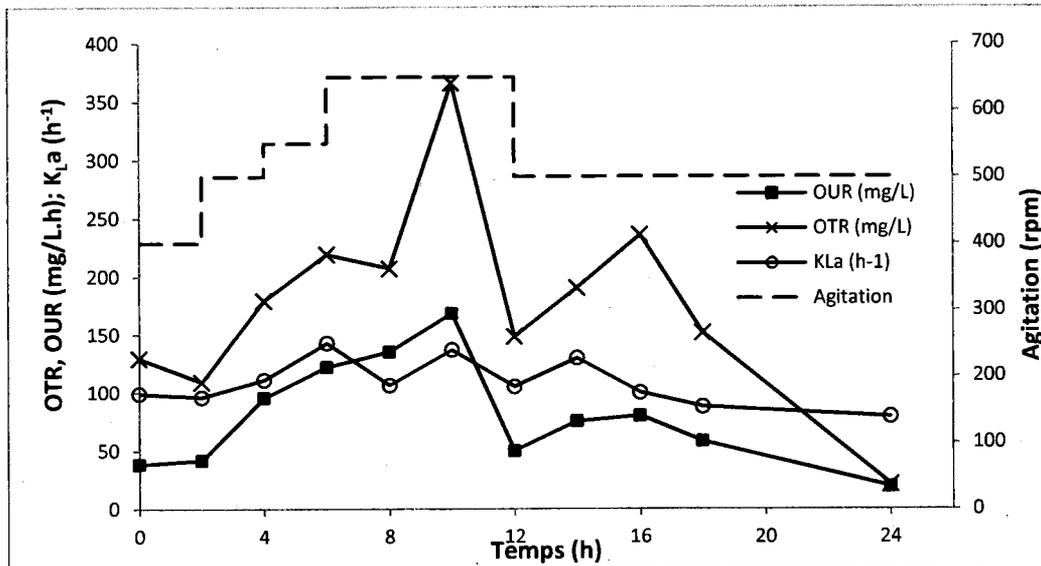


Figure 8- Profils du taux de transfert et de consommation de l'OD et du  $K_{La}$  au cours de la fermentation du lactosérum par KM en conditions optimales avec supplémentation en minéraux

La Figure 8 illustre l'évolution de l'OTR, du OUR et du  $K_{La}$  de la même culture, supplémentée d'éléments minéraux. D'après cette figure, il est possible de retrouver un profil d'OUR sensiblement identique à celui observé lors de la culture précédente avec une latence de 2 h, une phase exponentielle située entre 2 et 10 h puis une légère augmentation de la consommation d' $O_2$  après le déclin correspondant à la fin de celle-ci. Concernant le profil du taux de transfert d' $O_2$ , la principale différence entre la culture de KM sur le LS avec et sans ajout de minéraux est localisée au niveau de la durée des phases maximales des profils d'OTR. En effet, dans la culture sans minéraux, le profil d'OTR atteint son maximum sous forme de deux plateaux d'une durée moyenne de 2 h chacun tandis que dans la culture en présence de minéraux, les maxima d'OTR sont atteints sous forme de pic. Les deux cultures ont montré des profils de coefficient de transfert volumétrique de l' $O_2$  ( $K_{La}$ ) identiques et stables dans le temps avec une valeur moyenne d'environ  $100h^{-1}$ .

Les profils des taux de transfert et de consommation de l'O<sub>2</sub> ainsi que celui du K<sub>La</sub> pour la culture de KM sur le PLS sont représentés dans la Figure 9. Au cours de cette culture, OTR et OUR montrent des profils très différents de ceux observés durant les cultures sur LS. En effet, la demande en oxygène a atteint son maximum à la 4<sup>ème</sup> heure de culture correspondant à la phase exponentielle de croissance de la levure. Ensuite, malgré le contenu encore important en lactose dans le milieu, le taux de consommation d'O<sub>2</sub> a chuté abruptement. L'hypothèse expliquant un tel comportement serait qu'un substrat limitant (autre que la source de carbone) essentiel à l'activité métabolique d'oxydation du lactose manque dans le milieu. Ce composé, disponible dans le LS mais pas dans le PLS, serait lié à la présence des protéines sériques directement (complexé aux protéines tels que les minéraux) ou indirectement (éliminé avec les protéines lors du procédé d'ultrafiltration). Par ailleurs, les conditions opératoires développées spécifiquement pour une culture sur le LS seraient défavorables à une fermentation dans le PLS. En effet, la présence des protéines sériques, même sous leur forme coagulée, jouerait un rôle de protecteur contre la température de fermentation relativement élevée (40°C). Le pouvoir tampon des protéines sériques peut aussi contribuer à réduire l'amplitude de variation du pH consécutive à la dégradation du sulfate d'ammonium, fournissant ainsi à la levure des conditions de croissance plus propices. Le profil de K<sub>La</sub> dans cette culture est identique à ceux des cultures dans le LS.

La détermination des profils des taux de transfert et de consommation de l'O<sub>2</sub> constitue un outil additionnel de contrôle du procédé de fermentation, surtout dans les cultures limitées en oxygène où les rendements de production sont directement liés à la disponibilité et aux taux de transfert de l'O<sub>2</sub> vers les cellules. En effet, l'examen des profils d'OTR et d'OUR au cours de la fermentation fournit des informations en ligne sur l'évolution de la cinétique de croissance permettant de déceler d'éventuelles perturbations pouvant affecter le métabolisme de la levure.

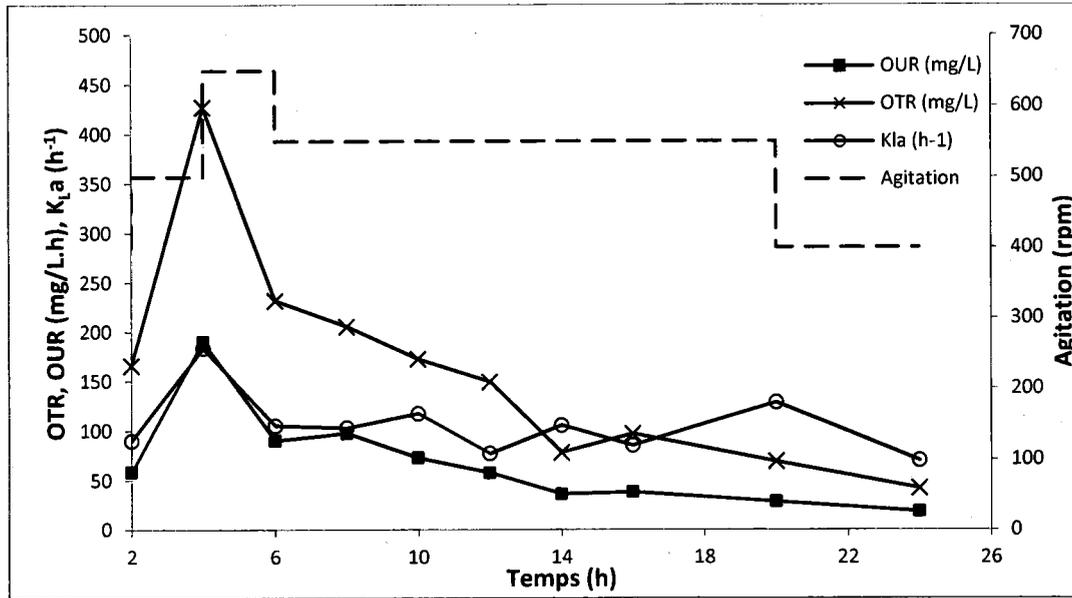


Figure 9- Profils des taux de transfert (OTR) et de consommation (OUR) de l'OD et de  $K_L a$  au cours de la fermentation du perméat de LS dans les conditions optimales (les valeurs de 3 paramètres suivis correspondent à une moyenne de deux fermentations indépendantes)

## 5.4. Conclusion

Le présent chapitre a permis de caractériser les cinétiques de production de biomasse et de dégradation de la DCO de la souche KM impliquée dans le procédé industriel de fermentation du lactosérum. Cette levure *Crabtree* négative possède un métabolisme oxydoréducteur lui conférant la capacité d'exhiber un flux glycolytique important et de l'orienter vers la production de biomasse et la sécrétion de métabolites. Durant la fermentation du lactosérum, KM a montré d'intéressantes capacités à tolérer des conditions de température et de pH relativement extrêmes ( $T$  jusqu'à  $45^\circ\text{C}$  et  $pH$  3.5), importante considération pour établir la robustesse d'un procédé industriel. La caractéristique commune qui consiste en des valeurs optimales de  $T$ ,  $pH$  et  $L$  différentes en fonction de l'objectif ciblé (production de biomasse ou dégradation de la DCO) (Moresi *et al.*, 1980, Moresi & Sebastiani, 1979) a été confirmée pour la souche KM étudiée.

En raison de l'occurrence du métabolisme respiro-fermentaire et du manque d'information concernant les cinétiques de production des métabolites associés, la modélisation empirique représente une alternative intéressante à la modélisation microbienne classique telle que celle proposée par Castrillo et Ugalde (1992), qui ont considéré l'éthanol comme le métabolite secondaire unique produit par la voie oxydo-réductive. Il a été possible de développer un modèle

empirique de second ordre décrivant significativement l'évolution de la production de biomasse et de la dégradation de la DCO en fonction des facteurs température, pH et concentration initiale de lactose. Cependant, l'obligation de considérer le modèle empirique à l'intérieur des gammes étudiées des facteurs  $T$ ,  $pH$  et  $L$  est nécessaire à son application. Par ailleurs, il est d'une importance capitale de se localiser dans une zone d'«opérabilité» du procédé où les conditions de fermentation ainsi que les objectifs ciblés sont réalistes et atteignables au vue d'une application industrielle (Myers *et al.*, 2009). Cette recommandation est particulièrement importante dans le cas du facteur concentration en lactose puisque ce paramètre contrôle le déclenchement du métabolisme respiro-fermentaire. Aussi, en raison d'un haut degré de variabilité intraspécifique exhibé par KM (Fonseca *et al.*, 2007, Lane *et al.*, 2011), ajuster automatiquement un modèle préexistant à la cinétique d'une souche peut s'avérer risqué dans le sens où les conditions optimales de la croissance de l'une soient complètement différentes de celles de l'autre. Il est de ce fait fortement recommandé de développer un modèle spécifique à chaque souche en considérant les conditions et le substrat étudiés.

Au cours de cette étude, il a été montré que malgré la capacité de KM à consommer la quasi-totalité du lactose dans le milieu, la DCO soluble résultante était encore élevée à cause de la production de métabolites, même sous des conditions appropriées de transfert d'oxygène par rapport à des cultures en fioles. Des auteurs tels que Aktaş *et al.* (2006) ont considéré exclusivement la cinétique de consommation du lactose dans leur approche d'optimisation multivariée ce qui n'est aucunement garant d'une dégradation efficace de la DCO. Il est donc recommandé d'étudier en détail l'identification et la quantification des métabolites produits en cours de culture ainsi que la capacité des souches lactose-négatives de les dégrader en vue d'une application du procédé en utilisant une culture mixte. En effet, le design d'un procédé de fermentation avec des mélanges binaires ou ternaires de souches microbiennes permettrait d'améliorer sa capacité épuratoire à travers la dégradation simultanée des métabolites produits par la (les) souche(s) lactose-positives à métabolisme respiro-fermentaire. D'autre part, les problématiques de contamination de la flore de fermentation ou des temps de fermentations trop longs pourraient être évitées par l'application d'une culture mixte.

L'effet de la supplémentation en éléments minéraux sur la cinétique de croissance de la levure a été étudié. Il a été observé qu'une supplémentation bien définie a permis de réduire de 5 à 6 fois la quantité d'énergie dédiée à la maintenance cellulaire de la levure et d'améliorer significativement les productivités en biomasse et les taux de consommation du lactose. Ainsi, une carence en éléments minéraux biogéniques affecte les activités enzymatiques de plusieurs voies métaboliques résultant ainsi en des rendements de conversion sous-optimaux avec des répercussions économiques conséquentes.



## CHAPITRE 6 : DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION CINÉTIQUE D'UN PROCÉDÉ DE FERMENTATION DU LACTOSÉRUM UTILISANT UNE CULTURE MICROBIENNE MIXTE

La production de biomasse microbienne est une approche de valorisation du LS visant à convertir le lactose en biomasse microbienne ciblant à la fois le traitement de la charge polluante du rejet et la génération d'un produit à valeur ajoutée. Dans le chapitre précédent, le procédé de conversion du lactose du LS en biomasse par la souche KM a été optimisé et caractérisé d'un point de vue cinétique. Il a été observé que, malgré son optimisation, le procédé montrait des limitations en termes de rendements en biomasse ainsi que de dégradation de la demande chimique en oxygène (DCO), remettant en question la possibilité d'adapter le procédé à plus grande échelle. Ces rendements semblent être directement liés aux spécificités du métabolisme respiro-fermentaire de la souche KM. En effet, ce type de métabolisme est caractérisé par la conversion d'une fraction du flux de carbone en intermédiaires métaboliques, entraînant la baisse du rendement en biomasse et entravant la dégradation de la DCO. Par ailleurs, la libération de ces métabolites dans le milieu représente une source de carbone de choix pour d'éventuels microorganismes opportunistes, incapables de proliférer dans un milieu où la source principale est le lactose. La co-culture est une approche biotechnologique qui, si elle est bien maîtrisée, représente une alternative de choix à l'utilisation des cultures pures dans les procédés fermentaires, notamment en palliant au déficit de rendements et en créant une barrière naturelle contre la prolifération d'espèces invasives dans le fermenteur.

Plusieurs études scientifiques ont développé et étudié des procédés de fermentation du LS avec des cultures microbiennes pures ou mixtes (Carlotti *et al.*, 1991, Cristiani-Urbina *et al.*, 2000, Mawson, 1988, Schultz *et al.*, 2006). Au niveau industriel, au meilleur de notre connaissance, seul le groupe fromager Industries Bel a mis en place une installation industrielle pour la fermentation du LS ayant produit de la levure «lactique» pendant environ 5 décennies (entre les années 1950 et le milieu des années 2000). Le produit généré était d'abord utilisé en alimentation animale pour ensuite être adapté à l'alimentation humaine (Moulin *et al.*, 1983).

Le présent chapitre s'articule autour du développement et de la caractérisation d'un procédé de fermentation du LS en utilisant une culture mixte de deux ou trois microorganismes, incluant des levures et/ou une bactérie lactique. La levure KM ainsi que la bactérie lactique *L. fermentum* (LF) représentent les souches principales du procédé en raison de leur capacité à dégrader le lactose dans le consortium industriel. Grâce à son métabolisme respiro-fermentaire, la levure KM est capable de fournir des sources de carbone assimilables par les levures lactose-négatives (Cristiani-Urbina *et al.*, 2000). De même, la conversion du lactose en acide lactique par la bactérie lactique représente une source potentielle de matière organique pour la croissance des souches lactose-négatives. La composition de la culture mixte et l'équilibre entre les souches qui la constituent sont des facteurs déterminants pour le développement d'un procédé voué à l'industrialisation. Plus spécifiquement, l'opérabilité du procédé et ses performances, en termes de taux de dégradation du lactose et de production de biomasse, déterminés par la cinétique des souches du consortium, leur stabilité et leur équilibre sont les paramètres à prendre en considération lors du développement du procédé à petite échelle. Ainsi, les objectifs de la présente étude consistent, dans un premier temps, à cribler plusieurs consortiums microbiens afin de choisir le plus performant en termes de production de biomasse et de dégradation du lactose. Ensuite, une approche d'optimisation multivariée permettra de déterminer les conditions optimales de croissance du consortium sélectionné. Enfin, la caractérisation des paramètres cinétiques et des performances du procédé développé permettront de qualifier sa reproductibilité et sa robustesse pour une application à plus grande échelle.

## **6.1. Approche méthodologique**

### **6.1.1. Criblage des consortiums microbiens**

En disposant d'un certain nombre de souches microbiennes isolées durant la conduite du procédé industriel de fermentation du LS, l'objectif de cette expérience vise à constituer une combinaison microbienne efficace en considérant le rendement en biomasse, la teneur en protéines de la biomasse et la capacité de dégradation de la DCO comme critères de sélection. Le principe de la procédure consiste à utiliser la levure KM comme organisme de base dans chaque mélange à tester pour sa capacité à convertir le lactose en biomasse. En parallèle avec la biomasse, les

métabolites produits par KM servent de sources de carbone potentielles pour les souches lactose négatives. Similairement, la bactérie lactique LF convertit le lactose en biomasse et en acide lactique susceptible de soutenir la croissance des levures n'assimilant pas le lactose. Le principe consiste donc à exploiter la capacité de ces dernières à assimiler les métabolites largués suite à la dégradation du lactose par KM ou par un couple KM-LF, et cribler la meilleure combinaison de souches permettant une conversion maximale du carbone disponible en biomasse. Les mélanges binaires ou tertiaires ont été formés en combinant les souches dans les proportions 1:1 pour les mélanges KM-X et 1:1:1 pour les mélanges KM-LF-X (X étant une souche lactose-négative). Les essais se sont déroulés dans des fioles agitées. Les mélanges microbiens cultivés dans le milieu de LS, dont le pH a été ajusté à 4.5 et la concentration en lactose à 35 g/L, ont été incubés à une température de 35°C sous une agitation de 200 RPM pendant 24 – 36h. À la fin de la fermentation, les bouillons fermentés sont soumis aux analyses physicochimiques.

#### **6.1.2. Optimisation multivariée de la production de biomasse, de la teneur en protéine et de la dégradation de la DCO du mélange sélectionné et analyses statistiques**

Une fois le mélange microbien le plus performant choisi, une approche d'optimisation multivariée (méthodologie des surfaces de réponses) est appliquée afin de déterminer les conditions optimales de température ( $T$ ), de  $pH$  et de concentration de lactose ( $L$ ) permettant de maximiser les réponses : production de biomasse, teneur en protéine dans la biomasse et capacité épuratoire du système, estimée en termes de taux de dégradation du lactose. L'approche expérimentale d'optimisation est identique à celle adoptée pour l'optimisation des conditions de croissance de la souche KM (Chapitre 5), incluant la construction d'un plan d'expérience de type central composite rotatif comportant 14 expériences de fermentation avec 6 répliques au niveau du point central pour un total de 20 expériences. Les niveaux de chaque facteur ainsi que leurs valeurs codées sont rapportés dans le Tableau 13. Une fois le plan d'expériences réalisé, un modèle polynomial du second ordre est généré afin de modéliser les réponses étudiées en fonction de la variation des facteurs  $T$ ,  $pH$  et  $L$ . Une analyse de la variance est ensuite appliquée afin de déterminer la significativité des termes du modèle sur les variables dépendantes.

**Tableau 13- Niveaux des variables étudiées et leurs valeurs respectives**

<u>Plan central composite rotatif</u>					
<u>Niveaux des variables étudiées</u>					
	<b>-<math>\alpha</math></b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+<math>\alpha</math></b>
Température (°C)	27.3	30	<b>34</b>	38	40.7
pH*	3.66	4.0	<b>4.5</b>	5.0	5.3
Lactose (g/L)	26.6	30	<b>35</b>	40	43.4

\* Les valeurs désignent le pH initial de la culture. Il n'y a pas de contrôle de pH au cours de la fermentation.

Après avoir estimé les valeurs optimales permettant de maximiser chaque réponse individuellement, l'étape finale de l'optimisation multivariée implique l'optimisation simultanée des trois réponses, basée sur l'application de la fonction de désirabilité, tel que décrit dans le Chapitre 5.

## **6.2. Résultats et discussions**

### **6.2.1. Criblage des mélanges microbiens**

L'objectif de cette section est de sélectionner le consortium microbien permettant d'atteindre le taux de conversion du lactose en biomasse microbienne le plus élevé. Des mélanges tertiaires ont été conçus en combinant la levure lactose-positive KM, seule ou avec la bactérie lactique LF, à une ou deux levures lactose-négative isolées de l'environnement industriel du procédé de fermentation du LS. La capacité des mélanges à dégrader le lactose et à le transformer en biomasse a ensuite été évaluée par des fermentations effectuées en fioles agitées. La Figure 10 présente les valeurs des paramètres de production de biomasse (g/L), de teneur en protéines de la biomasse (g/L) et de taux de consommation du lactose (%) des 6 mélanges testés, après 36 h de fermentation. Pour tous les mélanges testés, une consommation quasi-totale du lactose disponible a été observée. La production de biomasse la plus élevée a été observée pour la combinaison KM-CU-SU (4.11 g/L), correspondant à un rendement de conversion du lactose en biomasse

( $Y_{x/s}$ ) de 0.18 g/g. Pour une culture destinée à produire de la biomasse, ce faible rendement s'explique par un faible transfert d'oxygène dissout de la phase gazeuse vers la phase liquide, induisant l'occurrence de conditions de pseudo-anaérobiose qui affectent considérablement le fonctionnement des voies d'oxydation de la source de carbone et sa conversion en biomasse. Conséquemment, on se trouve en présence de cultures limitées en oxygène où la sollicitation des voies fermentaires déclenche la canalisation du flux glycolytique vers la production d'éthanol et de métabolites secondaires provoquant ainsi la diminution du rendement en biomasse (Van Urk *et al.*, 1990).

Afin de différencier les mélanges testés en termes de production de biomasse, teneur en protéines et consommation de lactose, une analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée afin de vérifier la significativité statistique de la variation des mélanges sur les paramètres cités. Pour les effets statistiquement significatifs, l'ANOVA est suivie d'un test de comparaison des moyennes basé sur l'approche de la moindre différence significative de Fisher (*Fisher's Least Significant Difference, LSD*) (Tableau 14).

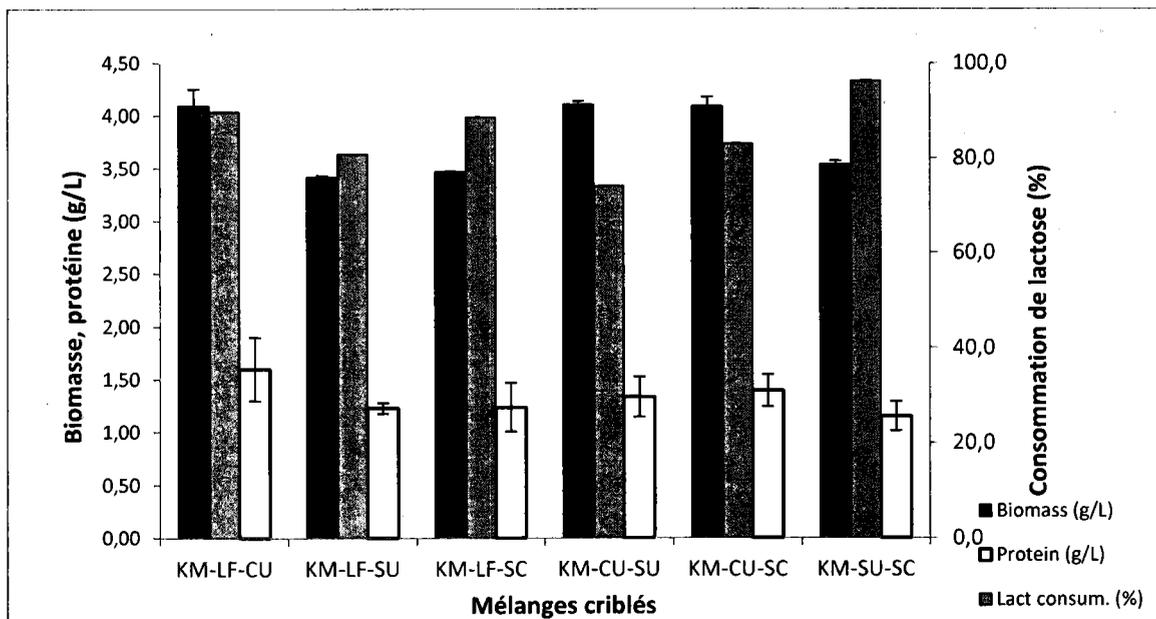


Figure 10- Criblage des mélanges microbiens après 36h de fermentation du LS en fioles agitées

**Tableau 14- ANOVA sur les résultats de criblage (Fig. 10) après 24h et 36h de fermentation\***

Mélanges microbiens	Biomasse (g/L)		Protéine (g/L)		Consom. de lactose (%)	
	24h	36h	24h	36h	24h	36h
KM-LF-CU	3.47±0.11 <sup>c</sup>	4.09±0.30 <sup>a</sup>	1.38±0.10	1.60±0.09 <sup>a</sup>	57.5±3.9 <sup>a</sup>	89.7±3.6
KM-LF-SU	2.91±0.14 <sup>a</sup>	3.42±0.05 <sup>b</sup>	1.21±0.10	1.23±0.04 <sup>c,d</sup>	85.5±4.8 <sup>c</sup>	80.9±0.5
KM-LF-SC	2.98±0.13 <sup>a</sup>	3.47±0.23 <sup>b</sup>	1.24±0.22	1.24±0.04 <sup>c</sup>	81.6±16.3 <sup>b</sup>	88.6±9.5
KM-CU-SU	3.60±0.10 <sup>d</sup>	4.11±0.19 <sup>a</sup>	1.29±0.13	1.33±0.03 <sup>b</sup>	49.1±0.1 <sup>a</sup>	74.1±3.3
KM-CU-SC	3.38±0.18 <sup>c</sup>	4.09±0.15 <sup>a</sup>	1.28±0.16	1.39±0.05 <sup>b</sup>	50.9±2.5 <sup>a</sup>	83.0±8.0
KM-SU-SC	3.14±0.07 <sup>b</sup>	3.54±0.14 <sup>b</sup>	1.19±0.14	1.15±0.04 <sup>d</sup>	75.2±3.8 <sup>b</sup>	96.2±0.5
Significativité statistique	HS	HS	NS	HS	HS	NS

\* Les valeurs représentent une moyenne de 6 mesures effectuées sur 3 fermentations indépendantes

HS: Hautement significatif ( $p \leq 0.01$ )

NS: Non significatif au seuil de confiance de 95%

Pour la production de biomasse, il a été observé qu'après 24h de fermentation, la différence entre les mélanges microbiens est hautement significative avec une production maximale de 3.60 g/L pour KM-CU-SU. Cependant, les différences entre les mélanges ne sont pas statistiquement significatives en ce qui concerne la teneur de la biomasse en protéines après 24h de fermentation. Pour la capacité de consommation du lactose, deux principaux groupes se sont démarqués. Un premier regroupe les combinaisons KM-LF-CU, KM-CU-SU et KM-CU-SC où la consommation varie entre 49.1 à 57.5 % tandis qu'un second inclut les mélanges KM-LF-SC et KM-SU-SC qui ont consommé 81.6 % et 75.3 % du lactose. Le taux de dégradation du lactose le plus élevé a été atteint par KM-LF-SU avec 85.5 %. Ce consortium se classe dans le groupe des plus faibles producteurs de biomasse avec 2.98 g/L. L'objectif de l'étude étant de choisir le mélange avec la production de biomasse et la dégradation de lactose les plus élevées, les résultats après 24h de fermentation n'ont pas permis de différencier clairement entre les mélanges dans le sens où ceux ayant montré une bonne production de biomasse avaient une faible consommation de lactose et vice versa. La teneur de la biomasse en protéines n'a pas montré de différence significative entre les consortiums. Ainsi, dans le but d'affiner la procédure

de sélection, la durée de la fermentation a été prolongée à 36h. En effet, le prolongement de la durée de la fermentation serait susceptible de compenser la condition de faible transfert d'oxygène dissout dans les cultures en fioles agitées en permettant, en principe, de maximiser le degré d'oxydation de la source de carbone et sa transformation en biomasse. Les résultats compilés dans le Tableau 14 révèlent que la production de biomasse a augmenté entre 24h et 36h d'incubation pour toutes les cultures testées. Le taux d'augmentation varie entre 12.9 % pour KM-SU-SC à 20.9 % pour KM-CU-SC. L'ANOVA a montré une différence significative entre les cultures investiguées. Le test de comparaison des moyennes entre les mélanges de souches a montré que ces derniers pourraient être différenciés en deux groupes statistiques par rapport à la production de biomasse. Le premier groupe, caractérisé par les productions de biomasse les plus élevées (moyenne de la biomasse produite =  $4.1 \pm 0.2$  g/L), rassemble les mélanges KM-LF-CU, KM-CU-SU et KM-CU-SC, tandis que le second (moyenne de la biomasse produite =  $3.48 \pm 0.14$  g/L) regroupe KM-LF-SU, KM-LF-SU et KM-SU-SC. Par ailleurs, la consommation du lactose après 36h de fermentation n'a pas montré de différences statistiquement significatives entre les cultures mixtes indiquant qu'elles ont atteint le même degré d'abattement du lactose. Concernant la teneur de la biomasse en protéines, l'ANOVA a montré une différence significative entre les groupes microbiens après 36h de fermentation. En effet, les mélanges KM-CU-SC et KM-LF-CU ont montré respectivement une augmentation de 8.9 % et 16.0 % de leur teneur en protéines. Il a été observé que les mélanges les plus performants en termes de production de biomasse sont ceux comportant dans leur composition les souches KM et CU. Ces levures résistantes à la répression catabolique (ou *Crabtree* négatives) sont connues pour orienter leur métabolisme envers la production de biomasse plutôt que vers l'excrétion d'éthanol ou de métabolites (Castrillo & Ugalde, 1993, Lane *et al.*, 2011). Le consortium KM-LF-CU a donc été choisi pour l'étude de ses capacités métaboliques intéressantes et la possibilité de l'incorporer dans le procédé industriel de fermentation du LS. Dans leur étude, Cristiani-Urbina *et al.* (2000) ont sélectionné un mélange binaire composé d'une levure lactose positive, *Torulopsis cremoris*, et de *C. utilis* (lactose-négative) pour son efficacité à convertir le lactose en biomasse parmi 5 combinaisons. Ainsi, nous avons réalisé une expérimentation afin d'évaluer la capacité de *C. utilis* à proliférer dans un système où la source de carbone principale est non assimilable. Une fermentation en batch avec la souche KM co-cultivée avec LF sur du perméat de LS à 3.5 % (p/v) de lactose, supplémenté avec du sulfate d'ammonium, a été effectuée. La fermentation a été

conduite jusqu'à dégradation complète du lactose dans le milieu, dont la teneur a été estimée par le dosage des sucres réducteurs durant la culture. Le bouillon fermenté a ensuite été centrifugé afin de récupérer le surnageant dans lequel a été inoculée la levure CU. La Figure 11 illustre la cinétique de croissance de CU (UFC/mL) sur le filtrat de la co-culture de KM-LF sur le perméat de LS. Une courbe de croissance caractéristique d'une culture en batch, sans phase de latence apparente, peut être observée. Au cours de cette culture, le compte cellulaire de CU passe de  $1.2 \times 10^7$  UFC/mL à  $2.6 \times 10^8$  UFC/mL en 12h de fermentation. Un taux de croissance spécifique ( $\mu_{\max}$ ) de  $0.47 \text{ h}^{-1}$  montre que CU a été capable d'assimiler au moins une partie des métabolites produits par KM à l'issue de la dégradation du lactose via son métabolisme respiro-fermentaire (Bellaver *et al.*, 2004, Moresi *et al.*, 1989), en plus de l'acide lactique libéré par LF. l'étude rapportée par Cristiani-Urbina *et al.* (2000) a montré que CU a été capable de dégrader les métabolites largués par *T. cremoris*, une levure *Crabtree* négative dotée d'un métabolisme respiro-fermentaire. De plus, plusieurs études ont mis en évidence la capacité de CU à assimiler l'acide lactique et l'éthanol comme sources de carbone (Christen *et al.*, 1999, Oliva & Hang, 1979, Van Dijken *et al.*, 1993). Dans le cas présent, une production d'éthanol par KM est susceptible de se déclencher en raison des conditions de culture limitée en oxygène.

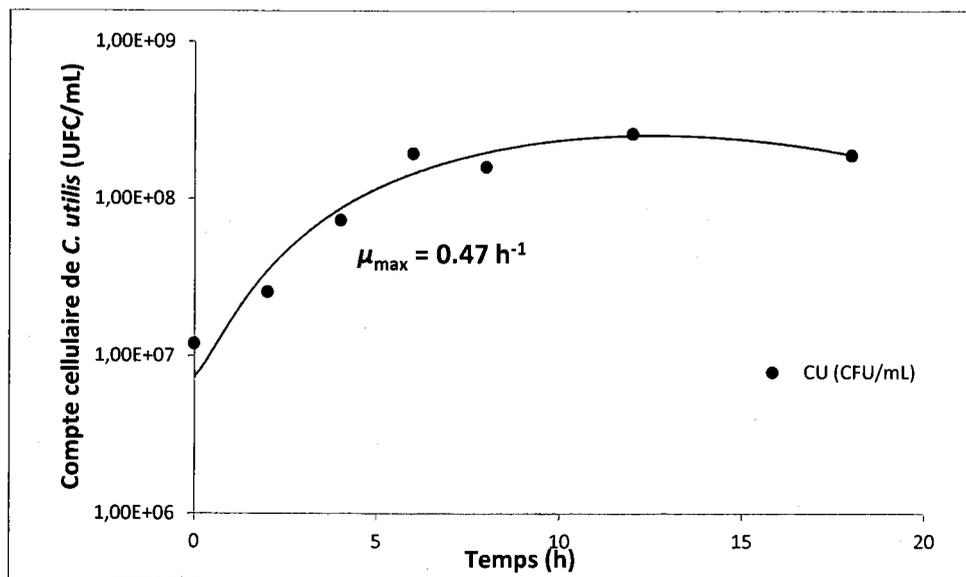


Figure 11- Fermentation de *C. utilis* sur le filtrat de centrifugation de KM-LF cultivés sur le perméat de LS  
Conditions de culture : pH=4.5; T=35°C

### **6.2.2. Comparaison des performances du consortium sélectionné par rapport au consortium industriel**

Le remodelage du procédé avec le consortium sélectionné est directement lié à sa capacité à performer par rapport au consortium que l'on retrouve dans le procédé industriel Biocompact. Une fois la combinaison de souches choisie, une expérience de fermentation a été effectuée afin de comparer les performances cinétiques de ce dernier par rapport au mélange industriel composé des souches KM et CK. Le Tableau 15 résume les estimations des paramètres cinétiques des deux fermentations réalisées dans des réacteurs de 5L. Il est à noter que le ratio du couple KM-CK a été reconstitué selon les données collectées sur la composition de la flore de fermentation dans le fermenteur industriel Biocompact. D'après les résultats, quelque soit le paramètre cinétique considéré, le mix KM-LF-CU a montré une meilleure performance par rapport au couple original KM-CK. En effet, les rendements et les productions en biomasse ont montré des différences respectives de 31 % et 45 %, tandis que la productivité en biomasse était 2 fois plus élevée pour KM-LF-CU que pour KM-CK. Le taux de dégradation du lactose de ce dernier mélange est deux fois plus faible que celui de KM-LF-CU. Conséquemment, les rendements épuratoires des deux consortiums montrent une différence de 55 % en faveur de KM-LF-CU. La comparaison des performances des deux combinaisons a montré clairement que la culture mixte sélectionnée exhibait des performances supérieures à celle de KM-CK. En effet, l'incapacité du système à consommer la totalité du lactose démontre un dysfonctionnement métabolique de KM, lorsqu'elle est co-cultivée avec CK, possiblement dû à une perturbation des voies métaboliques de transport et/ou d'oxydation du lactose. Cette affectation des voies de dégradation du lactose serait responsable de la faible productivité en biomasse. Les résultats de cette comparaison confortent donc le choix de KM-LF-CU comme consortium alternatif pour le remplacement du consortium Biocompact afin d'opérer la conversion du lactose en biomasse microbienne avec des rendements rendant le procédé industriellement viable.

**Tableau 15- Comparaison entre les performances cinétiques des mélanges KM-LF-CU et KM-CK au cours de fermentations effectuées en fermenteurs de 5L**

	Biomasse	$Y_{x/s}$	$P_x$	$P_{Lactose}$	$\mu_{max}$	$t_{Lactose}$	Rendement épuratoire
Unités	g/L	g/g	g/L.h	g/L.h	h <sup>-1</sup>	h	%
KM-LF-CU	15.85	0.41	0.73	1.85	0.31	22	70
KM-CK*	10.96	0.31	0.35	0.83	0.2	-	45

\* Le ratio du mix KM-CK a été reconstitué conformément aux données collectées à la suite du suivi de la dynamique de la flore mixte dans le réacteur industriel Biocompact (Chapitre 2). Conditions de culture : T=34°C; pH<sub>initial</sub>=4.5; [Lactose]=40 g/L.

### 6.2.3. Optimisation des conditions de croissance du mélange sélectionné

Après avoir sélectionné le mélange le plus performant parmi les consortiums criblés, une approche d'optimisation multivariée a été réalisée afin de déterminer les conditions optimales de température ( $T$ ), de  $pH$  et de concentration de lactose ( $L$ ) engendrant une réponse maximale des variables dépendantes que sont la production de biomasse, la teneur en protéine de la biomasse et la consommation du lactose. Dans ce contexte, la procédure adoptée a consisté en la construction d'un plan d'expériences central composite afin de collecter le maximum d'informations sur l'effet des variables étudiées sur les réponses, avec un minimum d'expériences. Les résultats de l'optimisation multivariée sont présentés comme suit; les conditions opératoires déterminées par le plan d'expériences ainsi que leurs résultats sont résumés dans le Tableau 16. Des analyses de la variance ont été effectuées afin de déterminer la significativité statistique des facteurs étudiés, leurs interactions et leurs effets quadratiques sur les trois réponses à travers le test de Fisher (Tableau 17). Enfin, une analyse de la régression permet l'estimation des coefficients des termes significatifs du modèle polynomial décrivant chaque réponse (Tableau 18).

**Tableau 16- Conditions expérimentales du plan central composite et ses résultats**

<i>Run</i>	<i>T</i>	<i>pH</i>	<i>L</i>	<i>Biomasse</i>	<i>Protéine</i>	<i>Lactose consom.</i>
	(°C)		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(%)
1	34.0	4.5	35.0	3.94	1.55	32.3
2	34.0	4.5	35.0	4.09	1.52	28.18
3	34.0	4.5	35.0	4.51	1.43	28.99
4	34.0	4.5	35.0	4.35	1.53	28.77
5	34.0	4.5	35.0	4.27	1.43	30.65
6	34.0	4.5	35.0	4.02	1.39	28.18
7	38.0	4.0	30.0	2.35	0.98	83.43
8	30.0	4.0	30.0	4.31	1.28	31.72
9	40.7	4.5	35.0	2.53	0.89	78.11
10	38.0	4.0	40.0	2.8	1.06	86.69
11	34.0	5.3	35.0	4.29	1.31	29.58
12	30.0	5.0	40.0	3.99	1.36	32.99
13	30.0	4.0	40.0	4.14	1.37	31.54
14	34.0	3.66	35.0	3.84	1.52	35.41
15	34.0	4.5	43.4	3.70	1.50	33.83
16	38.0	5.0	30.0	2.65	1.07	80.57
17	38.0	5.0	40.0	2.8	0.99	74.7
18	30.0	5.0	30.0	4.05	1.42	36.16
19	27.3	4.5	35.0	4.78	1.42	25.64
20	34.0	4.5	26.6	4.16	1.39	31.28

Les fermentations de KM-LF-CU ont été effectuées en fioles sur une durée de 24h.

Le Tableau 17 résume les résultats de l'ANOVA effectuée sur les résultats obtenus pour la variable dépendante de la production de biomasse. Les valeurs du coefficient de détermination du modèle ( $R^2$ ) et le coefficient de détermination ajusté au degré de liberté ( $R^2$  ajusté) sont de 78.86 % et 73.22 %, respectivement. En d'autres termes, 73.22 % de la variabilité observée au sein des valeurs expérimentales peut être expliquée par le modèle. Le coefficient  $R^2$  est donc considéré satisfaisant pour identifier les facteurs significatifs et pour modéliser le comportement de la variable dépendante en fonction de leurs variations. Les résultats de l'ANOVA indiquent que la température  $T$  exerce des effets linéaire et quadratique significatifs sur la production de biomasse du mélange étudié. Les coefficients de détermination  $R^2$  et  $R^2$  ajusté pour la variable de

la teneur en protéine sont de 78.18 % et 72.36 %, respectivement. Similairement à la production de biomasse, le contenu en protéine est significativement influencé par les effets linéaire et quadratique de  $T$ . La même observation a été faite dans le cas de la consommation du lactose où  $T$  et  $T^2$  exerçaient un effet statistiquement significatif sur la variable dépendante.

**Tableau 17- Résultats des ANOVA effectuées sur les facteurs significatifs**

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>Ratio F</i>	<i>Valeur de P</i>
<b>Production biomasse</b>					
$T$	6.824	1	6.824	48.52	<0.01*
$pH$	0.032	1	0.032	0.23	0.6374
$L$	0.013	1	0.013	0.09	0.7641
$T^2$	0.999	1	0.999	7.11	0.018*
Total erreur	2.109	10	0.141		
Total (corr.)	9.979	19			
$R^2 = 78.86\%$ ; $R^2_{adj} = 73.22\%$					
<b>Teneur en protéine</b>					
$T$	0.361	1	0.361	30.71	<0.01*
$pH$	0.003	1	0.003	0.26	0.6196
$L$	0.003	1	0.003	0.29	0.5995
$T^2$	0.264	1	0.264	22.49	<0.01*
Total erreur	0.176	10	0.0112		
Total (corr.)	0.809	19			
$R^2 = 78.18\%$ ; $R^2_{adj} = 72.36\%$					
<b>Consommation lactose</b>					
$T$	5790.99	1	5790.99	44.76	<0.01*
$pH$	25.783	1	25.783	0.20	0.6613
$L$	0.204	1	0.204	0.00	0.9687
$T^2$	1702.25	1	1702.25	13.16	0.0025*
Total erreur	1940.61	10	129.37		
Total (corr.)	9459.83	19			
$R^2 = 79.48\%$ ; $R^2_{adj} = 74.01\%$					

\* Facteur hautement significatif au seuil de probabilité  $p=0.05$

Une fois les variables significatives identifiées pour les trois réponses, une analyse de la régression a permis l'estimation des coefficients de régression de chaque terme du modèle, tel que rapporté dans le Tableau 18. Les modèles polynomiaux correspondant à la production de biomasse, la concentration en protéines et la consommation du lactose sont exprimés par les Équations 16, 17 et 18, respectivement.

**Tableau 18- Coefficients de régression des termes de chaque modèle**

Termes	Valeurs des coefficients
<b>Production biomasse</b>	
Constant	-9.11
<i>T</i>	0.93
<i>pH</i>	0.098
<i>L</i>	-0.006
<i>T</i> <sup>2</sup>	-0.016
<b>Teneur en protéine</b>	
Constant	-6.88
<i>T</i>	0.53
<i>pH</i>	-0.03
<i>L</i>	0.003
<i>T</i> <sup>2</sup>	-0.008
<b>Consommation lactose</b>	
Constant	652.4
<i>T</i>	-40.62
<i>pH</i>	-2.75
<i>L</i>	-0.02
<i>T</i> <sup>2</sup>	0.67

$$\text{prod. biomasse} = -9.11 + 0.93 T - 0.098 pH + 0.006 L - 0.016 T^2 \quad (16)$$

$$\text{Teneur protéines} = -6.88 + 0.53 T - 0.03 pH + 0.003 L - 0.008 T^2 \quad (17)$$

$$\text{consom. lactose} = 652.4 - 40.62 T - 2.75 pH - 0.02 L + 0.67 T^2 \quad (18)$$

Afin d'avoir une meilleure visibilité sur l'influence des termes du modèle sur les variables dépendantes, des graphes représentant les réponses du modèle polynomial ont été générés (Figure 12). L'analyse des Figures 12-A et 12-B permet de déduire que plus la température de fermentation diminue au sein du spectre étudié, plus la production de biomasse et sa teneur en protéines augmentent. D'après la Figure 12-A, la température optimale permettant d'obtenir une biomasse maximale est localisée entre 28°C et 32°C. En même temps, la zone de température optimale pour l'atteinte d'un contenu protéique le plus élevé chevauche celle de la zone optimale en faveur de la production de biomasse avec une légère tendance vers l'augmentation (30 – 34°C) (Figure 12-B). Toutefois, la consommation de lactose augmente avec une augmentation de la température vers les limites supérieures de la zone investiguée, avec un optimum localisé entre 38 – 42°C (Figure 12-C).

Si les facteurs  $pH$  et  $L$  ne semblent pas avoir d'effets significatifs sur les trois réponses étudiées, la différence observée dans les zones d'optimalité de la température, dépendant de l'objectif à atteindre, nécessite toutefois de trouver un compromis afin de maximiser conjointement les trois réponses étudiées. Pour cela, la fonction de désirabilité a été appliquée afin d'estimer les optimaux de chaque facteur en considérant conjointement la production et la teneur en protéines de la biomasse du mélange KM-LF-CU ainsi que sa consommation du lactose. Le Tableau 19 résume les valeurs optimales estimées pour chaque réponse individuellement ainsi que celles optimisées simultanément grâce à la fonction de désirabilité. Selon le modèle de désirabilité, pour une valeur de désirabilité maximale  $D = 0.53$ , les valeurs optimales de  $T$ ,  $pH$  et  $L$  sont estimées à  $34.8^{\circ}\text{C}$ ,  $4.43$  et  $35\text{g/L}$ , respectivement.

**Tableau 19- Valeurs optimales de chaque facteur et estimation des réponses correspondantes pour le mélange KM-LF-CU**

	Réponses optimisées			
	Prod. Biomasse	Teneur Protéines	Conso. lactose	Optimisation conjointe (FD)
$T (^{\circ}\text{C})$	28.6	31.6	40.7	34.8
$pH$	5.34	3.66	3.67	4.43
$L (\text{g/L})$	26.6	43.4	43.4	35
Estimations des réponses prédites				
Prod. Biomasse (g/L)	4.57	4.53	2.46	3.82
Teneur Prot. (g/L)	1.65	1.90	1.46	1.38
Conso. Lactose (%)	23.24	26.91	98.05	40.55

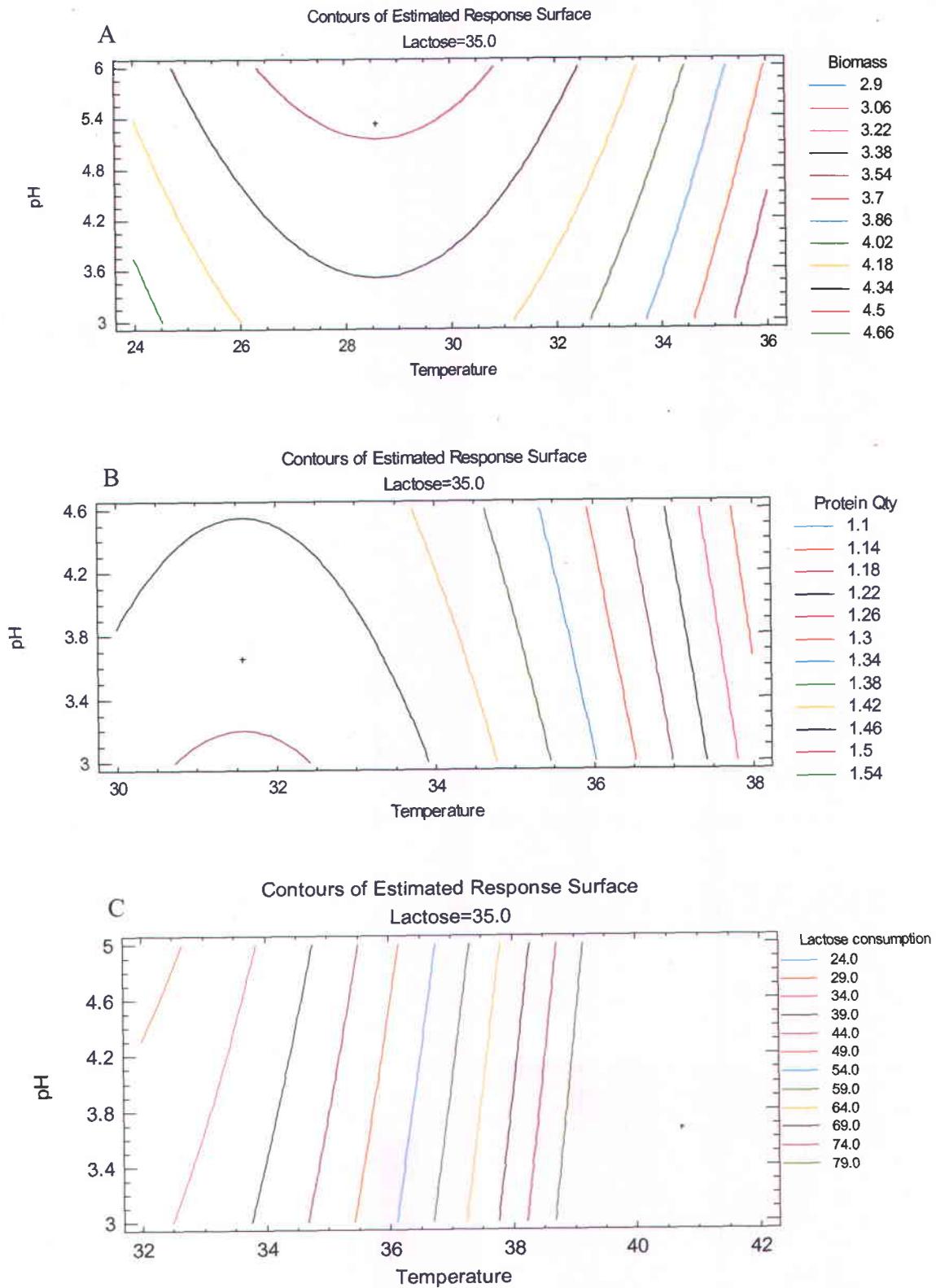


Figure 12- Courbes des modèles polynomiaux de (A) Production de biomasse, (B) Teneur en protéines et (C) consommation du lactose en fonction du  $pH$  et la température ( $T$ )

Le principal avantage de l'utilisation de la méthodologie des surfaces de réponses en optimisation des procédés biologiques est qu'elle permette de cribler, simultanément, les effets de plusieurs facteurs sur la réponse étudiée et de converger rapidement vers leurs valeurs optimales, avec un minimum d'expériences mises en œuvre. La présente étude traite une problématique d'optimisation d'un procédé aérobic, pour lequel l'alimentation en oxygène est un élément critique pour aboutir à des performances industriellement satisfaisantes. L'exécution du plan d'expériences à travers des fermentations en fioles agitées se confronte inévitablement à une limitation du transfert de l'oxygène dissout vers les cellules. De ce fait, il est primordial de considérer que les voies métaboliques sollicitées au cours d'une culture en fioles agitées pourraient différer de celles sollicitées lors d'une culture en fermenteur, où les conditions de transfert de l'oxygène sont nettement meilleures (métabolisme oxydatif vs fermentaire, effet de l'accumulation de CO<sub>2</sub> dans l'espace de tête des cultures en fioles, par exemple). Ainsi, lorsqu'il est question d'un procédé aérobic, de surcroît, visant à produire de la biomasse, la pertinence de l'information livrée par l'optimisation multivariée doit obligatoirement être validée et perfectionnée à plus grande échelle, dans des fermenteurs de laboratoire. Cependant, l'utilisation de cette procédure d'optimisation représente un outil très efficace pour balayer simultanément de larges gammes de facteurs, dans le but d'identifier le comportement de la culture en fonction des variables et de leurs interactions possibles (détection d'une inhibition, délimitation de la zone d'opérabilité du procédé, par exemple).

#### **6.2.4. Fermentation en batch du mélange KM-LF-CU en fermenteur de laboratoire**

##### *a- Optimisation de la taille de l'inoculum :*

En génie biochimique, la taille de l'inoculum est un paramètre important dont l'optimisation est primordiale pour les procédés destinés à être mis à une échelle industrielle. En effet, la taille et l'âge de l'inoculum déterminent la durée de la phase de latence et conditionnent le démarrage de la phase exponentielle de croissance, durant laquelle s'opère la conversion du lactose en biomasse. Dans cette section, trois différentes tailles d'inoculum du mélange KM-LF-CU, exprimées en termes de compte cellulaire (UFC/mL), ont été testées afin de choisir celle qui permet d'atteindre le taux de consommation de lactose et la productivité en biomasse les plus élevés. En parallèle, une caractérisation cinétique du mélange choisi a été effectuée afin de

définir le comportement de la culture mixte dans les conditions optimales, déterminées dans les fioles agitées. Les fermentations sont effectuées sur le perméat de LS (PLS), dans un fermenteur de 5L (4L de volume utile). Étant donné que les taux d'ensemencement testés représentent des volumes importants (10 – 40% v/v), risquant de modifier la composition du milieu, les cultures servant d'inoculum ont été préalablement centrifugées puis suspendues dans 0.5 L de milieu PLS avant d'être ensemencées dans le fermenteur. D'après le Tableau 20, la variation de la taille de l'inoculum ne semble pas affecter le rendement en biomasse dont la valeur reste invariable ( $Y_{x/s}=0.41\text{g/g}$ ). Cependant, la productivité en biomasse ( $P_x$ ; g/L.h) a montré une augmentation corrélée à celle de la taille d'inoculum. Cette augmentation est considérable en passant d'un inoculum de  $6.90 \times 10^7$  UFC/mL (Inoc. A) à un inoculum de  $1.14 \times 10^8$  UFC/mL (Inoc. B), où la productivité a augmenté 1.5 fois. Entre un inoculum à  $1.14 \times 10^8$  UFC/mL (Inoc. B) et à  $2.06 \times 10^8$  UFC/mL (Inoc. C), l'augmentation de la productivité est très faible (1.20 g/L.h et 1.24 g/L.h, respectivement) et semble avoir atteint un plateau. Similairement, le taux de dégradation du lactose montre le même comportement vis-à-vis de la taille d'inoculum (Tableau 20). En termes de croissance cellulaire, l'augmentation de la taille de l'inoculum est accompagnée d'une baisse du taux de croissance spécifique du consortium ( $\mu_{max}$ ; h<sup>-1</sup>). D'une manière générale, il a été possible d'atteindre la productivité en biomasse la plus élevée et le taux de consommation de lactose le plus performant, puisque le temps requis pour la déplétion du lactose dans le milieu a baissé de 22h à 12h. De même, le rendement épuratoire du système est le plus élevé avec la taille de l'inoculum C. Ainsi, la taille de ce dernier a été choisie comme étant la taille d'inoculum optimale pour la culture mixte puisqu'elle permet d'atteindre la productivité en biomasse la plus élevée en un minimum de temps de consommation du lactose, étant donné que ces deux paramètres représentent l'objectif principal du procédé.

**Tableau 20- Caractérisation cinétique de la culture mixte cultivée sur le milieu PLS avec différentes tailles d'inoculum**

	Compte cell. initial	$Y_{x/s}$	$P_x$	$P_{Lactose}$	$\mu_{max}$	$q_{Lactose}$	$t_{Lactose}$	Rendement épuratoire
Unités	(UFC/mL)	g/g	g/L.h	g/L.h	$h^{-1}$	g/g.h	h	%
Inoc. A	$6.90 \times 10^7$	0.41	0.73	1.85	0.31	0.76	22	63
Inoc. B	$1.14 \times 10^8$	0.41	1.20	2.77	0.29	0.69	15	74
Inoc. C	$2.06 \times 10^8$	0.40	1.24	2.99	0.25	0.63	12	86

Compte cellulaire initial : somme des comptes cellulaires de KM+CU+LF utilisés pour l'inoculation

$Y_{x/s}$ : Rendement en biomasse

$P_x$  and  $P_{Lactose}$  : Productivités en biomasse et consommation du lactose

$\mu_{max}$ : Taux de croissance spécifique global calculé sur la base du compte cellulaire total (UFC/mL levures + UFC/mL LF)

$q_{Lactose}$  : quotient métabolique du mélange (g lactose/g biomasse/h)

$t_{Lactose}$  : Temps de fermentation nécessaire pour la consommation totale du lactose

Rendement épuratoire : taux de dégradation de la DCO calculé en fin de fermentation

*b- Fermentation de la culture mixte dans les conditions optimales :*

Afin de valider les résultats de l'optimisation multivariée effectuée en fioles agitées, une caractérisation de la cinétique de croissance de la culture mixte KM-LF-CU en termes de rendements et productivités en biomasse et en protéines ainsi qu'en termes de dégradation du lactose et de la DCO a été réalisée.

➤ Performance du procédé en termes de production de biomasse

La Figure 13 illustre l'évolution des paramètres étudiés (biomasse, protéines, lactose et compte cellulaire) en fonction du temps pour 3 fermentations indépendantes, réalisées afin de vérifier la répétabilité du procédé et la stabilité de la culture mixte. Comme le montre la figure, les tendances des différents paramètres cinétiques ainsi que les écart-types révèlent un degré très satisfaisant de répétabilité, indicateur de la robustesse du procédé dans les conditions étudiées. L'estimation des paramètres cinétiques caractérisant ces fermentations est résumée dans le

Tableau 21. Les rendements en biomasse, obtenus avec la culture mixte, sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec une culture pure de KM sur le LS, tel que rapporté dans la présente étude ( $Y_{x/s(KM)} = 0.16 \text{ g/g}$ ) (Tableau 12; Chapitre 5), ainsi que par Beauséjour (1981) (0.15 g/g) et Mawson (1988) (0.21 g/g). Les levures du groupe des *Crabtree* négatives, auquel appartient KM, sont caractérisées par un métabolisme respiro-fermentaire responsable de la sécrétion de métabolites secondaires lorsqu'elles sont exposées à une concentration seuil de la source de carbone (Fonseca *et al.*, 2007, Van Dijken *et al.*, 1993). Le partage du flux de carbone entrant dans la cellule entre les voies de biosynthèse, supportant la production de biomasse, et celles de la production d'intermédiaires métaboliques induit automatiquement une baisse du rendement en biomasse. Ce phénomène de baisse du taux de conversion du carbone en biomasse tend à s'amplifier lorsque les métabolites les plus volatils produits par la culture sont entraînés vers les gaz de sortie (phénomène de *stripping*). Cette perte de matière carbonée est favorisée par des conditions d'aération intenses et à des températures de fermentation élevées (37 – 40°C). L'avantage d'utiliser une culture mixte, comprenant des souches lactose négatives, permet l'assimilation rapide de ces composés en tant que source de carbone, limitant significativement les pertes de cette fraction du flux organique.

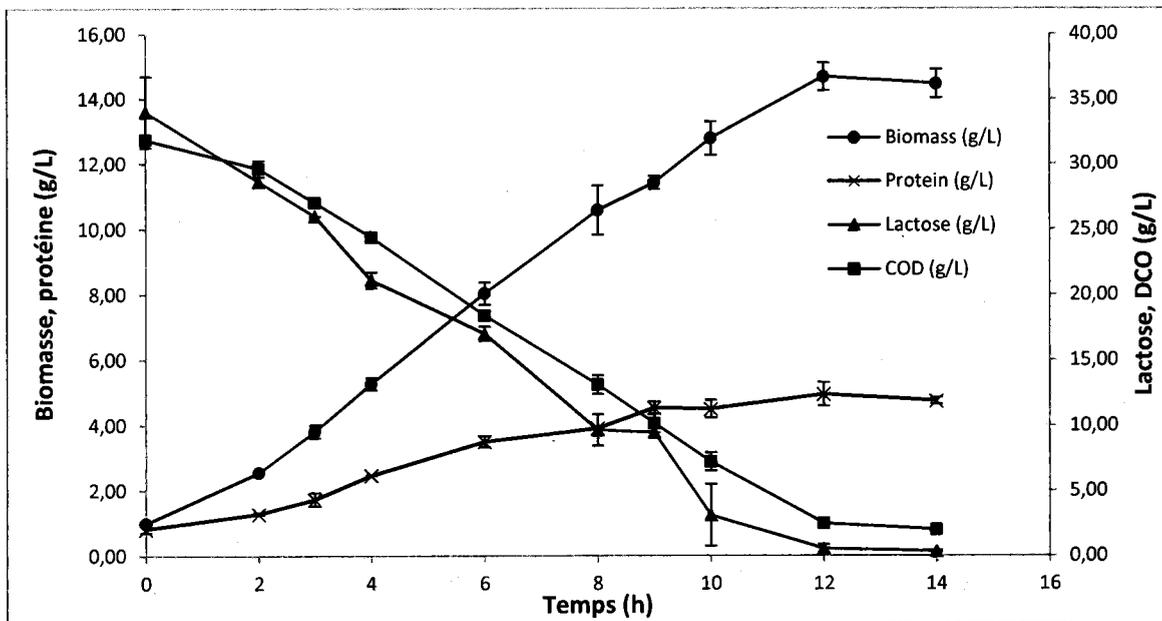


Figure 13- Cinétiques de croissance du mix KM-LF-CU dans les conditions optimales de croissance. Les valeurs représentent des moyennes de 3 fermentations indépendantes effectuées dans un fermenteur de 5L sur le PLS, dans les mêmes conditions (pH=4.4; T=34.8°C; [lactose]=35g/L; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM)

**Tableau 21- Valeurs des paramètres cinétiques du mélange KM-LF-CU dans les conditions optimales de culture sur PLS**

Paramètres cinétiques	Unité	PLS conditions optimales	PLS 50 g/L conc. initiale de lactose	LS 50 g/L conc. initiale de lactose	Significativité statistique
$\mu_{\max}$	h <sup>-1</sup>	0.31±0.002	0.31±0.09	0.20±0.02	NS
$Y_{x/s}$	g/g	0.42±0.02	0.39±0.01	0.40±0.03	NS
$P_X$	g/L.h	1.24±0.09	1.32±0.01	1.45±0.09	NS
$P_{\text{Lactose}}$	g/L.h	3.11±0.12 <sup>a</sup>	3.78±0.06 <sup>b</sup>	4.24±0.01 <sup>c</sup>	HS
$q_{\text{Lactose}}$	g/g.h	0.75±0.11	0.64±0.01	0.51±0.007	S
$t_{\text{Lactose}}$	h	12	14	11	
Rendement épur.	%	91.0±0.04	92.9±0.01	89.0±0.05	
$P_{\text{DCO}}$	g/L.h	2.75±0.12 <sup>a</sup>	3.49±0.00 <sup>b</sup>	-	S
$Y_{\text{Prot/x}}$	g/g	0.34±0.02 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.40±0.01 <sup>b</sup>	S
$P_{\text{Protéine}}$	g/L.h	0.56±0.06	0.49±0.02	0.57±0.01	NS
$\mu_{\max}$ LF	h <sup>-1</sup>	0.25±0.06	0.23±0.11	0.17±0.02	NS
$\mu_{\max}$ KM	h <sup>-1</sup>	0.42±0.03 <sup>a</sup>	0.42±0.01 <sup>a</sup>	0.50±0.01 <sup>b</sup>	S
$\mu_{\max}$ CU	h <sup>-1</sup>	0.41±0.05	0.45±0.03	0.39±0.01	NS

$Y_{\text{Prot/x}}$  : contenu protéique dans la biomasse.

$\mu_{\max}$  LF,  $\mu_{\max}$  KM,  $\mu_{\max}$  CU: taux de croissance spécifique pour chaque souche, basé sur le compte cellulaire de chacune (UFC/mL).

ANOVA: NS: non significatif, S: significatif ( $p \leq 0.05$ ), HS: hautement significatif ( $p \leq 0.01$ ).

Les valeurs suivies par la même lettre appartiennent au même groupe statistique selon le test de comparaison de la moyenne de Fisher (LSD;  $p \leq 0.05$ ).

Dans la littérature, deux études scientifiques ont rapporté l'utilisation de souches, métaboliquement apparentées à KM, co-cultivées avec des levures du groupe *Candida* sur des milieux à base de lactose. Dans l'étude de Carlotti et al. (1991), *Candida kefyr* (syn. *K. marxianus*) a été co-cultivée avec *C. valida* LY497, lactose négative, sur un milieu de lactosérum. Le rendement en biomasse rapporté était de 0.38 g/g, avec une dégradation complète du lactose en 11h de fermentation. L'opération de ce procédé, telle que décrite dans le texte du brevet (Grandjacquet, 1989), a requis deux phases de fermentation. Une première phase a consisté à inoculer *K. kefyr* afin de transformer une fraction du lactose en éthanol ayant servi de source de carbone pour *C. valida*, inoculée en second lieu. La fermentation s'est ensuite

poursuivie avec les deux souches, en mode continu. Cristiani Urbina et al. (2000) ont sélectionné *T. cremoris*, une levure au métabolisme respiro-fermentaire, et *C. utilis* NRRL Y-900 pour être co-cultivées sur le perméat de lactosérum. Dans une culture en batch, le rendement en biomasse obtenu était de 0.45 g/g, et une consommation totale du lactose après 9h de fermentation. Cependant, malgré la déplétion du lactose, la biomasse a continué à augmenter aux dépens des métabolites excrétés par *T. cremoris*. La biomasse maximale a été atteinte après 18h de fermentation. Dans la présente étude, la concentration en biomasse a augmenté en parallèle avec la consommation de lactose. L'atteinte du plateau de la production maximale de biomasse a coïncidé avec la déplétion du lactose dans le milieu (Figure 13). Un rendement en biomasse maximal a été atteint après 12 h de fermentation (Tableau 21). Étant donné que l'objectif de l'opérateur du procédé est, prioritairement, la dégradation du lactose, l'absence de temps mort en raison d'un découplage entre la production de biomasse et la consommation du lactose faciliterait les opérations de fermentation à l'échelle industrielle. De plus, cette propriété permettra le contrôle de l'alimentation du substrat dans le fermenteur exclusivement par le suivi en ligne de la teneur en lactose.

La comparaison entre les profils de production de biomasse et le contenu de celle-ci en protéines montre un découplage évident entre les deux paramètres en fonction du temps. En début de phase exponentielle de croissance d'une culture en batch, et en raison de la richesse du milieu en éléments nécessaires à la croissance, le métabolisme des microorganismes est intensément orienté vers les voies biosynthétiques et énergétiques promouvant la multiplication cellulaire. Sous cette dynamique de multiplication cellulaire, la physiologie de la levure est caractérisée par des cellules de petites tailles, au contenu protéique élevé. Au fur et à mesure que la culture se dirige vers la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire, enclenchée par le tarissement des nutriments nécessaires à la synthèse des composants cellulaires, les levures sollicitent de plus en plus les voies d'accumulation des hydrates de carbone de réserve, tels que le glycérol pour KM et le glycogène pour CU. Ces réserves de carbone sont synthétisées en prévention de l'avènement de conditions environnementales défavorables, aux dépens des protéines, étant donné que le cycle de développement cellulaire est sur le point de s'arrêter. En fin de fermentation, le ratio des protéines dans la biomasse ( $Y_{\text{Prot/x}}$ ) est passé de 0.50 g/g±0.01 (à  $t=2 - 3h$ ) à 0.34 g/g±0.02 en fin de fermentation. Ce ratio correspond à une production de

protéines de 4.95 g/L, équivalente à la transformation de 80% de l'azote fourni à la culture (la quantité maximale potentielle de protéines étant de  $1 \text{ g azote} \times 6.25 = 6.25 \text{ g/L}$ ). L'appauvrissement du milieu de culture en éléments minéraux et oligo-éléments serait vraisemblablement à l'origine de ce phénomène. Cette hypothèse est discutée dans la section 6.2.5 du présent chapitre. La prévention d'un tel découplage serait possible en procédant à une supplémentation appropriée en minéraux et en oligo-éléments, nécessaires pour la catalyse des activités enzymatiques de biosynthèse. Cette supplémentation serait effectuée dans un contexte d'une culture en batch alimenté (fed-batch) où l'azote et les minéraux seraient mélangés au substrat, contenant principalement la source de carbone.

➤ Capacité épuratoire du procédé

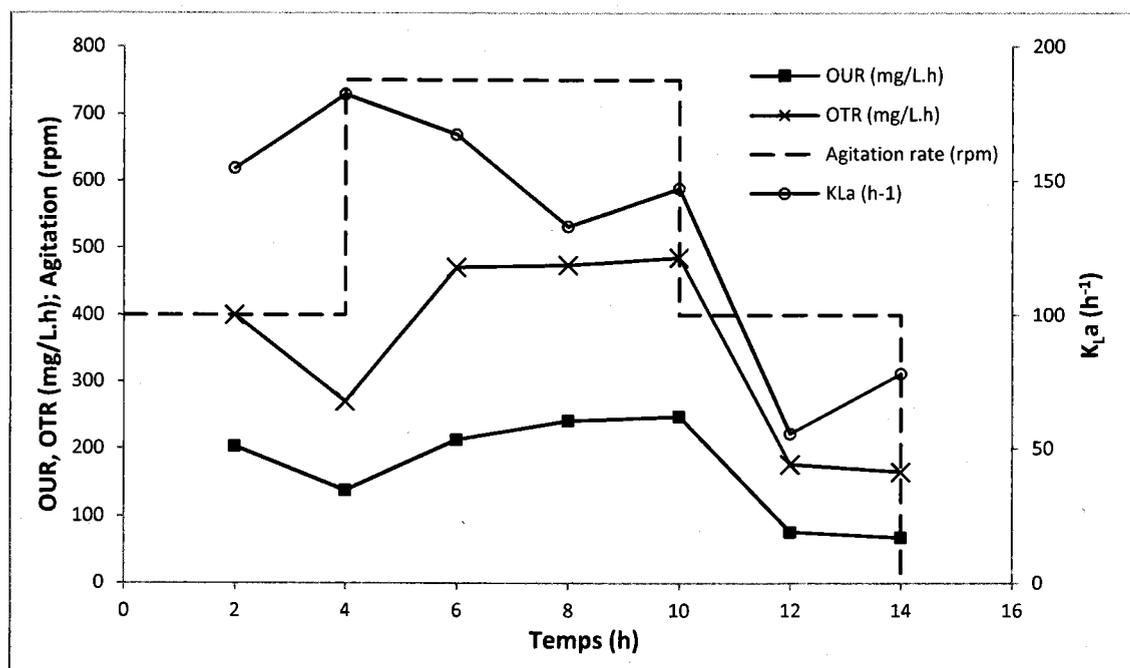
Une dégradation complète du lactose, principal élément polluant du LS, a permis une réduction de  $91\% \pm 0.02$  de la DCO soluble, initialement à 32,000 mg/L. Cette réduction est plus élevée que celle obtenue avec une culture pure de KM, réalisée dans les mêmes conditions. Celle-ci s'est élevée à 76% de sa valeur initiale de DCO soluble (33,000 mg/L), malgré la consommation totale du lactose en 14h de fermentation. Dans le cas d'une culture pure de KM, la consommation du lactose provoque la libération de métabolites, déclenchée à la suite du *shift* métabolique opéré par la levure. La présence de CU dans la culture mixte permettrait donc l'assimilation des métabolites produits comme source de carbone. Ainsi, l'avantage immédiat de la co-culture par rapport à la culture pure est l'amélioration du taux de récupération du carbone initialement présent dans le substrat, contribuant ainsi à améliorer les rendements en biomasse et affiner l'épuration de l'effluent.

➤ Évolution des taux de transfert et de consommation de l'oxygène dissout et de  $K_{La}$

Les fermentations étudiées dans ce sous-chapitre (section 6.2.4) ont été conduites sous des conditions d'aération constantes (1 vvm) et des taux d'agitation variables, en fonction de la demande en oxygène de la culture. La Figure 22 illustre l'évolution du taux de transfert d'oxygène (OTR; mg/L.h), du taux de consommation d'oxygène par la culture (OUR; mg/L.h) et du coefficient de transfert volumétrique de l'oxygène ( $K_{La}$ ;  $\text{h}^{-1}$ ) au cours de la culture du consortium KM-LF-CU sur le PLS, dans les conditions optimales déterminées auparavant.

Durant les 4 premières heures de fermentation, et sous une agitation de 400 rpm, les profils des taux de transfert et de consommation ont affiché une légère diminution. Lors de la préparation de l'inoculum, chaque souche du mélange est cultivée séparément dans un milieu synthétique, où la source de carbone est différente de celle du substrat de la fermentation principale. Les 3 souches sont ensuite mélangées dans un petit volume du substrat principal (0.5L), environ une heure avant l'inoculation, afin de leur permettre de s'adapter à la culture en consortium et aux nouvelles conditions de fermentation. Cette phase d'adaptation se prolongerait possiblement après l'inoculation, ce qui expliquerait le délai dans l'augmentation du taux de consommation d'oxygène jusqu'à 4h de l'inoculation. Au démarrage de la phase exponentielle de croissance, la demande en oxygène dissout est devenue de plus en plus importante. Pour combler ce besoin, le taux d'agitation a été augmenté de 400 à 750 rpm, ce qui a provoqué une augmentation de OTR et OUR. Un plateau des taux de consommation et de transfert d'oxygène a été atteint après 6h de culture et s'est prolongé sur toute la durée de la phase exponentielle (10h). Les profils des taux de transfert et de consommation de l'oxygène sont demeurés constants à leurs valeurs maximales pendant toute la durée de la phase exponentielle, reflétant une intense activité de la culture mixte durant l'oxydation du lactose. Par ailleurs, nous avons assisté à une baisse de la valeur du  $K_{La}$  de  $182 \text{ h}^{-1}$  à  $145 \text{ h}^{-1}$  entre 4h et 10h de fermentation, respectivement, démontrant une réduction de l'efficacité du transfert d' $\text{O}_2$  de la phase gazeuse vers la phase liquide. Cette baisse qui intervient malgré le maintien du taux d'aération et de la vitesse d'agitation constants, serait vraisemblablement provoquée par le changement des propriétés rhéologiques du milieu de culture. En effet, durant la phase exponentielle, la multiplication intense des cellules provoque une augmentation rapide de la viscosité dans le milieu par l'augmentation de la teneur en solides en suspension, ce qui a pour effet de diminuer la valeur du coefficient de transfert volumétrique de l'oxygène. D'autre part, le recours à une utilisation plus accrue de l'agent antimoussant chimique (le poly-diméthyl-siloxane) durant la phase exponentielle est susceptible d'affecter la valeur du  $K_{La}$  en changeant les propriétés tensio-actives du milieu de culture (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009). Après 12h de fermentation, lorsque la source de carbone principale a été complètement épuisée, le taux de consommation de l'oxygène a diminué brusquement, entraînant conséquemment la diminution du taux de transfert d'oxygène. La fermentation s'est terminée entre 12h et 14h à une vitesse d'agitation de 400 rpm. Durant cette phase, la demande en oxygène a été négligeable. Les profils des taux de transfert et de consommation de l'oxygène

ont été directement corrélés avec les cinétiques de croissance de la biomasse et de la consommation du lactose. Ainsi, le monitoring des paramètres OUR et OTR pourrait constituer un outil additionnel de contrôle du procédé de fermentation, spécialement pour les cultures avec limitation en oxygène, où les rendements de production sont directement reliés à la disponibilité et au taux de transfert de l'oxygène dissout aux cellules. Des différences significatives dans les rendements en biomasse, en protéines et en dégradation de la DCO ont été observées entre les cultures en fioles agitées et en fermenteur (Tableau 16 et 21). Ces différences sont principalement dues aux différents niveaux de transfert d'oxygène dans les deux types de cultures.



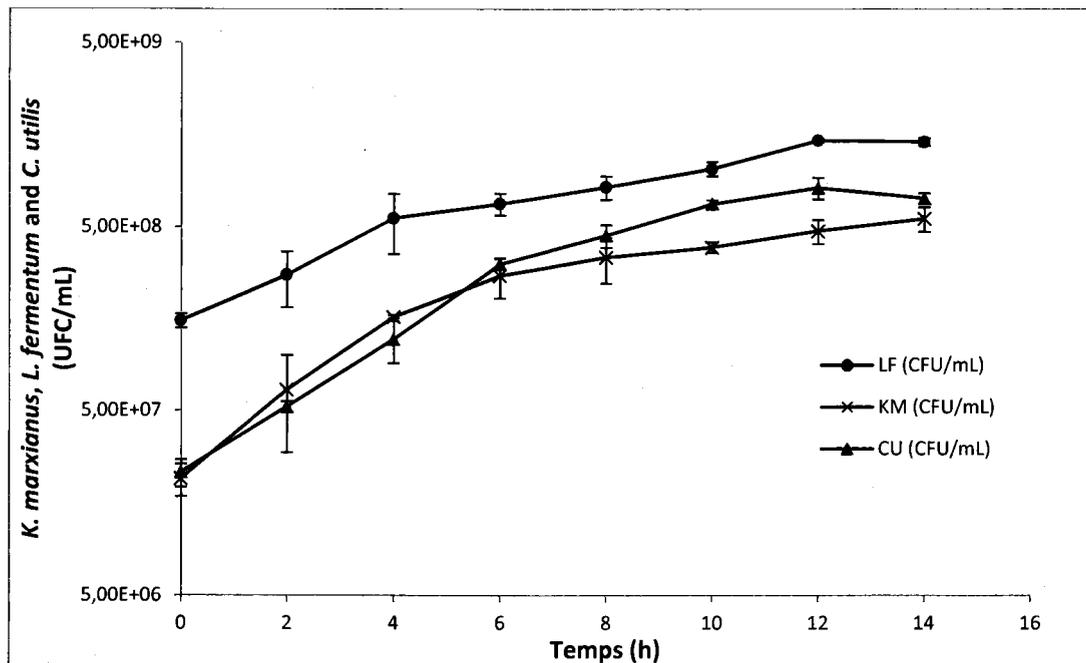
**Figure 14- Profils de OTR, OUR et  $K_La$  durant les cultures batch de KM-LF-CU sur le PLS dans les conditions optimales.** Chaque valeur est une moyenne de 2 mesures effectuées sur 2 fermentations indépendantes

#### ➤ Cinétiques individuelles des souches de la culture mixte

La technique de comptage cellulaire développée au cours de la présente étude a permis d'identifier et de dénombrer, de manière individuelle, les souches de la culture mixte permettant ainsi de suivre la cinétique de croissance de chacune d'elles. La Figure 15 illustre les comptes

cellulaires de KM, LF et CU durant les 3 fermentations du PLS, effectuées dans les conditions optimales de croissance. Les trois souches ont montré des profils typiques d'une culture en batch, sans l'occurrence d'une phase de latence apparente, indiquant un degré d'activité élevé et une adaptation des 3 souches aux conditions de fermentation et à la culture en consortium. Durant la phase exponentielle, les taux de croissance spécifiques de LF, KM et CU sont de 0.25, 0.42 et 0.41 h<sup>-1</sup>, respectivement (Tableau 21). À priori, aucune occurrence de phénomènes d'inhibition affectant l'une des 3 souches n'a été détectée. D'une manière générale, l'équilibre entre les souches du consortium a été maintenu relativement stable durant la fermentation. Malgré le fait que CU ne soit pas cultivée sur un substrat assimilable, elle a montré un compte cellulaire élevé, équivalent à celui de KM, montrant que l'acide lactique et les métabolites provenant respectivement de l'activité métabolique de LF et de KM ont pu soutenir convenablement la croissance de CU. La détermination de la nature des interactions entre deux ou plusieurs microorganismes peut s'avérer très complexe en raison du degré élevé de complexité du phénotype microbien, qui dépend du substrat, des conditions de culture et du type de microorganismes co-cultivés. D'une manière générale, on peut estimer qu'il y a une compétition entre KM et LF vis-à-vis du lactose, source principale de carbone du substrat. Cependant, la conversion par KM d'une fraction du lactose en métabolites permettant de promouvoir la croissance de CU serait un indicateur que la quantité de lactose dans le milieu suffit pour combler les besoins en carbone de KM et de LF. En effet, dans le cas où la concentration en lactose serait limitante dans la culture, le déclenchement du métabolisme respiro-fermentaire de KM, démarrant généralement à partir d'une concentration seuil de 10 – 12 g/L, n'aurait pas lieu. Le commensalisme est un type d'interaction microbienne entre deux populations de microorganismes proliférant en co-culture, où l'une tire profit de l'activité métabolique de l'autre (Fredrickson, 1977). Ce type de relation à sens unique est très fréquent dans les cultures mixtes où un microorganisme est incapable d'assimiler la source de carbone et d'énergie excepté à travers l'intervention du second microorganisme (Harrison, 1978). En se basant sur cette définition, ce type d'interaction pourrait définir la relation entre KM et CU d'un côté et LF et CU de l'autre. D'autre part, la capacité de CU à dégrader l'acide lactique produit par LF permettrait de maintenir la concentration de ce composé en deçà du seuil critique inhibiteur pour la bactérie. Il s'agirait donc, dans ce cas, d'une interaction de type symbiose qui régirait la relation entre les deux microorganismes. Dans la littérature, certaines études ont mis

en évidence une relation de symbiose entre les bactéries lactiques et les levures dans les produits laitiers fermentés. En effet, des levures, telles que *S. cerevisiae*, fourniraient des facteurs de croissance, tels que les vitamines, qui supporteraient la croissance de bactéries lactiques dans un substrat pauvre en ces substances (Cheirsilp *et al.*, 2003, Plessas *et al.*, 2008). Plusieurs hypothèses pouvant être formulées afin de définir la nature des interactions régissant les souches de ce ‘mini-écosystème’ requièrent des investigations plus approfondies. Une attention particulière devra être portée à la nature des composés produits par les souches lactose-positives, KM et LF, afin de soutenir la croissance de CU, ainsi qu’au soutien fourni par les levures pour promouvoir la croissance de LF.



**Figure 15- Cinétiques de croissance des souches du mélange durant la fermentation du PLS dans les conditions optimales de croissance.** Les valeurs représentent des moyennes de 3 fermentations indépendantes effectuées dans un fermenteur de 5L, dans les mêmes conditions (pH=4.4; T=34.8°C; [lactose]=35g/L; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM)

### 6.2.5. Évaluation des performances du procédé

La performance du procédé optimisé a été évaluée pour le traitement du PLS pur, non dilué, dont la concentration en lactose est d'environ 5 % p/v. Par ailleurs, l'adaptabilité du procédé à performer dans du LS pur, sans recourir à l'extraction des protéines sériques, pourrait s'avérer attrayante dépendamment de la stratégie choisie par l'opérateur du procédé pour traiter son effluent. Ainsi, une série de fermentations du mélange KM-LF-CU sur le LS et le PLS à 5% (p/v) de lactose ont été réalisées afin de suivre les cinétiques de la production de biomasse, du contenu protéique de la biomasse, de la consommation du lactose et de la croissance des souches du mélange (Figures 16 et 17). L'estimation des paramètres cinétiques pour les deux séries de fermentation est résumée dans le Tableau 21. Une analyse de la variance a été effectuée sur les paramètres cinétiques afin de déterminer l'existence de différences significatives entre les différents types de substrat utilisé (PLS 3.5% (p/v) de lactose, PLS 5% (p/v) de lactose et LS 5% de lactose). D'après les résultats de l'ANOVA, le rendement et la productivité en biomasse ( $Y_{x/s}$  et  $P_X$ ), la productivité en protéines de la biomasse ( $P_{\text{Protéines}}$ ) ainsi que le taux de croissance spécifique global (sommant les comptes cellulaires des 3 souches du mélange) ( $\mu_{\text{max}}$ ) n'ont pas montré de différences significatives en fonction de la variation des substrats utilisés. Cependant, le taux de consommation du lactose, et par conséquent le taux de dégradation de la DCO, ont montré des différences significatives selon le substrat utilisé. Les valeurs les plus élevées de ces paramètres cinétiques ont été obtenues avec le LS à 5% (p/v). La conséquence directe de cet effet est la réduction du temps requis pour le traitement du rejet lorsque le LS est fermenté sans extraction des protéines sériques (14h pour le PLS et 11h pour le LS). Une telle réduction du temps de traitement a un impact considérable sur l'opérabilité du procédé dans un contexte industriel. La différence entre le LS et le PLS en termes de composition biochimique réside dans le contenu en protéines sériques solubles de chacun. En effet, les protéines lactoglobulines et lactalbumines du lactosérum sont des métalloprotéines possédant la propriété de complexer des ions tels que  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  (Baumy & Brule, 1988). Ces éléments minéraux, malgré leur présence à l'état de traces dans le lactosérum, sont capables de supporter plusieurs voies métaboliques de biosynthèse et de soutenir le développement du cycle cellulaire (Loukin & Kung, 1995). La déprotéinisation du LS contribuerait vraisemblablement à éliminer une fraction majeure des cations complexés aux protéines sériques, induisant ainsi une

diminution des activités enzymatiques dépendantes de la présence de ces minéraux durant la fermentation du PLS. Cette hypothèse expliquerait ainsi la différence dans les coefficients  $Y_{\text{prot/x}}$  (g/g) observée entre la culture sur le LS par rapport à celle sur le PLS. En effet, la culture du consortium sur le LS a abouti à un coefficient  $Y_{\text{prot/x}}$  de  $0.40 \text{ g/g} \pm 0.01$  (correspondant à une quantité de protéine de  $6.40 \pm 0.13 \text{ g/L}$ ), tandis que dans la culture effectuée sur le PLS, le coefficient  $Y_{\text{prot/x}}$  est de  $0.32 \text{ g/g} \pm 0.01$ . Une supplémentation appropriée du PLS permettrait de pallier à cette carence en minéraux et en oligo-éléments. La comparaison des cinétiques individuelles des 3 souches entre les 3 substrats a montré des profils de croissance très similaires. En effet, ni l'augmentation de la concentration en lactose (de 3.5% à 5% p/v), ni la présence des protéines sériques dans le substrat ne semblent avoir perturbé l'équilibre établi entre les souches du mélange. En termes de taux de croissance spécifique, aucune différence significative n'a été observée pour LF et CU. Seule KM a montré une légère augmentation de  $\mu_{\text{max}}$ , ne dépassant pas 19%, lorsqu'elle a été cultivée sur le LS 5% (p/v).

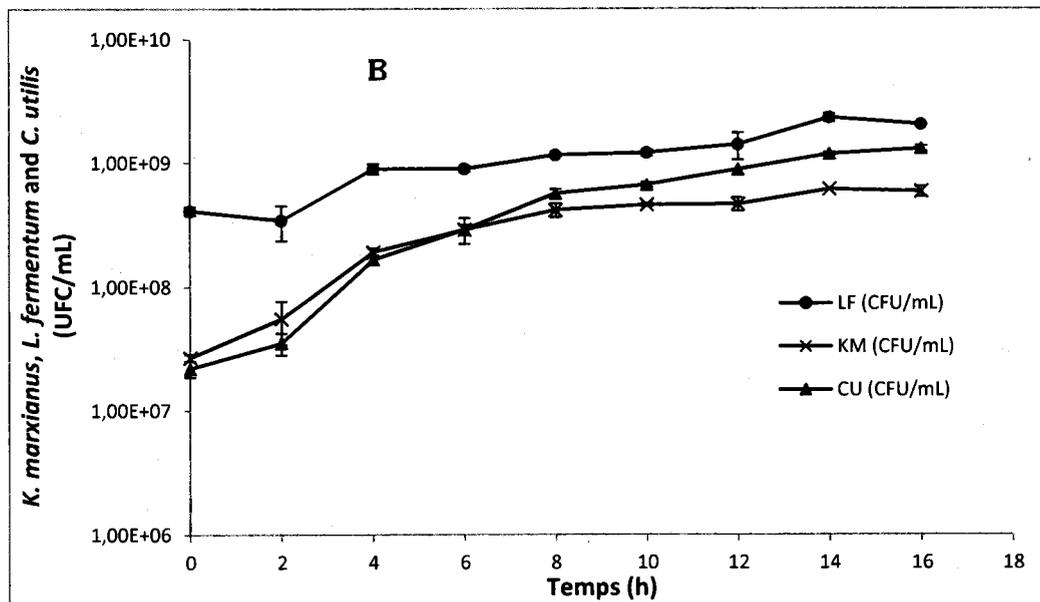
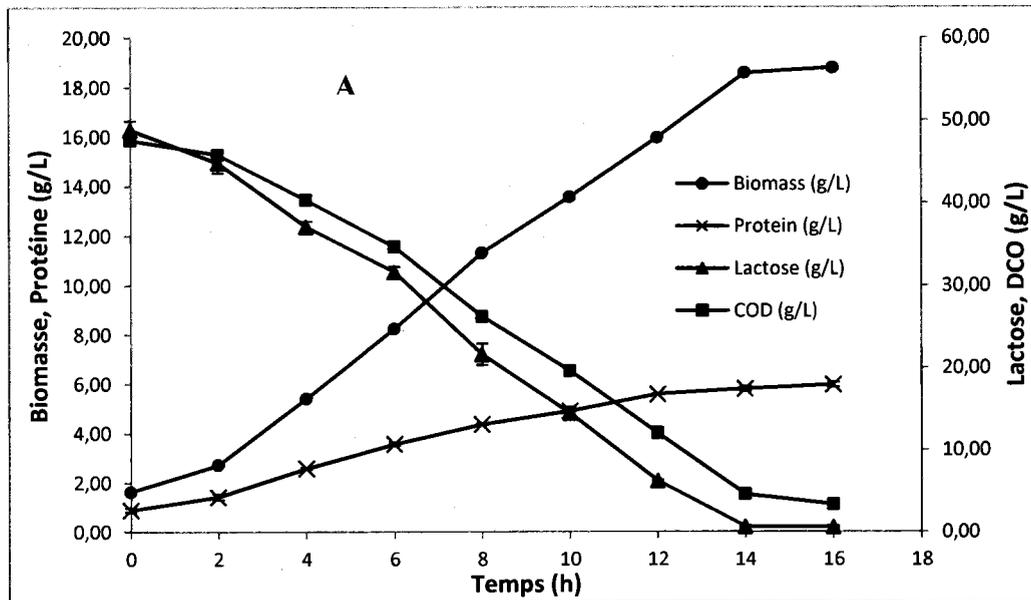


Figure 16- (A) Cinétiques de fermentation de KM-LF-CU cultivé sur le PLS à 50g/L de lactose. (B) Cinétiques de croissance de chacune des souches du consortium durant la même fermentation. Les valeurs représentent une moyenne de 2 mesures effectuées sur 2 fermentations indépendantes. Conditions : pH=4.4; T=34.8°C; [lactose]=35g/L; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

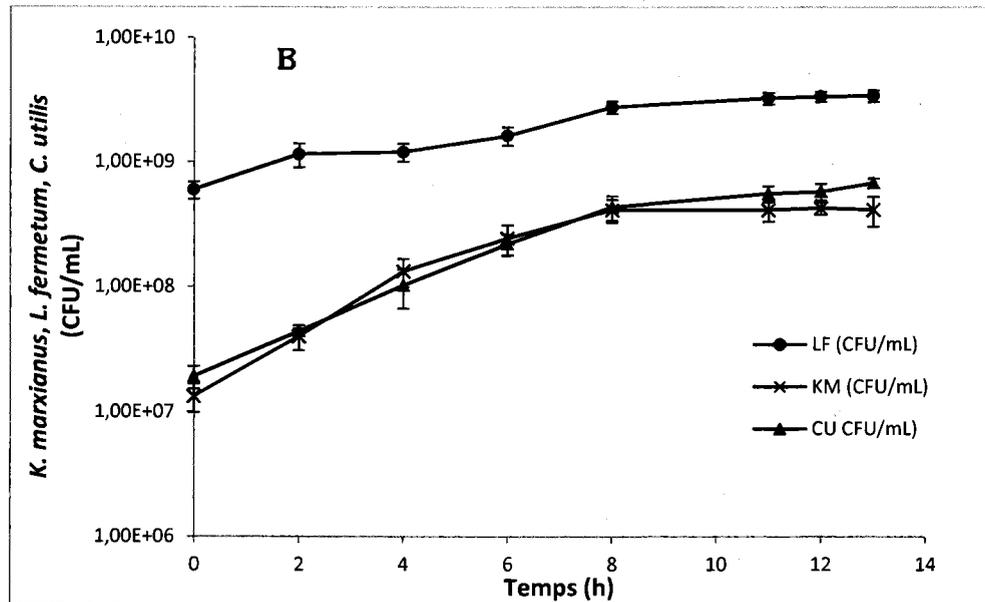
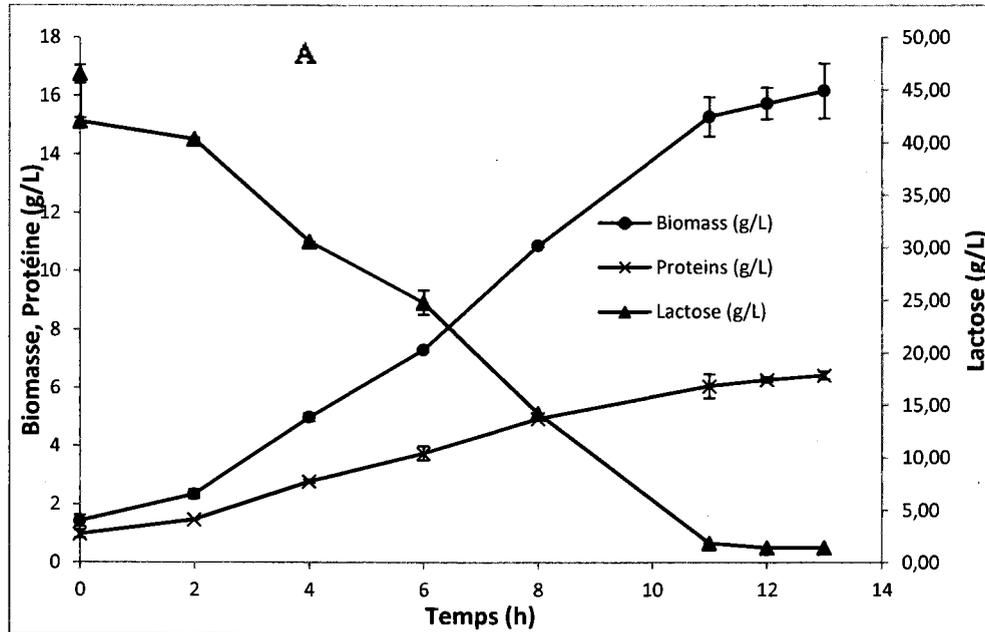


Figure 17- (A) Cinétiques de fermentation de KM-LF-CU cultivé sur le LS à 50g/L de lactose. (B) Cinétiques de croissance de chacun des souches du consortium durant la même fermentation. Les valeurs représentent une moyenne de 2 mesures effectuées sur 2 fermentations indépendantes. Conditions : pH=4.4; T=34.8°C; [lactose]=35g/L; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

### 6.2.6. Qualités du produit fini et de l'effluent de fermentation

Le produit obtenu à l'issue de la fermentation consiste en une biomasse microbienne au contenu protéique substantiel (34 – 40% p/p). L'Annexe 4 rapporte la composition moyenne d'une biomasse produite par le procédé optimisé en utilisant le PLS ou le LS comme substrat. Le fait que les profils des acides aminés de la fraction protéique des deux produits obtenus soient comparables à celui du concentré des protéines de lactosérum (CPL, 35% de protéines) montre que la biomasse produite par notre procédé possède un potentiel très intéressant du point de vue apport protéique. Par ailleurs, la biomasse microbienne à base de levure est reconnue pour sa teneur en polysaccharides d'intérêt, majoritairement les  $\alpha$ -D-mannanes et les  $\beta$ -D-glucanes (Cabib *et al.*, 2001), principaux composés de la paroi cellulaire des levures. Ces polysaccharides possèdent des propriétés nutritionnelles et immuno-modulatrices reconnues lorsqu'ils sont incorporés dans les diètes pour animaux. En effet, il a été montré que l'utilisation des parois cellulaires des levures dans l'alimentation des animaux d'élevage permettait d'inhiber l'adhésion de pathogènes au tractus gastro-intestinal et de l'activité toxique des mycotoxines et d'activer et stimuler les mécanismes de la réponse immunitaire (Kogan & Kocher, 2007). La biomasse produite représenterait donc un supplément alimentaire de choix proposant une alternative à des additifs protéinés très coûteux, tels que les concentrés de protéines de lactosérum ou le plasma sanguin. Elle aiderait aussi à opérer la transition vers une alimentation exempte de composés antibiotiques dont l'emploi est de plus en plus critiqué dans le domaine de l'alimentation animale.

La composition de l'effluent obtenu en fin de fermentation après récupération de la biomasse par centrifugation est résumée dans l'Annexe 4. Avec un rendement épuratoire de plus de 92 %, le procédé permet d'obtenir un rejet très peu chargé en matières organiques (2100 ppm). Avec la charge organique, le phosphore représente l'élément polluant dont le rejet est soumis à des normes de rejet très restrictives en raison de son effet néfaste sur la flore des cours d'eau. Le procédé développé a permis de réduire la teneur en phosphore contenu dans le LS à 83 ppm, soit un rendement épuratoire de 84 % vis-à-vis du phosphore. D'une manière générale, en plus de sa capacité à exploiter le potentiel nutritif du LS pour générer un produit à valeur ajoutée potentielle, le procédé développé permet de générer un rejet dont les caractéristiques

physicochimiques permettent de faciliter sa disposition dans les eaux municipales. Les capacités épuratoires du procédé sont de loin plus rentables que celles offertes par les procédés proposés actuellement sur le marché tels que la méthanisation, l'utilisation directe du (perméat de) LS en alimentation animale ou encore l'épandage.

### **6.3. Conclusion**

L'objectif derrière le développement d'un procédé de fermentation du LS est d'apporter une valeur ajoutée à un rejet très polluant, dont la disposition constitue un facteur limitant l'expansion des petits et moyens producteurs de fromage. Dans ce contexte, l'efficacité du procédé développé est d'une importance capitale puisqu'elle doit offrir une alternative économiquement viable aux technologies déjà existantes sur le marché. Ainsi, dans un contexte industriel, la productivité en biomasse et le taux de consommation du lactose sont d'égales importances, même si la priorité pour l'acquéreur reste la disposition du lactose afin de se conformer aux normes de rejets municipales. Le procédé développé propose des performances intéressantes par comparaison aux procédés rapportés par la littérature, ayant atteint ou non la phase d'industrialisation. En effet, la capacité du présent procédé à dégrader le lactose d'un lot de lactosérum non dilué en 11h de fermentation présente un avantage opérationnel lui permettant d'être facilement inséré dans un cycle de production fromagère, d'une durée moyenne de 12h. Par ailleurs, une investigation sur la stabilité de la culture mixte durant des fermentations répétées s'avère nécessaire afin de s'assurer du maintien de son équilibre, garant des performances du procédé. Pour cela, des cultures en batch alimenté (Fed-batch) donneraient une idée claire de la robustesse de la flore durant l'alimentation du substrat. D'une manière générale, le procédé proposé a montré des performances et une stabilité intéressantes, dépassant largement celles obtenues avec le consortium Biocompact, lors du traitement de substrats purs, avec ou sans extraction des protéines sériques. Cette flexibilité permet d'exploiter le procédé indépendamment de la stratégie choisie par l'opérateur vis-à-vis des protéines sériques.

## **CHAPITRE 7 : ÉTUDE DES CINÉTIQUES DE PRODUCTION ET DE CONSOMMATION DES MÉTABOLITES DANS LA CULTURE MIXTE ET DÉTERMINATION DE LA NATURE DES INTERACTIONS MICROBIENNES**

Le monitoring de la cinétique de chacune des souches du consortium microbien au cours de la fermentation du lactosérum a montré que les trois souches montraient des tendances de croissance caractéristiques d'une culture pure en mode batch, sans l'occurrence de phénomènes d'inhibition, à priori. Il serait donc intéressant de tenter de comprendre les relations gouvernant la culture mixte en sachant, d'une part, qu'il existe une compétition vis-à-vis du lactose entre deux souches (LF et KM) et que la troisième souche, CU, est incapable de métaboliser le lactose (Tableau 22). Dans ce chapitre, nous nous proposons de comprendre les interactions entre les différentes souches du consortium microbien en regard de l'assimilation et de la fermentation des acides organiques et des glucides au cours de la fermentation du lactosérum. L'approche adoptée est basée sur l'identification et la quantification des acides organiques et des glucides résultant de la conversion du lactose par les souches du consortium microbien et pouvant induire la croissance ou l'inhibition d'une ou de plusieurs d'entre elles.

### **7.1. Méthodologie pour l'étude de la production et la dégradation de métabolites par les souches du mélange microbien**

La méthodologie proposée pour l'étude de la production et la consommation de métabolites lors de la fermentation du lactosérum se base sur le principe qu'une fraction du flux de carbone provenant de la dégradation du lactose par les souches lactose-positives (la levure KM et la bactérie lactique LF) est orientée vers la production de métabolites qui serviront de substrats à la souche lactose-négative du consortium. Il s'agit donc, en premier lieu, de comprendre la cinétique de production de ces métabolites par les souches lactose positives, cultivées individuellement ou en couple (KM, LF et KM-LF), puis d'étudier la cinétique de dégradation de ces composés organiques par la souche lactose-négative CU en la cultivant sur les surnageants de ces cultures.

Tableau 22- Assimilation des sources de carbone par les 3 souches du mélange

Source de carbone	<i>Kluyveromyces marxianus</i> *	<i>Candida utilis</i> *	<i>Lactobacillus fermentum</i> **
Glucose	+	+	+
Maltose	Variable	+	-
Raffinose	+	+	-
Cellobiose	Variable	+	+
Tréhalose	Variable	+	+
Galactose	Lent	-	+
Lactose	+	-	+
Sucrose	+	+	+
Éthanol	+	+	nd
Inositol	-	-	-
Sorbitol	+	-	+
DL-Lactate	+	+	nd
Citrate	variable	+	nd
Succinate	+	+	nd
Glycérol	Lent	+	-
D-Gluconate	-	+	-

\* Adapté de Kurtzman et Fell (1998)

\*\* Résultats obtenus par identification par galeries API 50 CHL (identification des Lactobacilles)

nd : non déterminé

### 7.1.1. Fermentations du lactosérum pour l'étude de la production et de la consommation de métabolites

Trois fermentations de PLS ont été effectuées dans les réacteurs de 5L (Sartorius Stedim, Allemagne) afin d'étudier la cinétique de production des acides organiques et des glucides. Le choix d'effectuer les fermentations dans des réacteurs au lieu de fioles Erlenmeyers, plus simples d'utilisation, a été motivé par le degré avancé de contrôle et de maintien des conditions opératoires qu'offre une culture dans un fermenteur, qui permet de simuler plus fidèlement les conditions de fermentation à l'échelle industrielle. Le Tableau 23 résume l'ensemble des fermentations effectuées pour cette étude.

**Tableau 23- Protocole de fermentation pour l'étude de la production et de la consommation des métabolites**

Culture des souches lactose positives (production métabolites) de	KM (Inoc. 5% v/v)	LF (Inoc. 5% v/v)	KM-LF (Inoc. 5% v/v) Ratio 1:2 (v/v)
Conditions	Volume = 3.5 L; [Lactose] = 35 g/L; T = 34.5±1°C; pH = 4.5±0.1 [Azote] <sub>(NH4)2SO4</sub> = 1 g/L Aération = 1 vvm; Agitation = 400 – 750 rpm		
Récupération du surnageant par centrifugation (8000 rpm; 20 min) T = 4°C* Traitement thermique sur le surnageant (105°C pendant 10 min)**			
Consommation de métabolites	CU (Inoc. 5% v/v)	CU (Inoc. 5% v/v)	CU (Inoc. 5% v/v)
Conditions	Volume = 3.5 L; T = 34.5±1°C; pH = 4.5±0.1 [Azote] <sub>(NH4)2SO4</sub> = 1 g/L Aération = 1 vvm; Agitation = 400 – 750 rpm		

\* La centrifugation est effectuée à 4°C afin de limiter l'évaporation de composés organiques volatils.

\*\* Un traitement thermique relativement doux permettrait de limiter au maximum l'évaporation de composés organiques. Dans ce cas précis, le fermenteur est stérilisé à sec. Le surnageant est ensuite disposé dans l'enceinte du fermenteur en maintenant au maximum un degré d'asepsie permettant d'éviter la contamination.

## 7.2. Résultats et discussion

### 7.2.1. Cinétiques de production des métabolites par les souches lactose-positives

Dans cette section, il est question d'étudier la cinétique de production de métabolites dans le sens large du terme. Ceci signifie que le terme *métabolites*, estimé comme étant la somme des concentrations des composés organiques extracellulaires identifiés et quantifiés à un temps  $t$  de la fermentation, sera considéré comme un paramètre cinétique à étudier, au même titre que la production de biomasse et la dégradation du lactose. Cette estimation permettra de comprendre dans un premier temps et d'une manière globale la physiologie des souches en terme de production de biomasse, de consommation de lactose et de sécrétion de métabolites. Dans une deuxième section, nous étudierons en détail la nature des métabolites et leur cinétique de production respective afin de dresser une cartographie détaillée des composés produits ainsi que le rôle qu'ils jouent dans la culture mixte.

#### *a- Cinétiques de croissance et de production de métabolites de KM :*

La Figure 18 illustre la variation de la production de biomasse, la consommation du lactose et la production de métabolites au cours de la fermentation du perméat de lactosérum par la souche KM. La courbe de production de biomasse montre une allure typique d'une culture en mode batch avec une phase de latence de 4h pendant laquelle la souche s'adapte à son milieu de culture. La phase exponentielle de croissance commence à  $t=4h$  et se termine à  $t=12h$ , elle est ensuite suivie d'une phase de décélération. Durant ces deux phases, la production de biomasse passe de 4.00 g/L à 10.7 g/L. La culture entame ensuite sa phase stationnaire durant laquelle la production de biomasse demeure constante. La productivité globale de la biomasse tout au long de la fermentation est de 1.07 g/L.h pour un rendement de conversion ( $Y_{x/lactose}$ ) de 0.29 g/g (Tableau 24). Au cours de la culture, le lactose est dégradé à un taux de 2.40 g/L.h. Le substrat est complètement épuisé après 16h de fermentation induisant ainsi la fin de la phase exponentielle de croissance. Au cours de la fermentation du perméat de lactosérum, la culture de KM a sécrété des métabolites dans le milieu extracellulaire (liste détaillée à la Figure 25). En effet, la Figure 18 montre qu'au moment de l'inoculation, la teneur en métabolites dans le milieu est nulle. Au fur et à mesure que la culture évolue, la concentration en métabolites dans le milieu augmente progressivement jusqu'à atteindre une concentration maximale de 4.25 g/L avec une

productivité de 0.26 g/L.h. Entre 14h et 16h, la concentration de métabolites est restée plus ou moins constante (4.01 g/L) tandis que la teneur en lactose résiduel dans le milieu ne dépassait pas 1.5 g/L (Tableau 24). Ceci montre que le métabolisme oxydo-fermentaire exhibé par les levures résistantes à la répression catabolique (ou *Crabtree* négatives) n'est déclenché qu'à partir d'une concentration seuil de la source de carbone au-delà de laquelle le flux glycolytique est partagé entre les voies métaboliques respiratoires de production d'énergie et la voie fermentaire, responsable de la production des métabolites. Cette voie est activée afin de maintenir un flux glycolytique constant. En d'autres termes, plus le flux glycolytique est important, plus la sécrétion de métabolites est élevée. En fin de fermentation, le taux de production de métabolites à partir du lactose ( $Y_{\text{métab/lactose}}$ ) est de 0.11 g/g. Ce taux ne prend pas en considération la fraction de métabolites éliminés du milieu par évaporation sous l'action de l'injection d'air en cours de fermentation. Le taux de conversion obtenu est supérieur à celui rapporté par Fonseca et al. (2007) qui l'ont estimé à 0.08 g/g pour une culture en batch de *K. marxianus* ATCC26548 sur un milieu synthétique contenant 10 g/L de glucose. Cette différence dans les taux de conversion pourrait s'expliquer par la concentration de carbone plus importante utilisée dans la présente étude (35 g/L vs 10 g/L) ainsi que par la différence dans la nature du glucide utilisé comme source de carbone (lactose vs glucose) qui engendrerait une production de métabolites plus élevée tel que rapporté par Hensing et al. (1994).

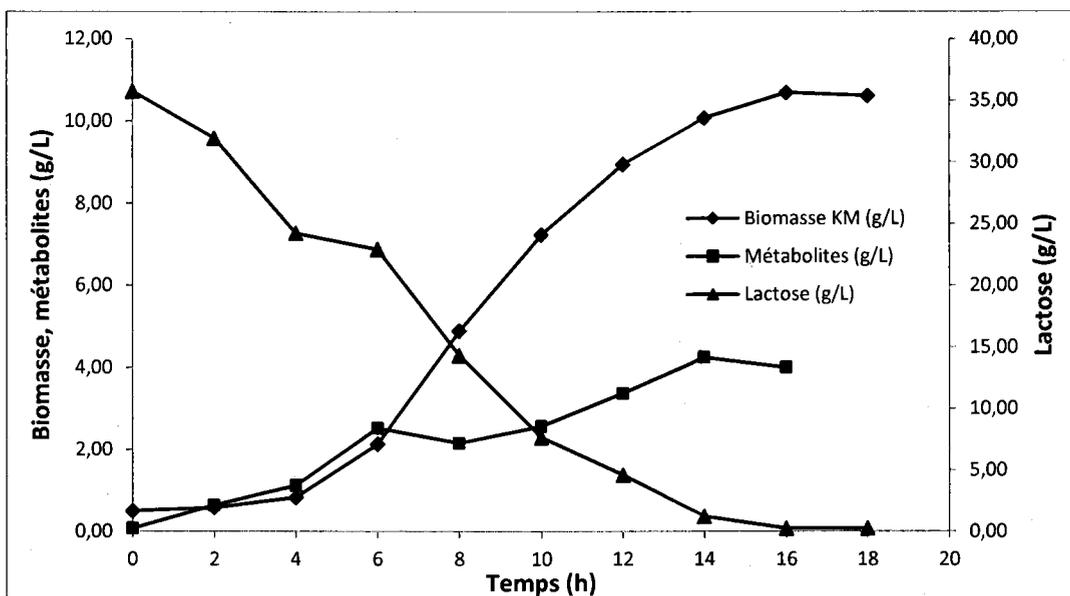


Figure 18- Cinétiques de production de biomasse, de consommation de lactose et de production de métabolites de KM cultivée sur le PLS. Conditions : T=34,8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

Tableau 24- Valeurs des paramètres cinétiques des cultures KM et KM-LF pour la production de métabolites

Paramètres cinétiques	Unités	KM	KM-LF
Rendement en biomasse ( $Y_{x/lactose}$ )	$g_x/g_{lactose}$	0.29	0.36
$\mu_{max}$	$h^{-1}$	0.59	0.32*
Biomasse maximale ( $X_{max}$ )	g/L	10.69	10.94
Quotient métabolique ( $q_s$ ) <sup>a</sup>	$g_{lactose}/g_x.h$	2.06	1.10
Quotient métabolique ( $q_m$ ) <sup>b</sup>	$g_{métab}/g_x.h$	0.23	0.15
Productivité en biomasse ( $P_x$ )	g/L.h	1.07	1.01
Productivité consommation lactose ( $P_L$ )	g/L.h	2.40	2.20
Productivité production métabolite ( $P_{pm}$ )	g/L.h	0.26	0.34
Rendement en métabolites ( $Y_{métab/lactose}$ )	$g_{métab}/g_{lactose}$	0.11	0.14
Coefficient de maintenance ( $m$ )	g/g.h	0.01	0.08
Rendement de conversion réel** ( $Y_g$ )	$g_x/g_{lactose}$	0.38	0.54

\*  $\mu_{max}$  calculé à partir de la somme des UFC/mL des deux souches KM et LF au temps  $t$ .

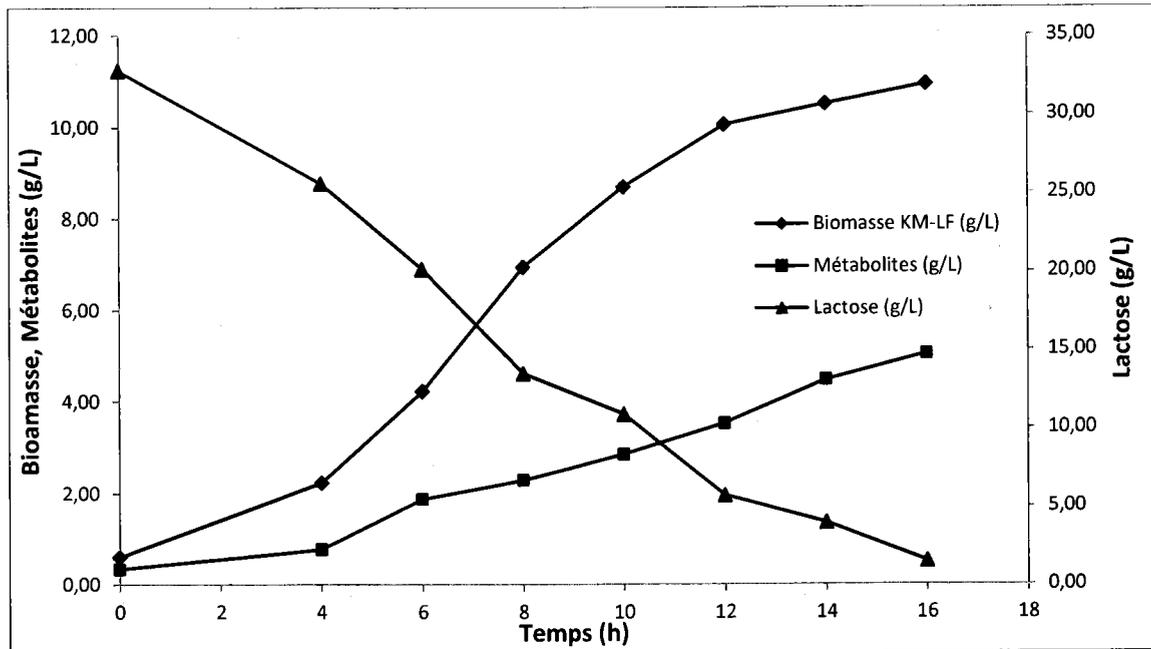
\*\* Rendement de conversion dans le cas où le coefficient de maintenance est nul, tel que décrit par Pirt (1975).

(a) taux de consommation spécifique du lactose  $q_s = \mu_{max} / Y_{x/lactose}$

(b) taux de production spécifique de métabolites  $q_m = Y_{métab/lactose} \times q_s$

*b- Cinétiques de croissance et de production de métabolites du couple KM-LF :*

La Figure 19 illustre les cinétiques de production de biomasse, de dégradation du lactose et de production de métabolites d'une co-culture de KM-LF sur le perméat de lactosérum (PLS). La production de biomasse entame sa phase exponentielle à partir de 4h de fermentation pour atteindre une valeur finale de 10.94 g/L, avec une productivité de 1.01 g/L.h et un rendement de conversion du lactose  $Y_{x/lactose}$  de 0.36 g/g (Tableau 24). Le lactose est dégradé à un taux de 2.20 g/L.h, équivalent à celui observé lors de la culture de KM sur le même substrat. D'après la Figure 19, la production de métabolites a commencé dès le début de la fermentation d'une manière croissante pour atteindre un maximum de 5.02 g/L, avec une productivité de 0.34 g/L.h. En comparant les productivités de production de biomasse et celles de la consommation du lactose, il ne semble pas y avoir de différences significatives entre la culture pure de KM et la co-culture de KM-LF (Tableau 24). Cependant, la présence du lactobacille dans la culture semble avoir un effet notable sur la production de métabolites puisque la productivité en métabolites a augmenté de 32 %. En fin de fermentation, le rendement de conversion du lactose en métabolites ( $Y_{métab/lactose}$ ) est de 0.14 g/g. Ce rendement a augmenté de 28 % en faveur de la co-culture KM-LF. La présence du lactobacille dans la culture ne semble donc pas avoir d'effet sur la production en biomasse mais contribuerait plutôt à fournir plus de métabolites, potentielles sources de carbone pour les levures, via la conversion du lactose en composés tels que l'acide lactique.



**Figure 19- Cinétiques de production de biomasse, de consommation de lactose et de production de métabolites par la co-culture KM-LF cultivée sur le PLS. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM**

Tel que décrit par Pirt (1975), le coefficient de maintenance  $m$  ( $\text{g}_{\text{lactose}}/\text{g}_{\text{biomasse}}\cdot\text{h}$ ) permet d'estimer la quantité de substrat dédiée aux besoins de maintenance au niveau cellulaire (Figure 20). En général, l'énergie de maintenance utilisée par la cellule implique des processus métaboliques tels que le renouvellement des macromolécules dénaturées, le maintien de l'équilibre osmotique et de l'homéostasie cellulaire en général (Pirt, 1975, Verduyn, 1991). Le coefficient  $m$  pour la culture KM-LF est 8 fois plus élevé que celui de la culture KM (Tableau 24). Des auteurs tels que Leão et Van Uden (1986) et Cássio et al. (1987) ont montré que certains acides carboxyliques (acides lactique, pyruvique et propionique), sous leur forme non dissociée, diffusaient de manière passive à travers la membrane cellulaire des levures *S. cerevisiae* et *C. utilis*. Une fois à l'intérieur de la cellule, les acides ont tendance à se dissocier étant donné le pH relativement élevé du cytosol. La conséquence de cette dissociation est l'accumulation de protons à l'intérieur de la cellule qui engendre la chute du pH intracellulaire et la dégradation du  $\Delta\text{pH}$  de part et d'autre de la membrane cellulaire. Les cellules se trouvent donc obligées d'éliminer l'excès de protons à travers un processus de transport actif, nécessitant l'utilisation d'énergie sous forme d'ATP, afin de maintenir constant le gradient de pH de part et d'autre de la membrane cellulaire (Quintas *et al.*, 2005, Verduyn, 1991). Cette hypothèse

expliquerait donc l'augmentation du coefficient de maintenance obtenu lorsque le lactobacille est ajouté dans la culture en contribuant à convertir le lactose en acides organiques et plus particulièrement en acide lactique.

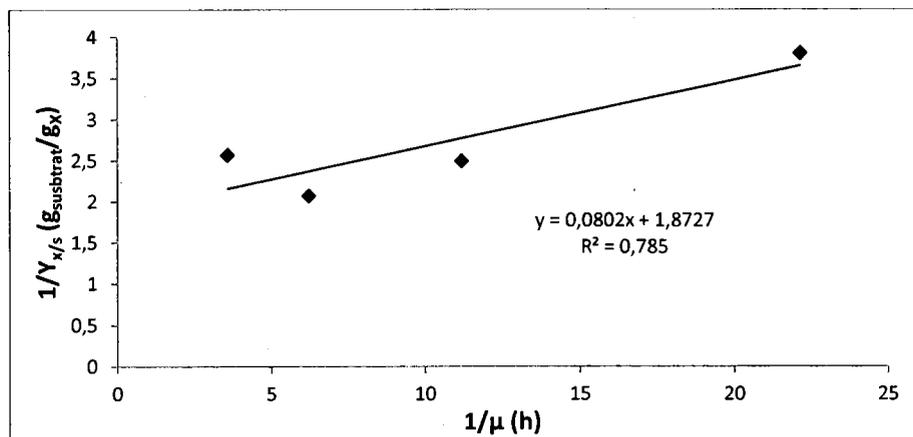


Figure 20- Détermination du coefficient de maintenance  $m$  (g/g.h) pour la culture KM-LF sur le PLS

### 7.2.2. Cinétiques de croissance de CU sur les substrats à base de métabolites de KM et KM-LF

La souche lactose-négative CU a été cultivée dans le surnageant des cultures de KM et KM-LF réalisées précédemment afin de suivre sa cinétique de croissance, en déterminant sa capacité à assimiler en totalité ou partiellement les métabolites produits au cours de ces cultures avec les souches lactose positives. Sur les graphiques illustrant les cinétiques de consommation des métabolites, figurent deux courbes faisant référence aux métabolites nets et aux métabolites totaux. Les métabolites nets représentent la fraction des composés produits par les cultures des souches lactose-positives. Les métabolites totaux représentent la totalité des composés quantifiés dans le milieu au moment de l'inoculation de CU. Ils représentent la somme des métabolites nets, des métabolites provenant du substrat de départ ainsi que ceux apportés par la pré-culture de CU. Les calculs des rendements de conversion des métabolites en biomasse et de leurs taux de consommation sont basés sur les concentrations des métabolites totaux.

#### a- Cinétique de croissance de CU sur le substrat à base de métabolites produits par KM :

Les résultats de la fermentation de CU sur le surnageant de KM sont illustrés dans la Figure 21. La biomasse de CU, inoculée à 0.5 g/L, montre une courbe de croissance typique d'une culture en batch, sans l'occurrence d'une phase de latence apparente. La levure semble donc capable

d'assimiler les métabolites présents dans le milieu réactionnel puisque, après les 10 premières heures de fermentation, la production de biomasse atteint une valeur maximale de 3.15 g/L avec une productivité de 0.39 g/L.h (Tableau 25). Le décompte cellulaire effectué a permis de vérifier que la culture était exempte de contamination. Celui-ci est passé de  $6.95 \times 10^6$  UFC/mL à l'inoculation à  $2.90 \times 10^8$  UFC/mL avec un taux de croissance spécifique  $\mu_{max}$  de  $0.48 \text{ h}^{-1}$ . En parallèle, la concentration de métabolites totaux, initialement à 4.64 g/L, a diminué rapidement, sans latence préalable, jusqu'à leur déplétion à  $t = 12\text{h}$ . Le taux de dégradation des métabolites a été évalué à  $0.52 \text{ g/L.h}$ . L'épuisement des métabolites dans le milieu a induit l'entame de la phase stationnaire par la souche. Le rendement de conversion du substrat en biomasse ( $Y_{x/métab}$ ) a été de  $0.56 \text{ g/g}$ .

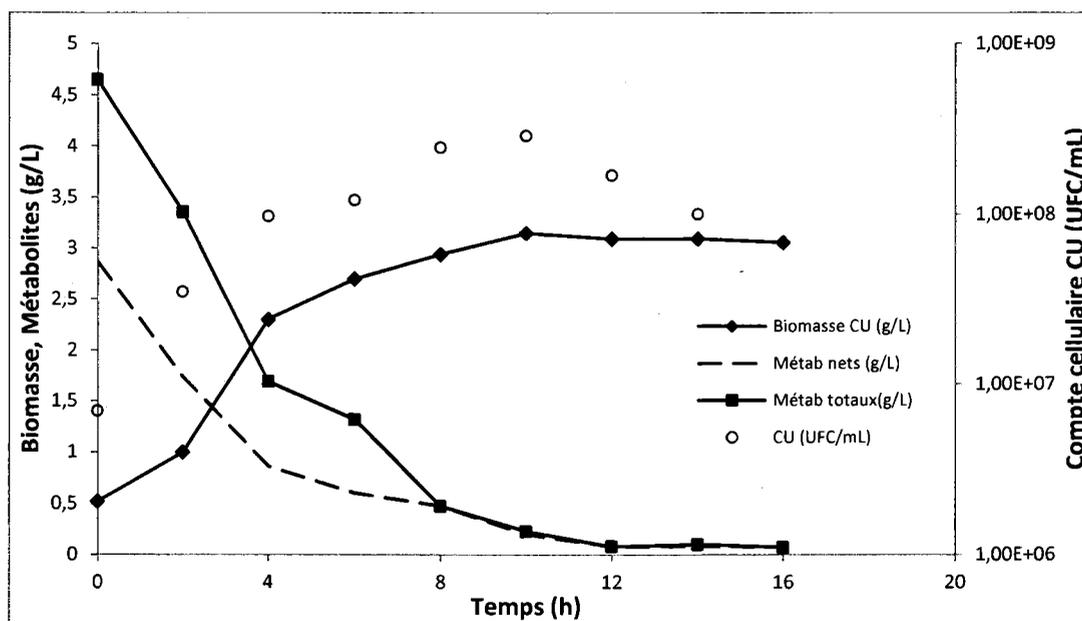


Figure 21- Cinétiques de production de biomasse de CU et de consommation de métabolites produits par KM  
Conditions :  $T=34.8^\circ\text{C}$ ;  $[\text{lactose}]=35\text{g/L}$ ; Aération=1 vvm; agitation=400-750 RPM

**Tableau 25- Cinétiques de croissance de CU cultivée sur les métabolites des souches lactose-positives**

Paramètres cinétiques	Unités	CU (métabolites KM)	CU (métabolites KM-LF)	CU (métabolites LF)	KM (métabolites LF)
Rendement en biomasse ( $Y_{x/métab}$ ) <sup>*</sup>	g <sub>x</sub> /g <sub>métab</sub>	0.56	0.56	0.66	0.32 <sup>**</sup>
Biomasse max ( $X_{max}$ )	g/L	3.15	3.94	5.60	13.75
$\mu_{max}$	h <sup>-1</sup>	0.48	0.47	0.84	0.78
Productivité en biomasse ( $P_x$ )	g/L.h	0.39	0.60	1.07	2.13
Productivité consommation métabolites ( $P_{cm}$ )	g/L.h	0.52	1.11	1.45	1.37

\* Ce rendement est calculé comme suit :  $Y_{x/métab} = (X_f - X_0) / (\text{Métab}_0 - \text{Métab}_f)$

\*\* Ce rendement est calculé comme suit :  $Y_{x/métab} = (X_f - X_0) / [(\text{Lactose}_0 - \text{Lactose}_f) + (\text{Métab}_0 - \text{Métab}_f)]$

*b- Cinétique de croissance de CU sur le substrat à base de métabolites produits par KM-LF :*

La culture de CU sur le substrat à base de métabolites issus de KM-LF (Figure 22) a montré une production de biomasse équivalente à 3.94 g/L. Le rendement de conversion du substrat en biomasse ( $Y_{x/métab}$ ) est de 0.56 g/g, identique à celui obtenu avec la culture sur les métabolites de KM. Cependant, la productivité en biomasse obtenue avec cette culture est de 52% plus élevée que celle calculée avec la culture dans le surnageant de KM, d'où l'atteinte du plateau maximal de biomasse en 6h de fermentation par rapport à 10h pour la première culture. D'autre part, le taux de dégradation des métabolites dans cette culture est 2 fois plus élevé que celui des métabolites de la culture de KM (Tableau 25). Les hypothèses pouvant appuyer ces observations seraient que (i) la prolifération de LF dans la culture apporte des métabolites plus facilement assimilables par CU par rapport à ceux largués par KM; (ii) la présence du lactobacille modifierait le comportement métabolique de la levure KM engendrant un changement dans le profil des métabolites produits; (iii) il existerait une synergie entre les composés produits conjointement par KM et LF qui stimulerait la croissance de CU ou encore (iv) la présence

possible d'un contaminant dans la culture de CU. Le décompte cellulaire montre que la culture de CU est pure tout au long de la fermentation. Cette observation permet donc de rejeter l'hypothèse de la contamination du milieu par une autre souche. Afin de pousser l'investigation sur le rôle du lactobacille, une culture de CU sur le surnageant d'une culture de LF, dans les mêmes conditions que les précédentes cultures, a été effectuée. Les résultats sont rapportés dans la section suivante.

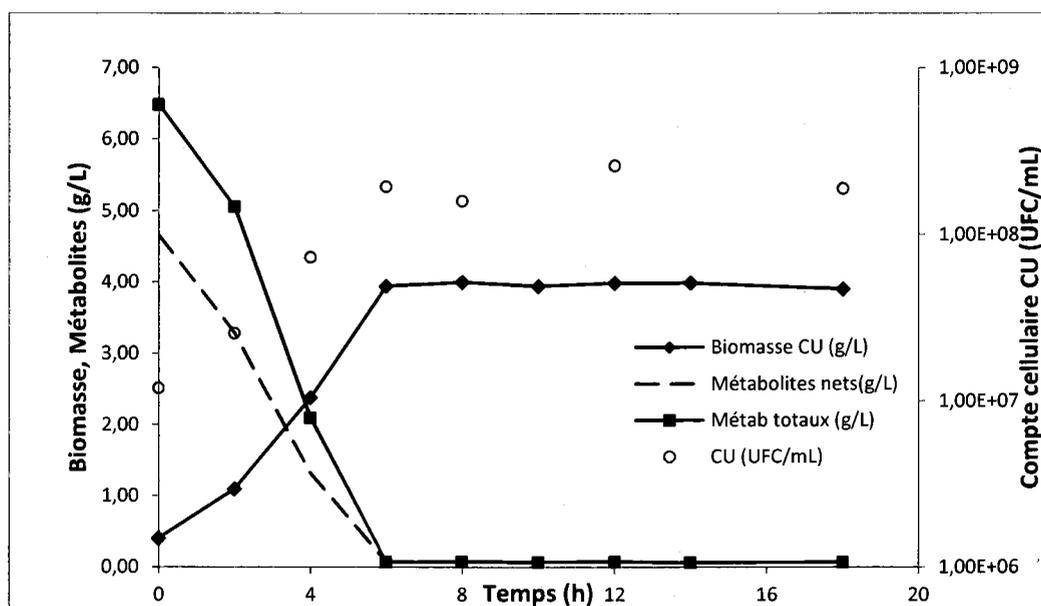


Figure 22- Cinétiques de production de biomasse de CU et de consommation des métabolites produits par KM-LF. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

*c- Cinétique de croissance de CU sur le substrat à base de métabolites produits par LF :*

Les cinétiques de production de biomasse et de consommation des métabolites de cette culture sont illustrées dans la Figure 23. Après une latence de 2 h, la souche CU entame une phase exponentielle de croissance durant laquelle le compte cellulaire passe de  $10^7$  UFC/mL à  $2,9 \times 10^8$  UFC/mL, avec un taux spécifique de croissance de  $0,84 \text{ h}^{-1}$ . En termes de masse sèche, la biomasse atteint un maximum de 5.6 g/L avec une productivité de 1.07 g/L.h. Les métabolites ont été consommés à un taux de 1.45 g/L.h, le plus élevé des trois cultures de CU. Le rendement de conversion des métabolites en biomasse est estimé à 0.66 g/g. Il est de 17 % plus élevé que les rendements respectifs de la culture sur KM et KM-LF.

Après 6 h de fermentation, l'atteinte d'un plateau dans la croissance cellulaire coïncide avec l'épuisement du substrat, représenté par les métabolites produits par LF. Cette observation est aussi valable pour les deux cultures précédentes de CU (Figures 21 et 22). Ceci démontre que les composés analysés au cours de cette étude semblent être parfaitement représentatifs de l'ensemble des composés susceptibles de se retrouver dans la culture et pouvant servir de source de carbone pour CU. En d'autres termes, l'analyse chromatographique effectuée sur les acides organiques et les glucides des cultures semble englober tous les composés servant de substrats limitants pour les cultures de CU. Ainsi, à la lumière des rendements obtenus, il est possible de conclure que les composés libérés par LF au cours de la culture semblent représenter des substrats de meilleure qualité pour CU par rapport à ceux produits par les cultures de KM et KM-LF. Ceci viendrait corroborer l'hypothèse qu'une co-culture de KM et LF produirait des sources de carbone et d'énergie plus rentables que ceux produits par KM seule. Cependant, une étude détaillée, composé par composé, des métabolites produits et consommés permettra de donner plus d'éclaircissement sur le type d'interactions régissant le consortium KM-LF-CU.

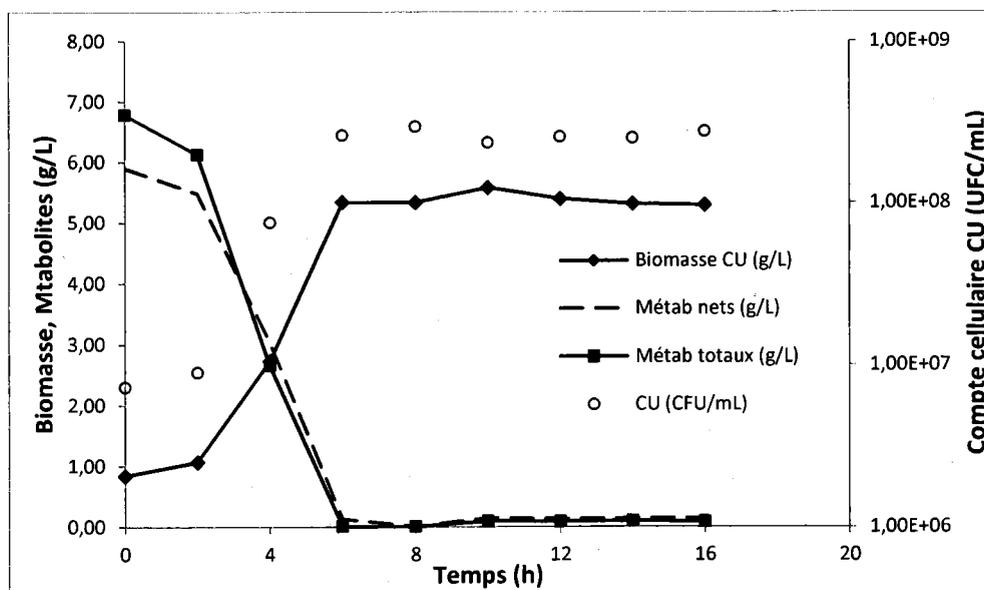


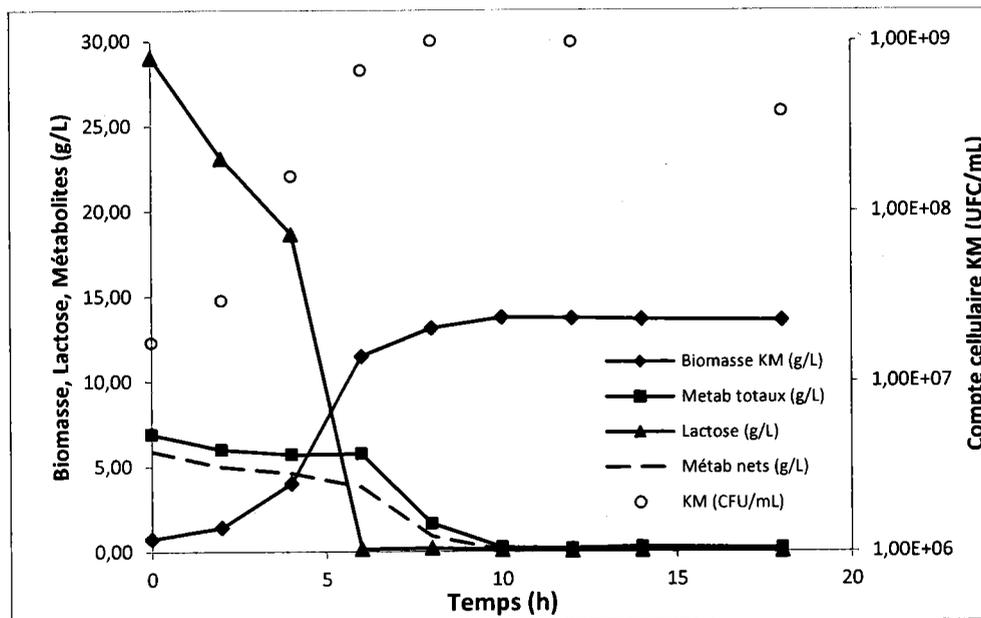
Figure 23- Cinétiques de production de biomasse de CU et de consommation de métabolites produits par LF.

Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

### 7.2.3. Cinétique de croissance de KM cultivée sur les métabolites produits par LF

La réalisation d'une co-culture KM-LF sur le perméat de lactosérum a permis de noter des différences significatives au niveau de la production de métabolites (rendement de conversion du lactose en métabolites et productivité en métabolites) par rapport à la culture de KM. Dans l'optique de mieux comprendre le comportement métabolique de KM co-cultivée avec LF, une étude de la cinétique de croissance de KM cultivée sur un substrat à base de métabolites de LF a été effectuée. La Figure 24 illustre l'évolution des paramètres de la production de biomasse et de la consommation des métabolites par la souche KM cultivée sur les métabolites de LF. La biomasse produite par KM atteint un maximum de 13.75 g/L après 10h de fermentation. Au cours de cette période, le compte cellulaire de KM passe de  $1.70 \times 10^7$  UFC/mL à  $1 \times 10^9$  UFC/mL, avec un taux de croissance spécifique de  $0.78 \text{ h}^{-1}$  (Tableau 25). En parallèle, il est possible de distinguer deux phases en ce qui concerne la consommation du substrat. La première phase, débutant dès l'inoculation de KM, est caractérisée par la consommation du lactose résiduel dans le milieu. Durant cette phase, la concentration demeurée constante des métabolites présents dans le milieu montre que la souche KM dégrade exclusivement le lactose avec un taux de 4.55 g/L.h. Dès que le lactose est épuisé, KM entame une seconde phase durant laquelle elle dégrade les métabolites provenant de la culture de LF à taux de 1.37 g/L.h. La fin de cette seconde phase se traduit par la consommation complète des métabolites engendrant l'entame de la phase stationnaire de croissance. Ainsi, il a été constaté que KM était capable de puiser la source de carbone et d'énergie nécessaires à sa croissance dans deux différents types de substrat. En effet, la souche dégrade au départ le lactose résiduel sans se tourner vers les métabolites, dont l'acide lactique, présents dans la culture. Une fois le lactose complètement épuisé, la souche se tourne sans délai apparent vers les métabolites afin de s'y approvisionner en carbone et en énergie. D'après l'aspect des courbes de cinétiques (Figure 24), il ne semble pas y avoir de latence marquant le passage de la consommation du lactose vers celle des métabolites. Ceci signifierait que KM possède la machinerie enzymatique nécessaire lui permettant d'orienter le flux de métabolites rentrant vers une voie métabolique de production d'énergie ou encore que l'adaptation aux nouveaux substrats se serait produite au cours de la phase finale de la dégradation du lactose, juste avant sa déplétion. Un phénomène similaire a été rapporté par Fonseca et al. (2007) lors de l'étude de la production de métabolites par la souche *K. marxianus*

ATCC 26548, où il a été montré que la souche entamait la consommation de l'acétate, produit en cours de fermentation, avant l'épuisement total du glucose du milieu. Cependant, lors du passage de la consommation du lactose vers celle des métabolites, un ralentissement dans la phase exponentielle de croissance observable sur les courbes du nombre de cellules et de la biomasse a été constaté (Figure 24). Ceci serait dû au fait que la dégradation des métabolites serait moins efficace du point de vue énergétique que celle du lactose. Un manque dans un élément nutritionnel tel que l'azote ou les oligo-éléments pourrait aussi être la cause de ce ralentissement. En se basant sur le fait que KM utilise deux types de substrat pour croître, un rendement de conversion global estimé à 0.32 g/g est atteint en fin de fermentation.



**Figure 24- Cinétiques de croissance de KM cultivée sur un substrat à base de métabolites de LF.** Le lactose contenu dans le surnageant au départ de la fermentation provient de la culture précédente. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

#### 7.2.4. Identification des métabolites et étude de leurs cinétiques de production et de consommation

##### a- Teneur en métabolites du perméat de lactosérum :

L'analyse chromatographique a permis d'identifier et de quantifier les composés organiques contenus dans le substrat de départ (Tableau 26). D'après l'analyse effectuée, le perméat de lactosérum utilisé pour cette étude contient essentiellement des glucides (92 % des composés organiques totaux) dont le principal composant est le lactose (99.8 %). La concentration globale des acides organiques dans le substrat ne dépasse pas  $1.57 \pm 0.2$  g/L. Ce groupe de composés est constitué en majeure partie par les acides maléique et citrique. Ainsi, il est possible de considérer que la source de carbone principale dans le perméat de lactosérum est constituée par le lactose.

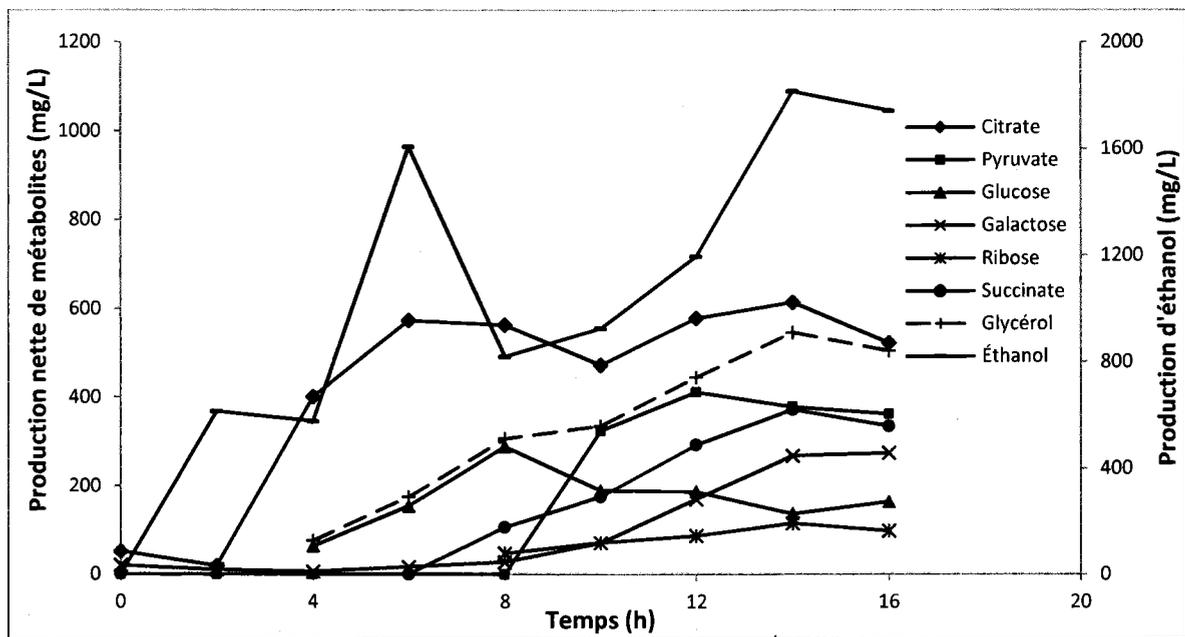
Tableau 26- Composition du perméat de lactosérum en glucides et en acides organiques

Composé	Concentration (g/L)
Maléate	$0.57 \pm 0.04$
Lactose	$33.81 \pm 3.55$
Citrate	$0.54 \pm 0.19$
Glucose	0.00
Galactose	$0.06 \pm 0.00$
Lactate	$0.27 \pm 0.02$
Acétate	$0.07 \pm 0.05$
Propionate	$0.10 \pm 0.03$
Isovalérate	$0.07 \pm 0.01$

##### b- Cinétique de production des métabolites par la souche KM :

La Figure 25 illustre la cinétique de production des métabolites au cours de la fermentation du perméat de lactosérum par KM. Il est à noter que, pour un composé donné, les quantités rapportées dans les graphiques représentent des concentrations nettes, ne prenant pas en compte

la fraction du composé contenue dans le substrat avant inoculation ou provenant de la pré-culture. Huit principaux composés, deux glucides, quatre acides organiques, un alcool et un polyol, ont été identifiés au cours de cette fermentation. Le composé majoritaire produit au cours de cette culture est l'éthanol. En effet, la concentration de ce composé, détecté dès les 2 premières heures de fermentation (600 mg/L), atteint un pic à 1600 mg/L après 6 h de fermentation (Figure 25). La concentration d'éthanol a ensuite baissé à 820 mg/L pour ensuite augmenter progressivement et atteindre un maximum de 1820 mg/L après 14h de fermentation, ce qui correspond à un taux de conversion final de 52.61 mg/g lactose (Tableau 27). Entre 6 et 8h de fermentation, une augmentation des paramètres d'agitation et d'aération a été nécessaire afin d'assurer un apport d'oxygène dissout adéquat à la culture durant sa phase exponentielle de croissance. En effet, les taux d'aération et d'agitation sont passés de 0.75 vvm et 500 rpm à 1.2vvm et 700 rpm, respectivement. Cette augmentation aurait provoqué l'entraînement de l'éthanol dans l'effluent gazeux de sortie sous l'effet de l'incorporation d'air ce qui expliquerait la baisse de sa concentration dans le milieu dans la période entre 6 h et 8 h. Un retour vers des conditions d'oxygénation moins intenses aurait ralenti le phénomène de *stripping* de l'éthanol, d'où son accumulation jusqu'à la fin de la fermentation. Malgré la caractéristique physiologique de KM à résister à la répression catabolique (ou effet *Crabtree*), l'éthanol est produit même dans des conditions de culture en aérobiose. L'hypothèse pouvant être avancée pour expliquer ce phénomène serait que la production d'éthanol soit tributaire de la teneur en oxygène dissout au cours des cultures non soumises à une limitation par le carbone. En effet, il a été démontré que, dans une culture en batch de la souche KM ATCC26548 sur un milieu synthétique à 20 g/L de glucose, la fermentation alcoolique a été déclenchée à des teneurs en oxygène dissout (OD) aux alentours de 80% de saturation. La concentration d'éthanol a ensuite augmenté en fonction de la concentration en oxygène dissout dans la culture (50 mg/L à 80% < OD < 100%, 330 mg/L à OD ≤ 60% et 1090 mg/L à OD ≤ 40%). Ce phénomène n'a pas été observé dans les cultures à 10 g/L de glucose (Fonseca *et al.*, 2013). Ceci expliquerait donc le pic d'éthanol observé à  $t=6h$  (Figure 25) où la concentration d'oxygène dissout ne dépasse pas 20 % de saturation. Le profil de vitesse d'agitation ainsi que les paramètres OTR, OUR et  $K_{La}$  de cette culture sont représentés dans la Figure 33 de l'Annexe 5.



**Figure 25- Cinétique de production des métabolites par KM cultivée sur le PLS.** Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

La culture de KM a produit du glycérol, détectable à la 4<sup>ème</sup> heure de fermentation à une concentration maximale de 0.55 g/L qui correspond à un taux de conversion de 15.83 mg/g lactosé (Tableau 27). Le glycérol est un composé jouant un rôle essentiel dans le mécanisme de résistance de la levure à l'augmentation de la pression osmotique dans le milieu extracellulaire afin de la préserver de la déshydratation (osmorégulation) (Blomberg & Adler, 1989). L'étude de Fonseca et al. (2013) a montré que le glycérol était produit à une concentration de 0.1 g/L (5 mg/g substrat) dans une culture en milieu synthétique à 20 g/L de glucose. La teneur obtenue dans la présente étude est environ 5 fois plus élevée et serait possiblement due à une pression osmotique plus importante imposée par une concentration plus élevée de lactose et de minéraux dont la teneur augmente avec l'ajout du sulfate d'ammonium comme source d'azote. De même, les neutralisants (NaOH et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ajoutés pour ajuster le pH contribuent à augmenter la pression osmotique dans le milieu par la libération d'ions Na<sup>+</sup> et SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> après la neutralisation. En général, le mécanisme d'osmorégulation implique que la levure induise la production de glycérol dans le cytosol et gère ensuite son flux entrant et sortant à travers la membrane cellulaire en fonction de la pression osmotique. Dans des conditions de stress osmotique important, les canaux membranaires de transport du glycérol se bloquent afin de maintenir le glycérol à l'intérieur de la

cellule équilibrant ainsi la pression de part et d'autre de la membrane (Wang *et al.*, 2001). Dans le cas de la culture de KM, le glycérol extracellulaire a été détecté aux alentours de 4h de fermentation pour atteindre sa teneur maximale durant la phase stationnaire de croissance, à  $t=14h$ . La concentration croissante de glycérol dans le milieu pourrait s'expliquer par l'avènement d'un phénomène d'autolyse des cellules durant la phase stationnaire provoquant ainsi sa libération dans l'environnement de la culture. Par ailleurs, la production de glycérol pourrait être associée à celle de l'éthanol au cours de la phase fermentaire de la culture (Groleau *et al.*, 1995).

Les acides organiques produits au cours de cette culture sont, dans un ordre décroissant de concentration, l'acide citrique, l'acide pyruvique et l'acide succinique (Tableau 27). L'acide citrique, détecté après 4h de fermentation, est le composé majoritaire parmi les acides organiques avec un taux de 16.29 mg/g lactose. L'acide succinique et l'acide pyruvique sont détectés à partir de 8h et 10h de fermentation, respectivement, et sont produits à raison de 10.78 mg/g lactose et 12.15 mg/g lactose, respectivement (Tableau 27). Dans la littérature, l'étude menée par Fonseca *et al* (2007) a montré que KM ATCC 26548 produisait principalement de l'acétate, du pyruvate, de l'oxoglutarate ainsi que de faibles quantités de succinate. Les concentrations produites sont variables et dépendent principalement du mode de culture adopté (batch ou continu) ainsi que de la concentration de substrat au départ de la fermentation. Dans le cas de notre souche KM, la production d'acétate n'a pas été détectée. Par contre, le citrate représente l'acide organique majoritaire. Fonseca *et al.* (2007) rapportent que le succinate est détecté à l'état de trace tandis que le succinate et le pyruvate sont produits à concentration presque égale dans la présente culture. Les variations physiologiques intraspécifiques sont une caractéristique reconnue pour l'espèce *Kluyveromyces marxianus*. En effet, il a été montré que KM est une espèce exhibant des variations phénotypiques importantes nécessitant l'étude détaillée de chaque souche afin d'en déterminer les traits physiologiques et d'identifier plus précisément les voies métaboliques impliquées en fonction des conditions environnementales de culture. La classification de la levure KM parmi les levures résistantes à la répression catabolique (*Crabtree* négatives) représente l'exemple typique pour mettre en évidence les variations physiologiques au sein de l'espèce. En effet, les études comparatives de la physiologie de différentes souches de KM ont montré une importante variabilité en termes de déclenchement du métabolisme fermentaire aboutissant à la production d'éthanol sous des conditions d'aérobiose (Lane *et al.*, 2011, Rocha

et al., 2011). Il est de ce fait plus approprié de nuancer par rapport à l'appartenance de la souche KM au groupe des *Crabtree* négatives que d'admettre cette appartenance sans procéder à la qualification de la souche qui reviendrait à évaluer un degré de résistance à la répression catabolique (non-production ou production plus ou moins importante). Pour plus de détails, il est possible de se référer aux revues de Fonseca et al. (2008) et Lane et Morrissey (2010) ainsi qu'à l'étude de Rocha et al. (2011) et Lane et al. (2011).

c- Cinétique de production des métabolites par la co-culture KM-LF :

La production de métabolites par la co-culture de KM-LF sur le perméat de lactosérum est décrite par la Figure 26. Les composés majoritaires produits au cours de cette culture sont l'acide lactique et l'éthanol. À la fin de la fermentation, une quantité globale de 2880 mg/L d'acide lactique a été produite avec une productivité de 250 mg/L.h. Durant la culture de KM seule dans les mêmes conditions, aucune production d'acide lactique n'a été détectée au cours de la fermentation. La détection de 92.10 mg/g lactose montre que le lactobacille est responsable de la conversion d'une fraction du lactose en acide lactique (Tableau 27).

La cinétique de production de l'éthanol dans cette culture affiche une tendance très similaire à celle observée lors de la culture de KM, à l'exception que les quantités produites sont moins importantes. En effet, la production d'éthanol a été détectée à la 4<sup>ème</sup> heure de fermentation et a atteint un pic à  $t=6$  h. La teneur en éthanol enregistre ensuite une baisse entre 6 h et 10 h. Celle-ci augmente ensuite pour atteindre une quantité maximale correspondant à 26.08 mg/g lactose en fin de fermentation (Tableau 27). Cette quantité est moitié moins importante que celle obtenue avec la culture de KM seule (52.61 mg/g lactose). Les raisons de cette différence pourraient être reliées à des variations dans le comportement physiologique de KM pouvant survenir en fonction du niveau de transfert d'oxygène dans la culture. En effet, au cours de cette fermentation, le taux d'OD minimal atteint à  $t=6$ h a été de 45 % de saturation contre 20 % pour la culture de KM seule. Ceci aurait engendré un degré de limitation moins important en oxygène dans la culture d'où un balancement du métabolisme vers la voie oxydative au dépend de la voie fermentaire responsable de la production d'alcool. Ces variations dans le comportement physiologique de KM dans la co-culture pourraient également être à l'origine des variations dans les quantités de métabolites produits ainsi que dans leur composition. Cette différence est très notable pour le groupe des acides organiques puisque le pyruvate, le citrate et le succinate qui constituaient le

bouquet de la culture de KM sont indétectables au cours de la co-culture KM-LF. Le glycérol a été dosé à une quantité de 12.35 mg/g lactose, proche de celle estimée pour la culture de KM seule (15.83 mg/g lactose). L'hypothèse que ce composé soit produit par la culture serait aussi reliée à la fonction d'osmorégulation enclenchée par la levure dans des conditions de culture imposant une pression osmotique considérable. Des composés minoritaires tels que l'oxalate, l'acide adipique ou le ribose ont été détectés au cours de la co-culture KM-LF.

Une culture de LF sur le perméat de lactosérum dans les conditions de fermentation décrites dans ce chapitre a été effectuée afin de caractériser les métabolites produits par le lactobacille. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 27. Le composé majeur produit au cours de cette culture est l'acide lactique. En effet, une teneur équivalente à un taux de conversion de 571.30 mg/g lactose a été produite avec une productivité de 302 mg/L.h. La quantité d'acide lactique produite est environ 6 fois plus élevée que celle dosée dans la co-culture KM-LF en termes de mg par g lactose. D'autre part, des traces d'acide adipique et d'acétate ont été détectées lors de cette fermentation.

Il est très difficile de prédire le comportement physiologique de la culture mixte en raison du degré de complexité important du métabolisme microbien et de la nature des interactions régissant la relation entre les deux souches KM et LF. Certaines études stipulent qu'une culture de *Kluyveromyces* sp. avec des bactéries lactiques permettrait de fournir à ces dernières des éléments nutritionnels, tels que les vitamines et les acides aminés, essentiels à leur croissance. En contrepartie, les acides organiques, et particulièrement l'acide lactique, produits par les bactéries lactiques serviraient de source de carbone alternative aux levures (Plessas *et al.*, 2008). Dans le cas de notre culture, une consommation d'une fraction de l'acide lactique par KM, simultanément avec le lactose, couplée ou non à un taux de conversion du lactose en acide lactique plus faible par rapport à une culture pure de LF, seraient des hypothèses qui pourraient expliquer la différence entre les taux de conversion en acide lactique observée entre les deux cultures. Une étude de la consommation des métabolites de LF par la souche KM présentée dans la section suivante de ce chapitre devrait permettre de mieux comprendre la relation entre les deux espèces.

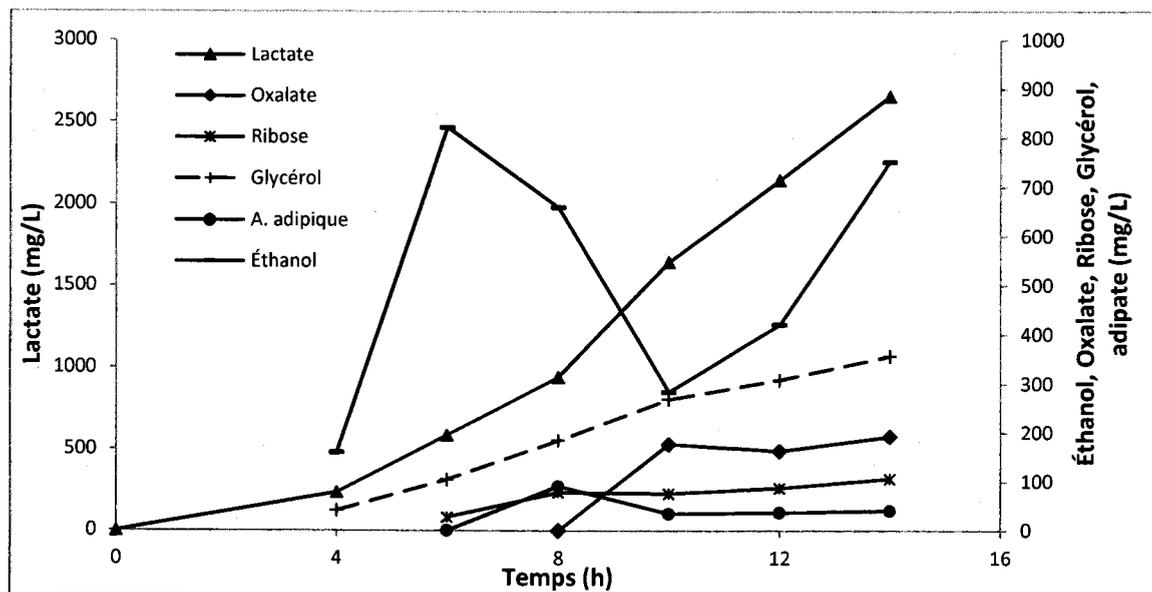


Figure 26- Cinétique des métabolites produits par le couple KM-LF cultivé sur PLS. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

d- Cinétique de consommation des métabolites de LF par la souche KM :

La Figure 27 illustre l'évolution de la concentration des métabolites ainsi que du lactose résiduel issus de la culture de LF dans le perméat de lactosérum. Le substrat de départ de la culture est composé principalement de lactose, d'acide lactique, d'acide maléique, d'acide acétique et d'acide adipique. La cinétique de dégradation de ces composés pourrait être divisée en deux phases successives. La première phase commence à l'inoculation et s'échelonne sur les six premières heures de fermentation. Au cours de celle-ci, KM entame la consommation des principales sources de carbone, le lactose et l'acide lactique, simultanément. Le taux de consommation du lactose étant plus élevé que celui de l'acide lactique fait que le premier est épuisé après 6h alors que la déplétion du second s'achève plus tard. Au cours de cette phase, des composés mineurs tels que l'acide maléique, provenant du perméat de lactosérum, et l'acide adipique sont épuisés complètement au bout de 6h de fermentation. Le fait que la souche soit capable de consommer certains acides organiques en même temps que le lactose montre à priori que les voies de transport et d'assimilation de ces composés ne semblent pas être soumises à un phénomène de répression catabolique imposé par le lactose. Ce phénomène a pourtant été observé pour *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* IGC3014 pour laquelle l'absorption d'acide lactique est inductible et sujette à une répression par le glucose ce qui engendre un profil

de croissance diauxique où l'acide lactique n'est transporté et assimilé par la cellule qu'après la levée de la répression (Fonseca *et al.*, 1991). Par ailleurs, notre culture de KM a engendré une production d'éthanol (1200 mg/L) et de glycérol (475 mg/L) observée à  $t=6h$ .

La seconde phase caractérisant la consommation des métabolites dans cette culture débute à la 6<sup>ème</sup> heure de fermentation, lorsque le lactose est complètement disparu. Au cours de cette phase, le taux de consommation de l'acide lactique a augmenté pour passer de 0.31 g/L.h durant la phase 1 à 0.88 g/L.h durant la phase 2, d'où une augmentation d'environ 3 fois (Tableau 28). L'acide lactique est complètement dégradé après 10h de fermentation. En parallèle, l'épuisement du lactose résiduel a initié la consommation de l'éthanol et du glycérol issus de la conversion du lactose au cours de la première phase. La différence entre l'assimilation de ces deux composés et celle de l'acide lactique serait que les voies métaboliques d'assimilation de l'éthanol et du glycérol seraient soumises à la répression catabolique. Ce constat confirme la propriété de KM à exhiber un profil de croissance diauxique. Dès la rupture de la source de carbone principale, la souche se tourne vers la consommation de métabolites produits afin de gérer le flux glycolytique entrant dans la cellule (Beausejour *et al.*, 1981, Castrillo & Ugalde, 1993, Moresi & Sebastiani, 1979).

Cette fermentation a permis de confirmer certaines caractéristiques physiologiques de la souche KM. En effet, sa capacité à dégrader plusieurs types de composés tels que les glucides, les acides organiques ou les alcools (Fonseca *et al.*, 2008), en sollicitant différentes voies métaboliques d'assimilation soumises ou non à une répression catabolique, confère à cette souche la faculté de s'adapter à une culture où plusieurs substrats provenant de la conversion d'une source de carbone principale peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie.

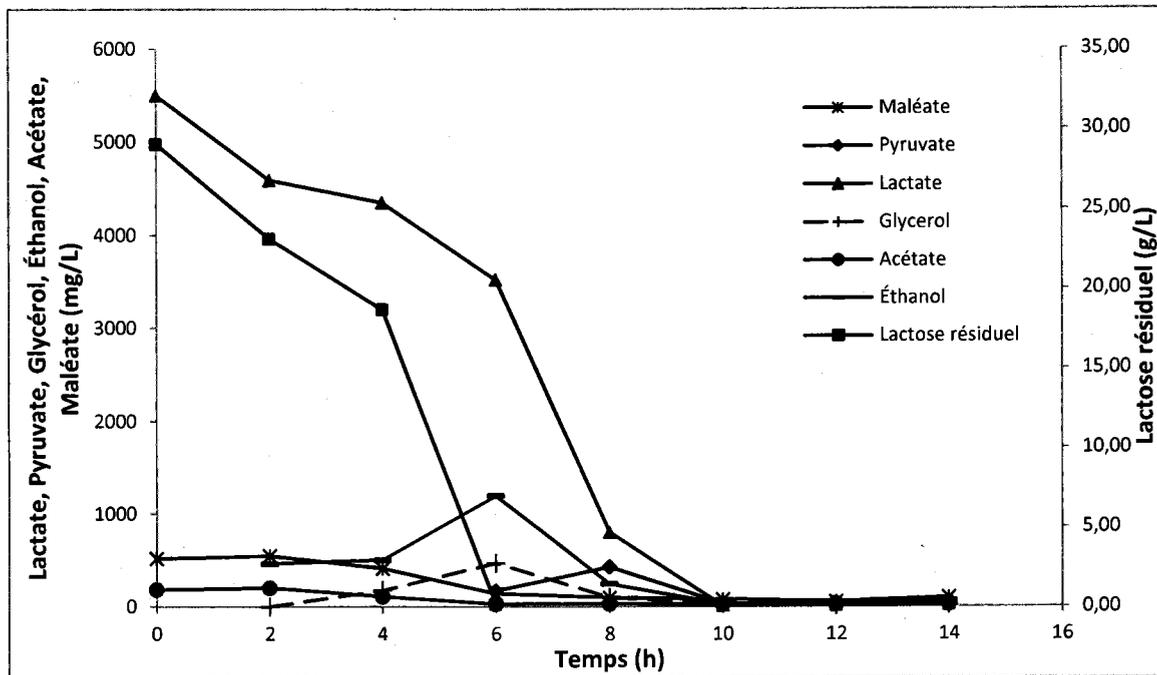


Figure 27- Cinétiques de consommation du lactose et des métabolites de LF par KM. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

**Tableau 27- Taux de conversion du lactose en métabolites dans les cultures de souches lactose-positives (mg/g lactose)**

Culture	Citrate	Pyruvate	Lactate	Succinate	Acétate	Oxalate	Glucose	Galactose	Ribose	Glycérol	Éthanol	Adipate
KM	16.29	12.15	0	10.78	0	0	3.87	6.99	3.36	15.83	52.61	0
KM-LF	0	1.22	92.10	0	0	6.68	0	0	3.68	12.35	26.08	0
LF	0	0	571.30	0	14.98	0	0	0	0	0	0	13.88

**Tableau 28- Taux de consommation des métabolites (g/L.h)**

Culture	Productivités de consommation des métabolites (g/L.h)
KM sur LF	$P_{\text{lactate}} = 0.88 (0.31)$
CU sur KM	$P_{\text{citrate}} = 0.11 (0.03)$ $P_{\text{pyruvate}} = 0.09$ $P_{\text{succinate}} = 0.04$ $P_{\text{éthanol}} = 0.45$ $P_{\text{galactose}} = 0.05 (0.01)$
CU sur KM-LF	$P_{\text{lactate}} = 0.79$ $P_{\text{glycérol}} = 0.08$ $P_{\text{éthanol}} = 0.41$ $P_{\text{ribose}} = 0.01$
CU sur LF	$P_{\text{lactate}} = 1.15$

Les valeurs entre parenthèses représentent le taux de consommation du composé lorsque son transport et son assimilation sont soumis à un phénomène de répression.

*e- Cinétiques de consommation des métabolites de KM par la souche CU :*

L'identification et la quantification des métabolites de KM consommés par la souche lactose-négative CU sont illustrées dans la Figure 28. Au total, sept composés appartenant aux classes chimiques des acides organiques, des glucides et des alcools ont été détectés et suivis au cours de la fermentation. D'après la Figure 28, il est possible de répartir les composés analysés en deux groupes selon leur vitesse de dégradation. Le premier groupe rassemble les composés les plus rapides à être consommés (entre 0h et 6h), qui sont le glycérol, l'éthanol, le pyruvate et le glucose. Le glycérol, disponible dans le substrat de départ à une concentration de 513 mg/L, est rapidement consommé après 2h de culture. Durant les quatre premières heures de fermentation, l'éthanol est consommé à un taux de 0.45 g/L.h (Tableau 28). La vitesse de consommation ralentit ensuite entre 4h et 6h à l'approche de la déplétion du composé. Une estimation graphique montre que les vitesses de consommation du glycérol et de l'éthanol sont relativement identiques et sont légèrement plus élevées que celle du pyruvate qui est complètement consommé après 4h de fermentation à un taux de 0.09 g/L.h. Les composés les plus lents à être consommés tels que le galactose, le succinate et le citrate, forment le second groupe de composés ayant été utilisés par CU comme sources de carbone. Entre 0h et 6h, un faible taux de consommation de ces trois composés montre que l'affinité de CU par rapport à ceux-ci est très faible. Après la consommation complète des composés du premier groupe (glycérol, éthanol et pyruvate), les taux de dégradation des 3 composés du second groupe, et particulièrement celui du citrate, augmentent de façon appréciable.

Des études ont montré que *C. utilis* était capable d'utiliser des acides organiques tels que le lactate, l'acétate, le pyruvate, le succinate ou le citrate comme sources de carbone alternatives. Ces composés sont internalisés dans la cellule grâce à un système de transport impliquant deux types de mécanismes de transport. Un mécanisme actif de type symport à proton assure le transport de la forme ionisée de l'acide et un autre, passif, permet la diffusion simplifiée de la forme non dissociée à travers la membrane cellulaire. Le mécanisme de transport actif, possédant une affinité élevée vis-à-vis des acides, est inductible et est sujet à la répression catabolique. En effet, des cellules de *C. utilis* cultivées en présence d'éthanol et de glycérol comme sources de carbone n'étaient pas

capables d'exhiber une activité du transporteur de certains acides organiques (Cássio & Leão, 1991, Leão & Van Uden, 1986). Ceci expliquerait donc la faible affinité exhibée envers le citrate et le succinate en présence d'éthanol et de glycérol durant les 6 premières heures de fermentation. Le blocage des voies de transport du citrate et du succinate semble être levé simultanément après la déplétion de ces composés du milieu, ce qui a induit leur transport et leur consommation. Cependant, il n'est pas possible de parler d'un profil de croissance diauxique parce que, durant la première phase de la culture (0h – 6h), un faible taux de consommation du succinate a été observé. La répression ne serait donc pas complète mais plutôt partielle dans le sens où la fraction non dissociée du succinate emprunterait la voie passive de diffusion à faible affinité au moment du blocage de la voie active (Cássio & Leão, 1993). Le citrate a montré un taux de consommation plus faible que celui du succinate durant la première phase de la culture (0.03 g/L.h) (Tableau 28). Ceci est probablement dû au fait que la voie de diffusion simplifiée de ce composé est aussi sujette à la répression qu'exercerait l'éthanol et le glycérol tel que rapporté par Cássio et Leão (1991). Le pyruvate ne semble pas suivre le même cheminement métabolique que le citrate ou le succinate puisque ce dernier est consommé rapidement (au bout de 4h de fermentation), avant la déplétion de l'éthanol et du glycérol. Un mécanisme de transport non répressible et à affinité élevée caractériserait le pyruvate des autres acides organiques dont il est question ici.

Dans les levures, le galactose est assimilé via le cycle de Leloir ou cycle *GAL*. Cette voie implique une série d'enzymes permettant de transporter le galactose dans le cytosol via une galactose perméase et de l'activer en lui fixant un groupement phosphate sous l'action d'une galactokinase. Le galactose-1-phosphate est ensuite transformé en glucose-1-phosphate qui sera finalement converti en glucose-6-phosphate avant d'intégrer le cycle de la glycolyse pour générer de l'ATP (Sellick *et al.*, 2008). Cette voie métabolique est sujette à la répression catabolique exercée par le glucose qui agit soit en bloquant le transport du galactose vers le cytosol soit en inactivant l'étape de transformation du galactose-1-P en glucose-1-P (Demir & Aksan Kurnaz, 2006). Dans les travaux de classification taxonomique de Kurtzman et Fell (1998), il a été rapporté que *C. utilis* n'est pas capable de fermenter ni d'assimiler le galactose en tant que source de carbone et d'énergie. Cependant, la culture de CU sur les métabolites de KM a montré que le

galactose, contenu dans la culture à une teneur initiale de 400 mg/L, est consommé en deux phases bien distinctes. La première phase, durant laquelle le taux de consommation est très faible (0.01 g/L.h), montre que la voie d'assimilation du galactose est quasi-inhibée. Durant la deuxième phase, commençant suite à la rupture de l'éthanol et du glycérol dans le milieu, le taux de dégradation du galactose augmente à 0.05 g/L.h (Tableau 28). Il semblerait donc que l'assimilation du galactose soit sujette à une répression exercée par l'éthanol ou le glycérol. À date et au meilleur de notre connaissance, il n'existe pas de rapports scientifiques mettant en évidence la capacité de *C. utilis* à assimiler le galactose. Le fait que cette souche prolifère dans un environnement contenant du galactose aurait peut-être induit l'expression des gènes *GAL*, responsables du métabolisme du galactose, lui conférant ainsi la capacité d'utiliser cette molécule comme source de carbone. Il serait de ce fait intéressant d'investiguer cette propriété de la souche CU et la manière d'augmenter le flux à travers le cycle de Leloir afin de favoriser l'assimilation de ce sucre très présent dans les substrats provenant de la transformation laitière (lactosérums de fromage, lactosérums acides, laits dé lactosés).

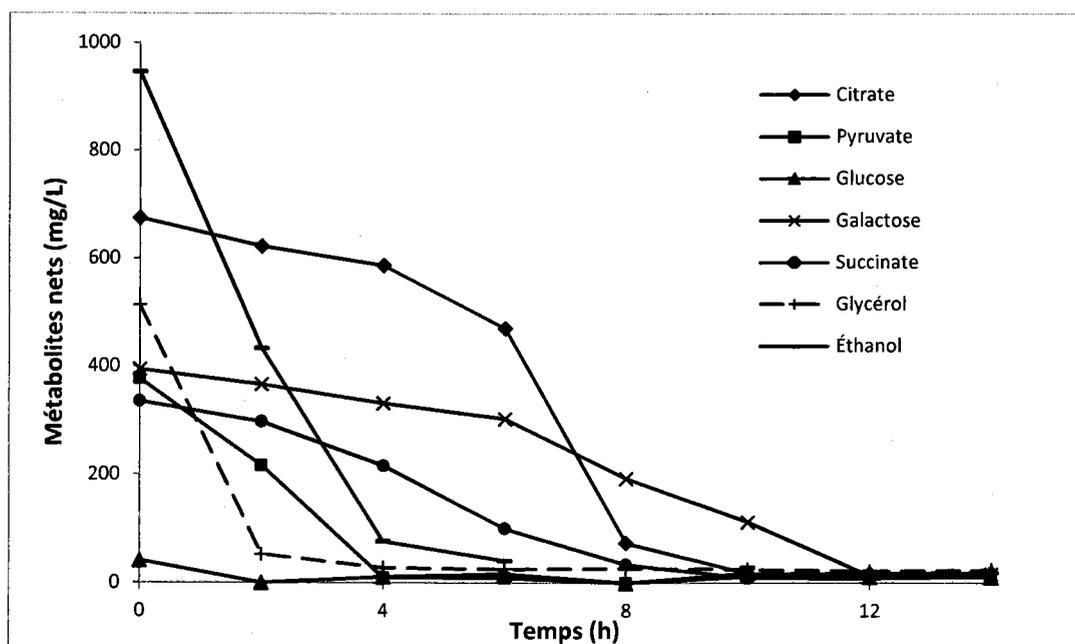


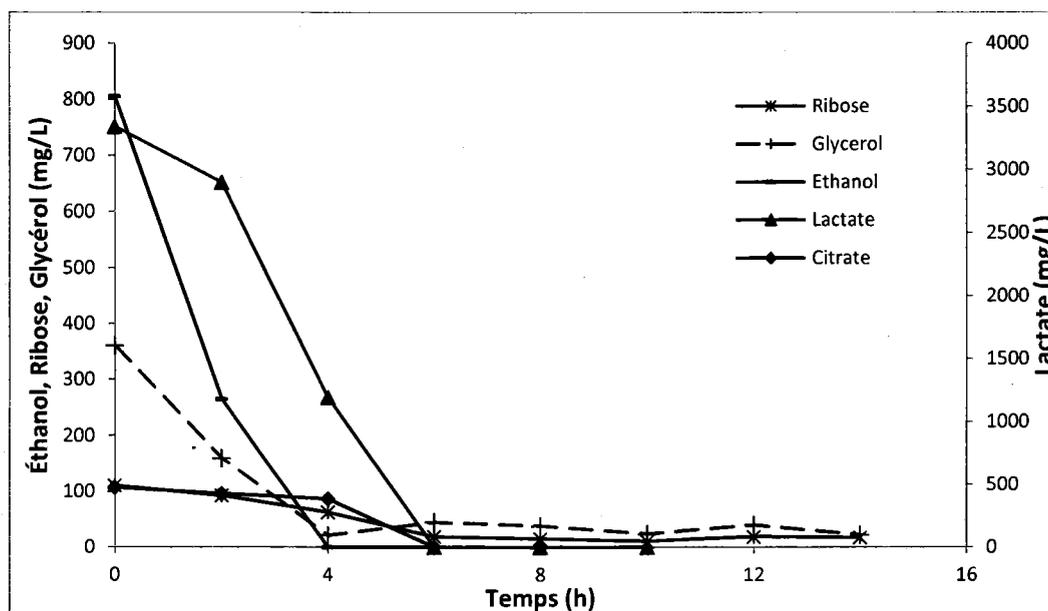
Figure 28- Cinétiques de consommation des métabolites de KM par CU. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

*f- Cinétique de consommation des métabolites de la co-culture KM-LF par CU :*

La Figure 29 illustre les cinétiques de consommation des métabolites de KM-LF par la souche CU. Cinq principaux composés ont été détectés lors de cette culture à savoir l'éthanol, l'acide lactique, le glycérol, le citrate et le ribose. Le composé le plus rapide à être consommé par CU est l'éthanol. Il est dégradé à un taux de 0.41 g/L.h et est complètement consommé après 4h de fermentation. Ce taux est équivalent à celui obtenu lors de la culture de CU sur les métabolites de KM (Tableau 28). En parallèle et après une latence apparente de 2h, l'acide lactique, dégradé à un taux de 0.79 g/L.h, est entièrement consommé après 6h de fermentation. D'après ces constats, il semblerait que l'assimilation de l'acide lactique ne soit pas complètement bloquée par une répression exercée par l'éthanol vu que les deux composés sont consommés simultanément. D'après Leão et Van Uden (1986), le transport actif du lactate via le symport à proton est optimal dans la gamme de pH comprise entre 4.5 et 5. Les conditions appliquées dans cette culture seraient donc optimales pour l'absorption de l'acide lactique et son assimilation.

Le glycérol est présent à faible concentration dans le substrat de départ (0.36 g/L). Il est consommé après 4h de fermentation à un taux de 0.08 g/L.h (Tableau 28). Le glycérol représente une source de carbone de choix pour CU. D'après Gancedo et al. (1968), la membrane cellulaire de CU exhibe une perméabilité importante ( $10^5$  fois plus élevée que celle de *S. cerevisiae*) vis-à-vis du glycérol qui migre vers le cytosol par diffusion passive. Après internalisation, la molécule de glycérol est phosphorylée en glycérol-3-P qui à son tour est transformé en dihydroxyacétone-P avant de rejoindre la voie métabolique de néoglucogénèse pour la synthèse de glucose. CU utilise le glycérol comme source de carbone et d'énergie avec un taux de conversion en biomasse de 0.58g/g (Verduyn, 1991) rendant l'exploitation industrielle des substrats à base de glycérol profitable pour la production de biomasse de CU (Lipinska *et al.*, 2010). Dans leur classification des levures, Kurtzman et Fell (1998) ont rapporté que *C. utilis* n'est pas capable d'assimiler le ribose. Malgré sa faible teneur dans le milieu, le ribose est dégradé par CU (Figure 29). Cependant, sa dégradation est relativement lente. La consommation du citrate est entamée après la déplétion de l'éthanol et du glycérol du milieu

probablement en raison de la répression exercée par ces derniers sur le système de transport de ce composé tel que rapporté par Cássio et Leão (1991).



**Figure 29- Cinétiques de consommation des métabolites produits par la co-culture KM-LF par CU.**  
Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

*g- Cinétique de consommation des métabolites de la co-culture LF par CU :*

Une culture de CU a été effectuée sur un substrat à base de métabolites de LF. Les cinétiques de consommation des métabolites sont illustrées dans la Figure 30. Les quatre composés détectés au cours de cette culture sont le lactose, le citrate, le lactate et l'acétate. L'évolution de la concentration du lactose au long de la fermentation a permis de confirmer que la souche CU n'assimile pas le disaccharide conformément à la classification de Krutzman et Fell (1998) ainsi qu'à l'étude de Cristiani-Urbina et al. (2000). La source de carbone majoritaire de CU dans cette culture est le lactate. Ce dernier est consommé au bout de 6h de fermentation. L'acétate et le citrate, présents en plus faibles concentrations, ont été consommés au bout de 4h de fermentation. La production de biomasse générée au cours de cette culture est équivalente à 5.22 g/L, correspondant à un taux de conversion  $Y_{x/métab}$  de 0.66 g/g (Tableau 25). Ce taux de conversion est le plus élevé de toutes les cultures de CU effectuées dans cette étude. Dans

la littérature, Oliva et Hang (1979) ont estimé le rendement de conversion du lactate en biomasse de CU entre 0.59 et 0.7 g/g en se basant sur une culture de CU sur un rejet de l'industrie de la production de choucroute dont la source de carbone principale est l'acide lactique. Verduyn (1991) a estimé ce même rendement à 0.42 g/g à partir d'une culture de CU sur un milieu synthétique à base d'acide lactique.

Le taux de consommation de l'acide lactique dans cette culture est de 1.15 g/L.h. Il est de 45% plus élevé que celui obtenu avec la culture sur les métabolites de KM-LF (Tableau 28). Cette différence dans les taux de consommation pourrait être ramenée à une problématique de transport du lactate à l'intérieur de la cellule. En effet, comme il a été développé plus haut, le lactate est transporté sous sa forme ionisée ou non ionisée via un système de transport actif (symport à proton) et passif (diffusion passive), respectivement (Leão & Van Uden, 1986). La présence d'éthanol dans la culture de CU sur les métabolites de KM-LF aurait provoqué le ralentissement de l'activité du système de transport actif du lactate dont l'activité est répressible en présence de l'alcool. Ceci aurait eu comme conséquence de ralentir la vitesse de transport du lactate vers la cellule qui se serait limitée à un transport passif caractérisé par sa lenteur et sa faible affinité par rapport au mécanisme de transport actif. Ce phénomène de répression ne surviendrait pas dans le cas de la présente culture en raison de l'absence de sucres ou d'éthanol pouvant jouer le rôle de répresseurs. Par conséquent, le lactate serait transporté à une vitesse plus importante à travers le symport à proton à affinité élevée en plus de la diffusion passive à travers la membrane.

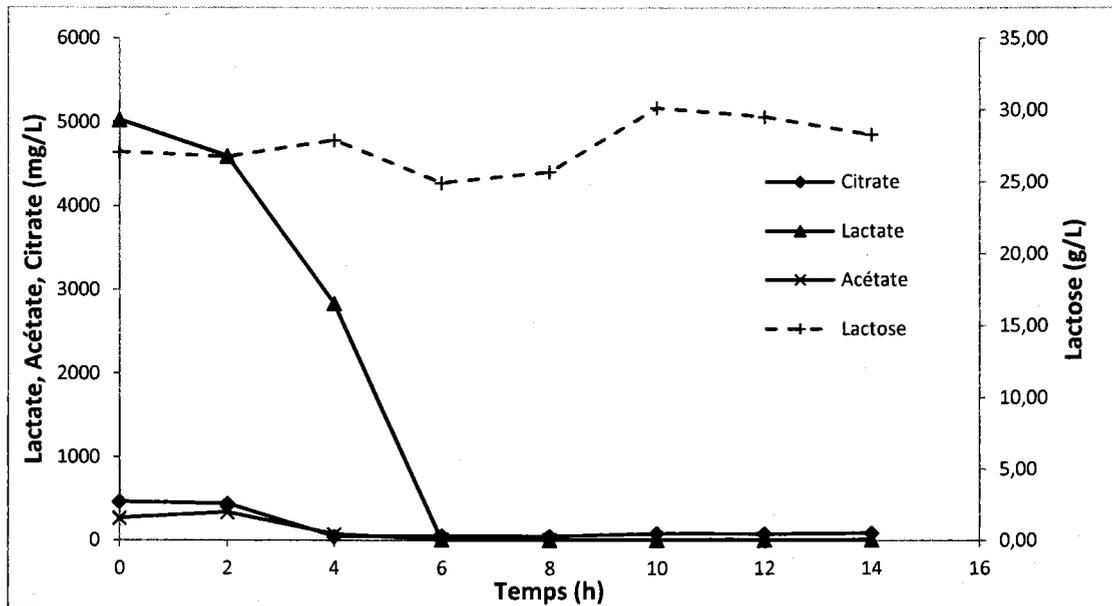


Figure 30- Cinétiques de consommation des métabolites de LF par CU. Conditions : T=34.8°C; [lactose]=35g/L; pH=4.5; Aération=1vvm; agitation=400-750 RPM

### 7.3. Discussion

La capacité de la souche CU à dégrader un large éventail de substrats a conditionné l'importante utilisation de cette levure à l'échelle industrielle pour la production de biomasse à usage nutritionnel humain et/ou animal ou pour l'épuration des effluents industriels. En effet, CU a été cultivée sur plusieurs types de substrats riches en glucides tels que les mélasses (sous-produits de l'extraction du saccharose) (Lawford *et al.*, 1979, Shay & Wegner, 1985), les liqueurs sulphitiques (rejets des industries papetières) (Gold *et al.*, 1981) de même que sur l'éthanol des résidus de brasserie et les hydrocarbures de paraffines à chaîne droite (Berkatorou *et al.*, 2006, Litchfield, 1989). Ces substrats complexes contiennent en général des mélanges d'hydrates de carbone plus ou moins complexes nécessitant le déploiement d'une machinerie enzymatique adaptée pour leur assimilation. CU s'adapte bien aux procédés de traitement des rejets riches en acides organiques tels que les eaux usées du jus de citron (acide citrique) (Hang, 1980) ou de la production de choucroute (acide lactique) (Oliva & Hang, 1979) vu qu'elle possède la

capacité de transporter et d'assimiler ces molécules comme sources de carbone. Par ailleurs, la souche s'adapte bien aux co-cultures sur des substrats dont la source de carbone principale n'est initialement pas assimilable tels que les effluents des procédés de transformation des patates (chaines d'amidon) (Skogman, 1976) ou encore des cidreries (chaines de pectines) (Fellows & Worgan, 1987). Dans ces procédés ayant atteint la phase d'industrialisation, CU est co-cultivée avec d'autres souches permettant la transformation de la source de carbone non assimilable en décomposant les chaines d'amidon et de pectine en sucres simples plus assimilables. L'étude publiée par Cristiani-Urbina et al. (2000) a montré la capacité de CU à proliférer dans le lactosérum déprotéiné lorsqu'elle est co-cultivée avec la levure-lactose positive *T. cremoris*.

Dans ce contexte, le présent chapitre, étudiant la culture de CU sur le perméat de lactosérum, dont la source principale de carbone n'est pas assimilable par cette levure, a permis de mettre en évidence la capacité de la souche à s'adapter à une co-culture en assimilant différents composés provenant de la conversion du lactose par les souches lactose positives. Pour cela, l'étude s'est basée sur l'identification et la quantification des différents composés pouvant être libérés suite à la transformation du lactose par KM et LF et captés par CU afin de satisfaire ses besoins en carbone et en énergie. Grâce à son métabolisme respiro-fermentaire, KM oriente une fraction du lactose assimilé vers la production de métabolites. Le bouquet de composés libérés comporte majoritairement des acides organiques et des alcools, tandis que LF catalyse principalement la conversion du lactose en acide lactique. L'étude de l'assimilation de ces composés par CU a permis de mettre en évidence la capacité de la levure à dégrader différents types de substrat afin d'y puiser sa source de carbone et d'énergie.

Il est très difficile d'avoir un degré de compréhension satisfaisant du type d'interactions microbiennes entre les 3 populations du consortium. En effet, l'utilisation d'un substrat complexe tel que le perméat de lactosérum dont la composition et la teneur en nutriments sont variables et difficiles à contrôler par rapport à un milieu synthétique bien défini complexifie l'étude de la physiologie des souches (Pirt, 1975). D'autre part, la complexité du métabolisme microbien en général, et de la souche KM en particulier, se traduisant par un degré de variation intraspécifique important, rend difficile la prédiction

du comportement de chaque population au sein d'une culture mixte. Se rajoute à cela un troisième niveau de difficulté apporté par la complexité des interactions entre populations lors d'une culture en consortium. Cependant, les conclusions tirées à la suite de la présente étude permettent d'émettre des hypothèses sur la nature des relations régissant les souches du consortium lorsqu'elles sont considérées deux par deux. En tant que source de carbone quasi exclusive dans le milieu de fermentation, le lactose est dégradé par KM et LF. L'acide lactique produit par le métabolisme de LF pourrait constituer un substrat de choix pour KM. Cependant, nous avons observé que la levure priorisait la dégradation du lactose par rapport à celle de l'acide lactique, dont l'assimilation semble être sujette à une légère répression en présence du disaccharide. Ainsi, la relation entre ces deux populations semble être basée, à priori, sur une compétition vis-à-vis du lactose. Cependant, l'hypothèse que la levure stimulerait l'activité métabolique du lactobacille n'est pas à écarter. En effet, les lactobacilles, connus pour leurs exigences nutritionnelles élevées, requièrent la présence de molécules telles que les vitamines, les acides aminés ou encore de faibles concentrations de CO<sub>2</sub> pour soutenir leur croissance. En sécrétant ces composés, la levure contribuerait à stimuler la croissance du lactobacille lorsque les deux espèces sont propagées en co-culture (Leroi & Pidoux, 1993). Si cette hypothèse est confirmée, la relation de compétition se trouverait jumelée à une relation de mutualisme, où des molécules produites par KM stimuleraient la croissance de LF qui, en contrepartie, fournit l'acide lactique comme source de carbone supplémentaire (Harrison, 1978). Par ailleurs, la croissance de LF dans le LS permettrait de réduire la teneur en lactose dans le milieu, ce qui aurait pour conséquence de réduire l'intensité de l'effet *Crabtree* se traduisant par une production plus faible d'éthanol par KM.

L'acide lactique produit par LF constitue un substrat de choix parmi les plus abondants dans les cultures effectuées avec la levure CU. Par conséquent, l'assimilation rapide de l'acide lactique favorise la réduction de sa concentration dans le milieu au cours de la fermentation. Ceci est profitable au lactobacille qui verrait sa croissance stimulée en limitant l'auto-inhibition due à l'accumulation du métabolite dans le milieu (Gonçalves *et al.*, 1997). Quoiqu'à des degrés d'importance différents, les deux organismes semblent donc partager un bénéfice de leur interaction mutualiste lorsqu'ils sont co-cultivés sur le

perméat de lactosérum. D'une manière générale, la présence d'une bactérie dans ce genre de culture mixte peut s'avérer intéressante en ce qui a trait à la prévention de la contamination. En effet, les cultures de levures sont sensibles à la contamination bactérienne en raison de la richesse du milieu dans lequel elles sont produites. La présence du lactobacille permettrait d'occuper cet «espace libre» et de créer une barrière contre l'introduction d'espèces bactériennes indésirables.

KM et CU sont deux levures appartenant au groupe des respiro-fermentaires. La présente étude a permis de montrer la capacité de ces levures à assimiler plusieurs types de substrats. Tout comme l'interaction entre CU et LF, l'activité métabolique de KM permet d'assurer la croissance de CU en fournissant l'éthanol, le glycérol et autres acides organiques utilisables comme sources de carbone. Cependant, en se basant exclusivement sur l'étude des profils des acides organiques, il ne semble pas y avoir d'avantages en faveur de KM dans la relation entre les deux souches. Ceci définirait donc une interaction de type commensalisme entre KM et CU, où la croissance d'un organisme dans l'écosystème dépend de l'activité métabolique de l'autre, sans que le bénéfice soit obligatoirement réciproque (Harrison, 1978). L'hypothèse du commensalisme n'est vraisemblablement pas la seule pouvant être émise pour qualifier la relation entre KM et CU si l'on considère des bases de comparaison autres que les acides organiques, telles que l'élimination d'une substance toxique, la sécrétion de composés stimulants ou inhibiteurs, par exemple.

Le rapprochement entre le procédé développé au cours de cette étude et celui de Belmonte montre des similitudes sur plusieurs aspects dont la nature des interactions microbiennes au sein de la culture mixte. Dans leur description du procédé, Moulin et al. (1983) ont émis des hypothèses concernant la nature des interactions caractérisant leur culture mixte utilisée pour la fermentation du LS en biomasse. La flore utilisée dans ce procédé est composée des levures *K. fragilis*, *T. sphaerica* ainsi que *T. bovina*. Dans leur analyse, les auteurs ont considéré que seule *K. fragilis* assimilait le lactose et que, par conséquent, une forme de neutralisme caractérisait sa relation avec *T. sphaerica*. Cette dernière, selon eux, utiliserait l'acide lactique pour croître dans le milieu. La faible quantité d'acide lactique dans le substrat expliquerait la faible concentration de *T. sphaerica* dans le

milieu. Cependant, *T. sphaerica* (syn. De *K. lactis*) a été décrite par plusieurs auteurs comme étant une levure capable d'assimiler le lactose. Il existe donc une discordance entre ce qui semble être une caractéristique physiologique généralisée aux souches *K. lactis* et l'hypothèse avancée par Moulin et al. (1983). En effet, selon la classification de Kurtzman et Fell (1998) et l'étude de Moulin et Galzy (1978), la capacité de *K. lactis* à assimiler le lactose amènerait à considérer plutôt une relation de type compétition entre elle et *K. fragilis*. Le temps de génération plus court de cette dernière par rapport à celui de *K. lactis* expliquerait le débalancement du ratio des deux souches au cours de la fermentation en continu du LS (90/10 pour *K. fragilis*/*K. lactis*). De plus, l'hypothèse que *K. lactis* utiliserait exclusivement l'acide lactique comme source de carbone ne serait pas plausible si l'on considère que les gènes responsables du transport du monocarboxylate seraient soumis à la répression par le lactose tels qu'il est le cas avec le glucose (Lodi *et al.*, 2004). Concernant la troisième souche, *T. bovina*, Kurtzman et Fell (1998) ont rapporté dans leur classification que cette levure est capable d'assimiler exclusivement le glucose. La capacité de fermenter le lactate et le succinate sont variables et dépendent donc des souches, tandis que l'assimilation de l'éthanol est faible voire absente. La levure *T. bovina* assimilerait donc ces composés afin de proliférer, certes de manière très limitée.

L'étude des interactions microbiennes gérant une population de microorganismes dans un milieu de culture tel que le LS est une tâche qui peut s'avérer complexe. La démarche scientifique à entreprendre reste tributaire de la disponibilité et de la précision des outils analytiques mis à notre disposition pour effectuer cette étude ainsi que de leurs limitations technologiques. L'approche séquentielle préconisée au cours de cette étude, et consistant à étudier la croissance de CU sur des milieux pré-fermentés par KM ou par le couple KM-LF, offre plusieurs avantages en regard de la détermination et la compréhension des interactions microbiennes gérant les membres du consortium. En effet, avec cette approche, il a été possible de dresser un tableau clair sur les caractéristiques métaboliques des souches impliquées dans le contexte de la culture mixte étudiée. Le décortiquage de l'action de chaque souche du consortium en termes de production et de consommation de métabolites a permis d'émettre des hypothèses sur la

nature des interactions géant chaque paire de microorganismes. Cependant, l'approche adoptée comporte certaines limites intéressantes à relever à ce niveau. En effet, la culture de CU sur les milieux pré-fermentés implique que les métabolites produits antérieurement par KM, LF ou KM-LF soient présents à des concentrations relativement élevées, sous l'effet de l'accumulation dans le temps, par rapport à une culture effectuée avec le mélange des trois souches. Dans ce dernier cas, les métabolites seraient plutôt produits au fur et à mesure que l'activité métabolique des souches lactose positives évolue dans le temps et de ce fait, leur concentration à un temps  $t$  de la fermentation devrait être très faible. Cette considération revêt une importance lors de l'interprétation des paramètres cinétiques calculés sur la base d'une approche séquentielle. En effet, il serait important de vérifier dans quelle mesure les rendements de conversion et les productivités atteintes par CU au cours de l'approche séquentielle seraient valables dans le cas d'une culture en consortium.



## CONCLUSION

Le présent projet de recherche a pris naissance suite aux questionnements soulevés au cours de l'opération d'un procédé industriel de fermentation du LS où les rendements de production étaient en deçà du seuil de rentabilité économique. Dans un premier temps, il a été question d'effectuer une analyse systématique de la composition de la flore de fermentation ainsi que des rendements de production et de dégradation du lactose au cours du temps. Deux principales conclusions ont pu être tirées suite à cette première phase d'étude :

- Le procédé montrait une instabilité récurrente de la flore de fermentation se traduisant notamment par l'intrusion d'une souche de levure sauvage, *C. krusei*, qui se développait intensément au détriment des deux souches *S. unisporus* et *L. fermentum* qui sont devenues indétectables par les méthodes développées au cours de ce travail. Les caractéristiques du produit fini montraient donc une déviation importante par rapport à celles pour lesquelles une autorisation réglementaire a été attribuée par l'ACIA pour sa commercialisation. De plus, l'implication de *C. krusei* dans plusieurs cas d'infections mycosiques humaines laisse perplexe par rapport à sa prolifération phénoménale dans le fermenteur et sa présence dans le produit fini.
- Les rendements sous-optimaux résultant de ce procédé (Biocompact) sont dûs à plusieurs facteurs : la présence des protéines sériques à l'état natif dans le substrat en est la principale cause. En effet, en raison de leur pouvoir moussant et sous l'effet de l'incorporation d'air dans la culture, une production abondante de mousse limite considérablement l'aération de la culture afin de lui fournir l'oxygène dissout nécessaire à l'activité oxydative de la flore. Il en résulte donc le déclenchement d'un métabolisme fermentaire responsable de la baisse des rendements de conversion du lactose en biomasse et de la mauvaise dégradation de la matière organique.

La mise en évidence des limites du procédé industriel a permis de mettre en place une stratégie de remodelage et d'optimisation du procédé de fermentation du LS. La stratégie adoptée a été basée sur l'étude de l'aspect microbiologique du procédé de fermentation grâce à l'étude du métabolisme de la souche principale du consortium autour de laquelle un criblage de plusieurs souches microbiennes a été effectué afin de sélectionner la combinaison de souches la plus efficace en termes de rendements cinétiques. Les principales conclusions dérivant de cette phase sont les suivantes :

- KM est une souche lactose-positive ayant des caractéristiques physiologiques particulières. L'étude de sa cinétique de croissance dans le LS a montré que cette souche possède deux optima différents selon que l'objectif visé soit : la production de biomasse ou la dégradation de la DCO.
- KM est dotée d'un métabolisme respiro-fermentaire engendrant la conversion d'une fraction du lactose assimilé en métabolites secondaires pouvant servir de sources de carbone de choix pour des souches incapables de dégrader le lactose.
- Ces deux propriétés physiologiques font que KM se prête bien à une culture en consortium avec d'autres souches, en leur fournissant la source de carbone nécessaire à leur croissance.
- Les expériences de criblage de 8 consortiums microbiens, dont le noyau de base comporte la souche KM, effectuées en fioles Erlenmeyer ont abouti à la sélection du mélange le plus efficace en termes de production de biomasse et de dégradation de DCO. Les rendements obtenus suite à l'optimisation des conditions de croissance du mélange sélectionné ont été vérifiés dans des fermenteurs de 5 L. Des essais de comparaison ont montré que les performances du mélange sélectionné étaient supérieures à celles du consortium de la fermentation industrielle (Biocompact).

- Par ailleurs, l'approche microbiologique développée pour le suivi de la cinétique de croissance de chacune des souches du mélange a permis de vérifier la stabilité de la flore au cours de la fermentation du LS ainsi que du perméat de LS, à deux concentrations différentes de lactose (3.5 % et 5 % p/v). Ainsi, la présence des protéines sériques et l'augmentation de la concentration en lactose n'a pas affecté les performances de la flore. Ceci confère au procédé une versatilité offrant la possibilité de l'opérer dans plusieurs conditions, selon la stratégie de son acquéreur.

La stabilité de la flore est l'élément le plus important dans un procédé employant une culture mixte. Cette stabilité dépend de la nature des interactions microbiennes gérant les populations des 3 souches du consortium sélectionné. En se basant sur l'étude des cinétiques de production et de consommation de métabolites au cours de la fermentation du LS, il a été possible de conclure ce qui suit :

- La culture de KM sur le LS induit la production de composés appartenant aux classes des acides organiques et des alcools ainsi que de faibles quantités de glucose et de galactose, libérés suite à l'hydrolyse du lactose. Ces métabolites servent de sources de carbone de choix pour supporter la croissance de la souche CU, incapable d'assimiler le lactose du LS. La bactérie LF convertit principalement le lactose en acide lactique, substrat facilement assimilable pour les deux levures KM et CU.
- En se basant sur l'analyse des profils des glucides et des acides organiques, il a été possible de vérifier que les interactions entre paires de populations microbiennes étaient principalement basées sur le commensalisme et une certaine forme de mutualisme. Ces interactions sont réputées pour assurer une stabilité à la culture mixte, inversement à d'autres telles que la compétition ou l'amensalisme, qui mènent ultimement au débalancement de l'équilibre de l'écosystème.

Ce travail de recherche a permis d'étudier, de développer et d'optimiser un procédé de fermentation du LS en utilisant une culture microbienne mixte. L'approche adoptée, basée sur des fermentations en batch, réalisées en fioles et validée en fermenteurs de

laboratoire, représente une étape cruciale pour le développement d'un procédé destiné à l'industrialisation. Avec cette approche, il nous a été permis d'acquérir un niveau de compréhension avancé du fonctionnement d'un procédé biotechnologique employant une culture mixte originale, mettant en jeu les levures KM et CU avec la bactérie LF. La sélection de ce consortium compétitif, l'optimisation de ses conditions de croissance ainsi que la détermination des types d'interactions microbiennes en son sein font que la présente étude constitue une référence scientifique intéressante, apportant une plus-value pour répondre aux problématiques liées à la compréhension des interactions microbiennes dans une culture mixte lors de la fermentation du LS ou de ses dérivés. Dans un contexte de développement industriel, les conclusions auxquelles nous sommes arrivés donnent les outils nécessaires pour effectuer une mise à l'échelle du procédé afin de vérifier sa robustesse vis-à-vis d'une transition vers l'échelle industrielle, et d'étudier son adaptabilité au traitement d'autres types de rejet provenant de la transformation laitière (tels que les lactosérums acides de yogourt grec et les liqueurs mères provenant du procédé de cristallisation du lactose).

Ce travail représente une première pierre angulaire dans le développement du procédé. Pour la poursuite des travaux de recherche, nous suggérons les recommandations suivantes :

- La détermination de la nature des interactions entre les populations microbiennes s'est basée sur la production et la consommation des métabolites de type glucides et acides organiques. Une investigation systématique plus approfondie portant sur la production éventuelle de vitamines, de (poly)peptides ou de nucléotides permettrait de déceler d'éventuels phénomènes de stimulation ou d'inhibition de croissance qui accroîtraient le niveau de connaissance des interactions mises en jeu dans ce type d'écosystème, caractérisé par un degré de complexité très élevé.
- La majorité des procédés de production de biomasse opèrent en mode batch alimenté (ou *Fed batch*), permettant de contrôler l'apport de la source de carbone et de nutriments à la culture. Ce niveau de contrôle avancé permet à l'opérateur d'imposer l'alimentation en fonction des objectifs de production par rapport à une

culture en batch. De plus, le batch alimenté permet de réduire considérablement les temps morts entre les cycles de fermentation et les coûts qui s'y rattachent, affectant ainsi la productivité et les coûts de production.

- La mise à l'échelle est une étape essentielle pour assurer la transition du procédé vers son industrialisation. Présentement, des essais de fermentation dans les conditions optimales déterminées au cours de ce travail sont en cours de réalisation dans des fermenteurs de 2 m<sup>3</sup> de volume. Ces essais permettront de tester la stabilité du procédé à plus grande échelle en estimant ses constantes cinétiques. L'effet du transfert d'oxygène devrait être le paramètre le plus important dans le passage vers une échelle plus élevée. En effet, en présence d'une colonne d'eau plus importante, le transfert d'oxygène devrait s'améliorer par rapport à un fermenteur de laboratoire. Cette amélioration serait favorable au métabolisme oxydatif de la flore et ultimement à l'augmentation des rendements en biomasse.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aiba S, Humphrey AE & Millis N, F. (1973) *Biochemical Engineering*. Academic Press Inc, New York, 2. 434 p
- Aktaş N, Boyacı İH, Mutlu M & Tanyolaç A (2006) Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology* 97(18):2252-2259.
- APHA, AWWA & WPCF (2005) Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters.
- Barker TW, Quinn JP & Marchant R (1982) The use of a mixed culture of *Geotrichum candidum*, *Candida krusei* and *Hansenula anomala* for microbial protein production from whiskey distillery spent wash. *Appl Microbiol Biotechnol* 14(4):247-253.
- Barnby FM, Morpeth FF & Pyle DL (1990) Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterisation of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 12(11):891-897.
- Barnett JA (2008) A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites1. *Yeast* 25(10):689-731.
- Baumy JJ & Brule G (1988) Binding of bivalent cations to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin: effect of pH and ionic strength. *Lait* 68(1):33-48.
- Bayer K (1983) Trace Element Supplementation of Cheese Whey for the Production of Feed Yeast. *Journal of Dairy Science* 66(2):214-220.
- Beausejour D, Leduy A & Ramalho RS (1981) Batch cultivation of *kluyveromyces fragilis* in cheese whey. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 59(4):522-526.
- Belem MAF, Gibbs BF & Lee BH (1997) *Enzymatic production of ribonucleotides from autolysates of Kluyveromyces marxianus grown on whey*. Wiley, Hoboken, NJ, ETATS-UNIS
- Belem MAF & Lee BH (1998a) Oligosaccharides extracted from cell walls of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Biotechnology Techniques* 12(3):229-233.
- Belem MAF & Lee BH (1998b) Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38(7):565-598.
- Bellaver LH, de Carvalho NM, Abrahao Neto J & Gombert AK (2004) Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Research* 4(7):691-698.
- Berget I & Næs T (2002) Sorting of raw materials with focus on multiple end-product properties. *Journal of Chemometrics* 16(6):263-273.
- Berkatorou A, Psarianos C & Koutinas AA (2006) Production of Food Grade Yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* 44(3):407-415.
- Blomberg A & Adler L (1989) *Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD[+]) in acquired osmotolerance of Saccharomyces cerevisiae*. American Society for Microbiology, Washington, DC, ETATS-UNIS. 6 p

- Box G & Hunter S (1978) *Statistics for Experimenters, an Introduction to Design, Data Analysis and Model Building* John Wiley and Sons, New York
- Branger A (2004) Fabrication de produits alimentaires par fermentation : l'ingénierie. *Techniques de l'ingénieur Procédés biochimiques et chimiques en agroalimentaire* base documentaire : TIB431DUO(ref. article : f3501).
- Bylund G (1995) *Dairy Processing Handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund
- Cabib E, Roh D-H, Schmidt M, Crotti LB & Varma A (2001) The Yeast Cell Wall and Septum as Paradigms of Cell Growth and Morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 276(23):19679-19682.
- Calderon M, Loiseau G & Guyot JP (2001) Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology* 90(4):508-516.
- Carlotti A, Jacob F, Perrier J & Poncet S (1991) Yeast production from crude sweet whey by a mixed culture of *Candida kefir* LY496 and *Candida valida* LY497. *Biotechnol Lett* 13(6):437-440.
- Cássio F & Leão C (1991) Low- and high-affinity transport systems for citric acid in the yeast *Candida utilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 57(12):3623-3628.
- Cássio F & Leão C (1993) A comparative study on the transport of L(-)malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: Evidence for a general organic acid permease. *Yeast* 9(7):743-752.
- Cassio F, Leao C & Van Uden N (1987) Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 53(3).
- Castrillo JI & Ugalde UO (1992) Energy metabolism of *Kluyveromyces marxianus* in deproteinated whey. Chemostat studies. Modelling. *Journal of Biotechnology* 22:145-152.
- Castrillo JI & Ugalde UO (1993) Patterns of energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 40(2-3):386-393.
- Champagne CP, Goulet J & Lachance RA (1990) Production of Bakers' Yeast in Cheese Whey Ultrafiltrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(2):425-430.
- Che L, Zhan L, Fang Z, Lin Y, Yan T & Wu D (2012) Effects of dietary protein sources on growth performance and immune response of weanling pigs. *Livestock Science* 148(1-2):1-9.
- Cheirsilp B, Shoji H, Shimizu H & Shioya S (2003) Interactions between *Lactobacillus kefirianofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefiran production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96(3):279-284.
- Chistyakova TA, Minkevich IG & Eroshin VK (1983) Growth of the thermotolerant yeast, *Candida valida*, on ethanol: Dependences of maximal growth rate and cell biomass yield on temperature. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18(4):225-228.

- Christen P, Domenech F, Páca J & Revah S (1999) Evaluation of four *Candida utilis* strains for biomass, acetic acid and ethyl acetate production from ethanol. *Bioresource Technology* 68(2):193-195.
- Cornu M (2000) *Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes*. Doctorate (Université Claude Bernard - Lyon I, Lyon).
- Cristiani-Urbina E, Netzahuatl-Muñoz AR, Manriquez-Rojas FJ, Juárez-Ramírez C, Ruiz-Ordaz N & Gallindez-Mayer J (2000) Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. *Process Biochemistry* 35(7):649-657.
- de Sanchez SB & Castillo FJ (1980) Effect of pH on the growth of *Kluyveromyces fragilis* on deproteinized whey. *Acta Cient. Venezolana* 31:3.
- Demir O & Aksan Kurnaz I (2006) An integrated model of glucose and galactose metabolism regulated by the GAL genetic switch. *Computational Biology and Chemistry* 30(3):179-192.
- Derringer G & Suich R (1980) {Simultaneous optimization of several response variables}. *Journal of quality technology* 12(4):214-219.
- Ding S & Tan T (2006) L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry* 41(6):1451-1454.
- Domingues L, Lima N & Teixeira JA (2001) Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering* 72(5):507-514.
- Dumas A (1826) *Annales de chimie* 33:342.
- Estrella MJ, Pieckenstein FL, Marina M, Díaz LE & Ruiz OA (2004) Cheese whey: An alternative growth and protective medium for *Rhizobium loti* cells. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31(3):122-126.
- Fellows PJ & Worgan JT (1987) Growth of *Saccharomycopsis fibuliger* and *Candida utilis* in mixed culture on apple processing wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 9(7):434-437.
- Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, da Silva EGP, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AS & dos Santos WNL (2007) Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 597(2):179-186.
- Foegeding EA, Luck PJ & Davis JP (2006) Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids* 20(2-3):284-292.
- Fonseca A, Spencer-Martins I & Van Uden N (1991) Transport of lactic acid in *Kluyveromyces marxianus*: Evidence for a monocarboxylate uniport. *Yeast* 7(8):775-780.
- Fonseca GG, Carvalho NMB & Gombert AK (2013) Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(11):5055-5067.
- Fonseca GG, Gombert AK, Heinzle E & Wittmann C (2007) Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Research* 7(3):422-435.

- Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C & Gombert AK (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79(3):339-354.
- Fowell RR (1965) The Identification of Wild Yeast Colonies on Lysine Agar. *Journal of Applied Microbiology* 28(3):373-383.
- Fredrickson AG (1977) Behavior of Mixed Cultures of Microorganisms. *Annual Review of Microbiology* 31(1):63-88.
- Fredrickson AG (1983) Interactions of Microbial Populations in Mixed Culture Situations. *Foundations of Biochemical Engineering*, (ACS Symposium Series: 207) AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Vol 207. p 201-227.
- Gancedo C, Gancedo JM & Sols A (1968) Glycerol Metabolism in Yeasts. *European Journal of Biochemistry* 5(2):165-172.
- Gao X, Qiao SY & Lu WQ (2009) Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology. *Letters in Applied Microbiology* 49(5):556-561.
- Garcia-Ochoa F & Gomez E (2009) Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances* 27(2):153-176.
- Geiger EO (1997) Statistical Methods For Fermentation Optimization. *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, Principles, Process design, and Equipment*, Vogel HC & Todaro CL (Édit.) NOYES PUBLICATIONS, Westwood, New Jersey, U.S.A., 2 Ed.
- Ghaly AE, Ben-Hassan RM & Ben-Abdallah N (1992) Measurement of heat generated by mixing during the batch production of single-cell protein from cheese whey. *Biotechnology Progress* 8(5):404-409.
- Ghaly AE & Kamal MA (2004) Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research* 38(3):631-644.
- Gilliland SE (1979) Measuring Chemical Oxygen Demand of Cottage Cheese Whey Cultured with *Kluyveromyces Fragilis*. *Journal of Dairy Science* 62(6):882-887.
- Gobbetti M (1998) The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology* 9(7):267-274.
- Gold D, Mohagheghi A, Cooney CL & Wang DIC (1981) Single-cell protein production from spent sulfite liquor utilizing cell-recycle and computer monitoring. *Biotechnology and Bioengineering* 23(9):2105-2116.
- Gonçalves LMD, Ramos A, Almeida JS, Xavier AMRB & Carrondo MJT (1997) Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48(3):346-350.
- Goupy J (1999) *Plans d'expériences pour surfaces de réponse*. Dunod, Paris
- Graham VE, Gibson DL, Kelmmer HW & Naylor JM (1953) Increasing the food value of whey by yeast fermentation. I. Preliminary studies on the suitability of various yeasts. *Can. J. Technol.* 31(Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.):85-91.

- Grandjacquet L (1989) *Procédé d'épuration et de valorisation, par voie microbiologique, d'un effluent organique comprenant un sucre fermentescible*. Brevet EP0338950 A1 (France) Attribué.
- Groleau D, Chevalier P & Yuen TLST (1995) Production of polyols and ethanol by the osmophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Biotechnol Lett* 17(3):315-320.
- Grothe E, Moo-Young M & Chisti Y (1999) Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology* 25(1-2):132-141.
- Guimaraes PM, Teixeira JA & Domingues L (2010) Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv* 28(3):375-384.
- Haaland PD (1989) *Experimental Design in Biotechnology*. CRC Press. 284 p
- Hang YD (1980) Assimilation of lemonade-processing wastewater by yeasts. *Appl Environ Microbiol* 39(2):470-472.
- Harrington EC (1965) The Desirability Function. *Industrial Quality Control* 21(10):494-498.
- Harrison DEF (1978) Mixed Cultures in Industrial Fermentation Processes. *Advances in Applied Microbiology* 24.
- Hensing M, Vrouwenvelder H, Hellinga C, Baartmans R & van Dijken H (1994) Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 42(4):516-521.
- Hui YH, Meunier-Goddik L, Josephsen J, Nip WK & Stanfield PS (2003) *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. Taylor & Francis. [http://books.google.ca/books?id=uV2Oi0g\\_TB4C](http://books.google.ca/books?id=uV2Oi0g_TB4C)
- Humphrey A (1998) Shake Flask to Fermentor: What Have We Learned? *Biotechnology Progress* 14(1):3-7.
- Jitrapakdee S & Wallace JC (1999) Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340(1):1-16.
- Kleerebezem R & van Loosdrecht MCM (2007) Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current Opinion in Biotechnology* 18(3):207-212.
- Kogan G & Kocher A (2007) Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* 109(1-3):161-165.
- Kosaric N & Asher YJ (1985) The utilization of cheese whey and its components. *Agricultural Feedstock and Waste Treatment and Engineering*, (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Springer Berlin Heidelberg, Vol 32. p 25-60.
- Kosikowski FV (1979) Whey Utilization and Whey Products. *Journal of Dairy Science* 62(7):1149-1160.
- Kunz CH & Klaushofer H (1961) Purity Control of the Production of Baker's Yeast Employing a Fluorescent Antiserum. *Applied Microbiology* 9(6):469-471.
- Kurtzman CP & Fell JW (1998) *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier Bioscience B.V., Amsterdam, 4

- Lachance MA (1998) *Kluyveromyces van der Walt* emend. van der Walt. *The Yeasts (Fourth Edition)*, Cletus PK & Jack WF (Édit.) Elsevier, Amsterdam. p 227-247.
- Ladet J, Moulin G, Galzy P, Joux J, L. & Biju-Duval F (1972) Comparaison des rendements de croissance sur lactose de quelques *Kluyveromyces Van der Walt*. *Lait* 52(519-520):613-621.
- Lane M, Burke N, Karreman R, Wolfe K, O'Byrne C & Morrissey J (2011) Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 100(4):507-519.
- Lane M & Morrissey JP (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews* 24(1-2):17-26.
- Lawford GR, Kligerman A, Williams T & Lawford HG (1979) Production of high-quality edible protein from *Candida* yeast grown in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering* 21(7):1163-1174.
- Leão C & Van Uden N (1986) Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Candida utilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 23(5):389-393.
- Lee K-M & Gilmore D (2006) Statistical experimental design for bioprocess modeling and optimization analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 135(2):101-115.
- Lefebvre T, Janssens M, Camu N & De Vuyst L (2010) Kinetic Analysis of Lactic Acid Bacteria in Cocoa Pulp Simulation media toward Development of a Starter Culture for Cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 76(23):7708-7716.
- Leroi F & Pidoux M (1993) Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Microbiology* 74(1):48-53.
- Li J, Ma C, Ma Y, Li Y, Zhou W & Xu P (2007) Medium optimization by combination of response surface methodology and desirability function: an application in glutamine production. *Appl Microbiol Biotechnol* 74(3):563-571.
- Lipinska E, Blazejak S & Markowski K (2010) Possibility of using glycerol from biodiesel production as a source of carbon in mixed culture *Candida utilis* yeast and acetic acid bacteria. *Acta Scientiarum Polonorum - Biotechnologia* 9(3):3-14.
- Litchfield JH (1989) Single Cell Protein. *A Revolution in Biotechnology*, Marx JL (Édit.)Musselburgh.
- Lodi T, Fontanesi F, Ferrero I & Donnini C (2004) Carboxylic acids permeases in yeast: two genes in *Kluyveromyces lactis*. *Gene* 339(0):111-119.
- Lodics TA & Steenson LR (1993) Phage-Host Interactions in Commercial Mixed-Strain Dairy Starter Cultures: Practical Significance—A Review. *Journal of dairy science* 76(8):2380-2391.
- Loukin S & Kung C (1995) *Manganese effectively supports yeast cell-cycle progression in place of Calcium*. Rockefeller University Press, New York, NY, ETATS-UNIS. 13 p
- Mahoney RR, Nickerson TA & Whitaker JR (1975) Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Dairy Science* 58(11):1620-1629.

- Malnou D, Huyard A & Faup GM (1987) High Load Process Using Yeasts for Vinasses of Beet Molasses Treatment. *Water Science and Technology* 19:11-19.
- Mans J (1984) One-of-a-kind Plant Pioneers New Processing Technology. *Prepared Foods*:73-78.
- Mawson AJ (1988) Yeast biomass production from acid whey permeate. *Biotechnol Lett* 10(7):503-508.
- Mawson AJ (1994) Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology* 47(3):195-203.
- Mayrath J & Bayer K (1979) Biomass from whey. *Economic Microbiology* Rose A (Édit.) Academic press, London Vol 4.
- Mikelsaar M & Zilmer M (2009) Lactobacillus fermentum ME-3 an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease* 21(1):1 - 27.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426-428.
- Moresi M, Colicchio A, Sansovini F & Sebastiani E (1980) Chemical oxygen demand reduction in a whey fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9(4):261-274.
- Moresi M, Nacca C, Nardi R & Palleschi C (1979) Factor analysis in a whey fermentation by *Kluyveromyces fragilis*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8(1-2):49-61.
- Moresi M, Patete M & Trunfio A (1989) Scaling-up of a batch whey fermentation by *Kluyveromyces fragilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 31(5-6):495-501.
- Moresi M & Sebastiani E (1979) Optimization of whey fermentation in a shaken-flask fermenter. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8(1-2):63-71.
- Moulin G & Galzy P (1978) Remarks on the metabolism of *kluyveromyces lactis van der walt*. *Mycopathologia* 66(1-2):73-76.
- Moulin G & Galzy P (1984) *Whey, a potential substrate for biotechnology*. Intercept, Andover, ROYAUME-UNI
- Moulin G, Malige B & Galzy P (1983) Balanced Flora of an Industrial Fermenter: Production of Yeast from Whey. *Journal of Dairy Science* 66(1):21-28.
- Myers RH, Montgomery DC & Anderson-Cook CM (2009) *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. New Jersey, 3. 704 p
- Najafpour G (2007) *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Amsterdam
- Odum EP (1953) *Fundamentals of Ecology*. Saunders.  
<http://books.google.ca/books?id=8bvPAAAAMAAJ>
- Oliva RU & Hang YD (1979) Continuous Removal of Lactic Acid from Wastewater by *Candida utilis*. *Appl Environ Microbiol* 38(5):1027-1028.
- Oliver JD (2005) The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology* 43(S):93-100.
- Panesar PS & Kennedy JF (2012) Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Critical Reviews in Biotechnology* 32(4):327-348.

- Phisalaphong M, Srirattana N & Tanthapanichakoon W (2006) Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 28(1):36-43.
- Pirt JS (1975) *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications, New York
- Plessas S, Bosnea L, Psarianos C, Koutinas AA, Marchant R & Banat IM (2008) Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresource Technology* 99(13):5951-5955.
- Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF & Cotter PD (2013) The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* 37(5):664-698.
- Quintas C, Leyva JS, Sotoca R, Loureiro-Dias MC & Peinado JM (2005) A model of the specific growth rate inhibition by weak acids in yeasts based on energy requirements. *International Journal of Food Microbiology* 100(1-3):125-130.
- Rajoka MI, Khan SH, Jabbar MA, Awan MS & Hashmi AS (2006) Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology* 97(15):1934-1941.
- Rocha S, Abrahão-Neto J & Gombert A (2011) Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 100(4):619-630.
- Rodríguez C, Rimaux T, Fornaguera M, Vrancken G, Valdez G, Vuyst L & Mozzi F (2012) Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 93(6):2519-2527.
- Saliceti-Piazza L (1996) *Aerobic co-culture of Kluyveromyces marxianus and Candida utilis utilizing multiple substrates from whey bioconversion waste streams*. Doctor of Physolophy (Purdue University, West Lafayette).
- Schultz N, Chang L, Hauck A, Reuss M & Syldatk C (2006) Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 69(5):515-520.
- Sellick CA, Campbell RN & Reece RJ (2008) Chapter 3 Galactose Metabolism in Yeast—Structure and Regulation of the Leloir Pathway Enzymes and the Genes Encoding Them. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Kwang WJ (Édit.) Academic Press, Vol Volume 269. p 111-150.
- Shay LK & Wegner GH (1985) Improved Fermentation Process for Producing Torula Yeast. *Food Technology* 39(10):61-66.
- Sienkiewicz T & Riedel CL (1990) *Whey and Whey Utilization*. Verlag Th. , Mann
- Siso MIG (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology* 57(1):1-11.
- Siso MIG, Murado MA, Franco JM, Miron J & González MP (1988) Microfungus-yeast mixed cultures in the degradation of amylaceous wastes. I: Interactions affecting amylolytic activity. *Biotechnol Lett* 10(6):431-436.
- Skinner CE & Fletcher DW (1960) A Review of the Genus *Candida*. *Bacteriol. Rev.* 24(4):397-416.

- Skogman H (1976) The Symba Process. *Starch - Stärke* 28(8):278-282.
- Smithers GW (2008) Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal* 18(7):695-704.
- StatistiqueCanada (2012) Statistiques Laitières. (Statistique Canada, Ottawa).
- Suihko ML & Makinen V (1981) *Candida krusei* in baker's yeast production. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13(2):113-116.
- Tracey RP, van Vuuren HJJ & du Toit DS (1984) A method for the detection of *Issatchenkia orientalis* in a baker's yeast factory. *Appl Microbiol Biotechnol* 19(2):131-133.
- Trautmann H & Weihs C (2006) On the distribution of the desirability index using Harrington's desirability function. *Metrika* 63(2):207-213.
- Tribe LA, Briens CL & Margaritis A (1995) Determination of the volumetric mass transfer coefficient (kLa) using the dynamic "gas out-gas in" method: Analysis of errors caused by dissolved oxygen probes. *Biotechnology and Bioengineering* 46(4):388-392.
- Tyagi RD, Surampalli RY, Yan S & Chang TC (Édit) (2009) *Sustainable sludge management: production of value added products*. ACSE.
- Ugalde UO & Castrillo JI (2002) Single Cell Proteins from Fungi and Yeasts. *Applied Mycology and Biotechnology. Agriculture And Food Production*, Elsevier Science B.V. Ed Vol 2. p 123-149.
- Van Dijken JP & Scheffers AW (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 32(3-4):199-224.
- Van Dijken JP, Weusthuis RA & Pronk JT (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63(3-4):343-352.
- Van Uden N (1984) Temperature profiles of yeasts. *Advances in microbial physiology* 25:7.
- Van Urk H, Postma E, Scheffers WA & Van Dijken JP (1989) Glucose transport in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 135(9):2399-2406.
- Van Urk H, Voll WS, Scheffers WA & Van Dijken JP (1990) Transient-state analysis of metabolic fluxes in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1):281-287.
- Verduyn C (1991) Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie van Leeuwenhoek* 60(3):325-353.
- Wang Z, Zhuge J, Fang H & Prior BA (2001) Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnology Advances* 19(3):201-223.
- Wasserman AE (1960) Whey Utilization. IV. Availability of Whey Nitrogen for the Growth of *Saccharomyces Fragilis*. *Journal of dairy science* 43(9):1231-1234.
- Watson TG (1970) Effects of Sodium Chloride on Steady-state Growth and Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 64(1):91-99.
- Wittmann C, Hans M & Bluemke W (2002) Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* 19(15):1351-1363.

Zaunmüller T, Eichert M, Richter H & Uden G (2006) Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(3):421-429.

## ANNEXE 2 : PROFILS BIOCHIMIQUES DÉTERMINÉS PAR API ET SÉQUENCE D'ADNR DES SOUCHES IDENTIFIÉES

**Tableau 30- Profils API 20C AUX pour l'identification des levures**

Sources de carbone	KM	CU	SC	CK	SU
Contrôle	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+
Glycérol	-	+	-	+	-
2-Céto-gluconate	-	-	-	-	+
Arabinose	+	-	-	-	-
D-Xylose	+	+	-	-	-
Adonitol	+	-	-	-	-
Xylitol	+	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	-	+
Inositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Méthyl-glucopyranoside	-	-	+	-	+
N-acétylglucosamine	-	-	-	+	-
Cellobiose	-	+	-	-	-
Lactose	+	-	-	-	-
Maltose	-	+	+	-	-
Saccharose	+	+	+	-	-
Tréhalose	-	-	+	-	-
Mélézitose	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	-	-
<b>% d'homologie</b>	<b>99.6</b>	<b>98.4</b>	<b>97.7</b>	<b>98.9</b>	

Tableau 31- Profils API 50 CHL pour l'identification des Lactobacilles

Sources de carbone	<i>L. fermentum</i>	<i>G. stearothersophilus</i>
Contrôle	-	-
Glycérol	-	-
Érythritol	-	-
D-Arabinose	-	-
L-Arabinose	-	-
D-Ribose	+	+
D-Xylose	-	-
L-Xylose	-	-
D-Adonitol	+	-
Méthyl-D-xylopyranoside	+	-
D-Galactose	+	+
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Mannose	+	+
L-Sorbose	-	-
L- Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	+	-
D-Mannitol	+	-
L-Sorbitol	-	-
Méthyl-D-Mannopyranoside	-	-
Méthyl-D-Glucopyranoside	+	-
N-Acétyleglucosamine	+	-
Amygdaline	+	-
Arbutine	+	-
Esculine	+	-
Salicine	+	-
D-Cellobiose	+	-
D-Maltose	+	+
D-Lactose	-	+
D-Mélibiose	+	+
D-Saccharose	+	+
D-Tréhalose	+	+
Inuline	+	-

Mélezitose	-	-
D-Raffinose	-	+
Amidon	-	-
Glycogène	-	-
Xylitol	+	-
Gentiobiose	+	-
D-Turanose	-	-
D-Lyxose	+	-
D-Tagatose	-	-
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-Arabitol	-	-
L-Arabitol	-	-
Potassium Gluconate	-	-
Potassium 2-Cétogluconate	-	-
Potassium 5-Cétogluconate	-	-
<b>Identification</b>	<b><i>Lactobacillus fermentum</i></b>	<b><i>G. stearothermophilus</i></b>
<b>% Homologie</b>	<b>99.6</b>	<b>98.1</b>

Identification de *Galactomyces geotrichum* par séquençage génétique de l'ADN ribosomal 18S.

Mahmoudi, A., Bala Subramanian S., and Tyagi, R. D. 2009. *Galactomyces geotrichum* strain AM1, 18S ribosomal RNA gene, partial sequence. Submitted on 02-september-2009, by INRS-ETE, University of Quebec, Canada

Accession number: **GQ862350**.

***Galactomyces geotrichum* (820 bp)**

agttgatatataataaagttgttcagttaaaaagctcgtagttgaaacttgggtgcgtagggcggtctcttttagagtactaccctgaaacatcttcttgggt  
gtaaactytctattyayttargragtgaaccaaaccatttactttgaaaaattagagtgttcaaagcaggcctttgctcgaatatattagcatggaataatagaa  
taggacgtatggttctattttgtggttctaggaccgtcgaatgattaataggacggtcggggcatcagattcagttgtcagaggtgaaattcttgattta  
ctgaagactaactactgcgaaagcattttcaagaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgtcgtagtcttaaccgtaaactatgccgactagg  
gatcggagggcgtataataacctctccggcaccttacgagaaatcaaagttttgggttctgggggagtagttgcaaggctgaaactaaaggaattga  
cggaaaggcaccaccaggagtgagcctcggccttaatttgactcaacacggggaactcaccaggtccagacacaataaggattgacagattgagagc  
tcttcatgattttgtgggtggtggtcatggccgttcttagttggtggagtgatttctctgcttaattgcgataacgaacgagacctaacctgctaaatagctgta  
acaatagattattgtttgacagcttcttagaggactatcgattttcaagtcgatggaataaagg

## ANNEXE 3 : MÉTABOLISME DIAUXIQUE DE KM ET CALCUL DU COEFFICIENT DE MAINTENANCE

En cours de culture de KM sur le PLS, la consommation de lactose dans le milieu est plus rapide que la dégradation de la DCO en raison de la production de métabolites secondaires par la levure. Pour la vérification du métabolisme diauxique de KM, une fermentation étalée sur 72h a été effectuée afin d'estimer l'évolution des métabolites produits selon l'équation suivante :

$$DCO_{M_t} = (DCO_T - DCO_L)_t - (DCO_T - DCO_L)_{initial}$$

Avec :

$DCO_{M_t}$  : DCO des métabolites formés à un temps t

$DCO_T$  : DCO totale soluble

$DCO_L$  : DCO du lactose calculée comme suit :  $DCO_L = 1.123 \times [\text{lactose}]$

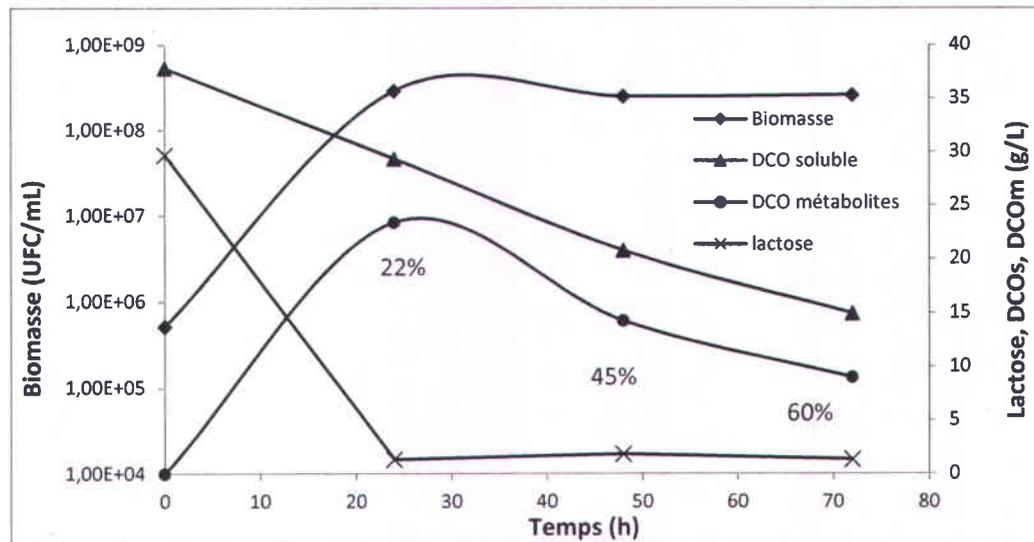


Figure 31- Mise en évidence du profil diauxique de KM

Les pourcentages représentent les rendements épuratoires totaux

Calcul des coefficients de maintenance  $m$

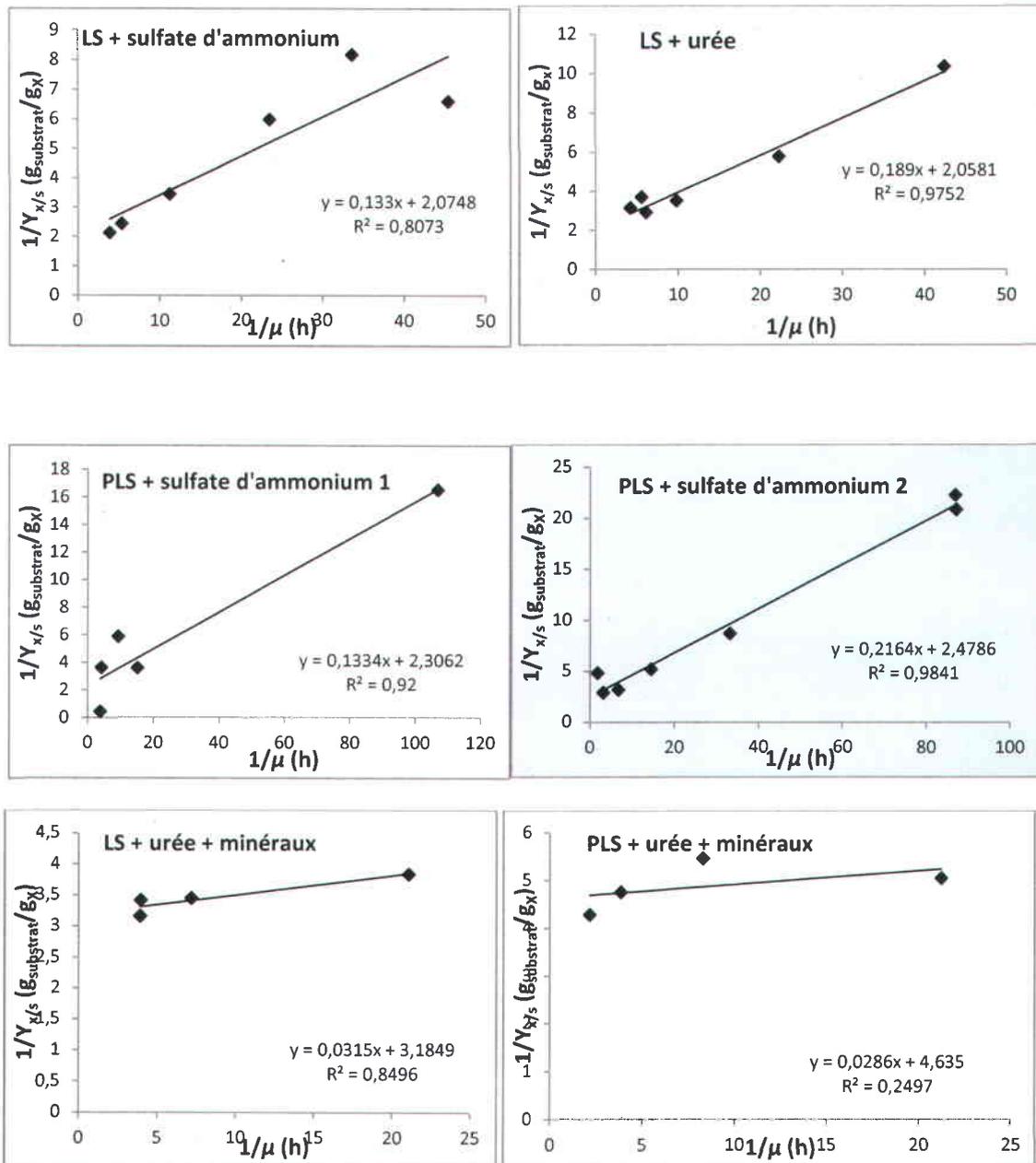


Figure 32- Détermination graphique des coefficients de maintenance  $m$  (g/g.h)

**Tableau 32- Exemple de calcul du coefficient de maintenance  $m$  (g<sub>s</sub>/g<sub>x</sub>.h) de la culture de KM sur le PLS**

Temps (h)	Biomasse (g/L)	Lactose (g/L)	dX/dt	$\mu=(1/x)*(dX/dt)$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	<b>1/μ (h)</b>	<b>1/Y<sub>x/s</sub> (g<sub>s</sub>/g<sub>x</sub>)</b>
0	0.46	36.56					
2	0.86	33.29	0.45	0.52	0.21	<b>1.92</b>	<b>4.83</b>
4	2.25	27.93	0.69	0.31	0.34	<b>3.25</b>	<b>2.92</b>
6	3.63	25.21	0.53	0.15	0.31	<b>6.81</b>	<b>3.20</b>
8	4.38	21.10	0.30	0.07	0.19	<b>14.55</b>	<b>5.20</b>
10	4.83	18.95	0.14	0.03	0.11	<b>33.32</b>	<b>8.74</b>
12	4.96	16.04	0.06	0.01	0.04	<b>87.01</b>	<b>22.27</b>
14	5.06	13.87	0.06	0.01	0.05	<b>87.24</b>	<b>20.86</b>
16	5.19	11.20	0.03	0.006	0.04	<b>158.94</b>	<b>23.86</b>

Les valeurs encadrées ont servi à illustrer la variation de  $1/Y_{x/s}$  en fonction de  $1/\mu$  (graphique bleu de la Figure 32 ci-contre).

Le coefficient directeur de la courbe de tendance correspond au coefficient  $m$  (g<sub>s</sub>/g<sub>x</sub>.h).

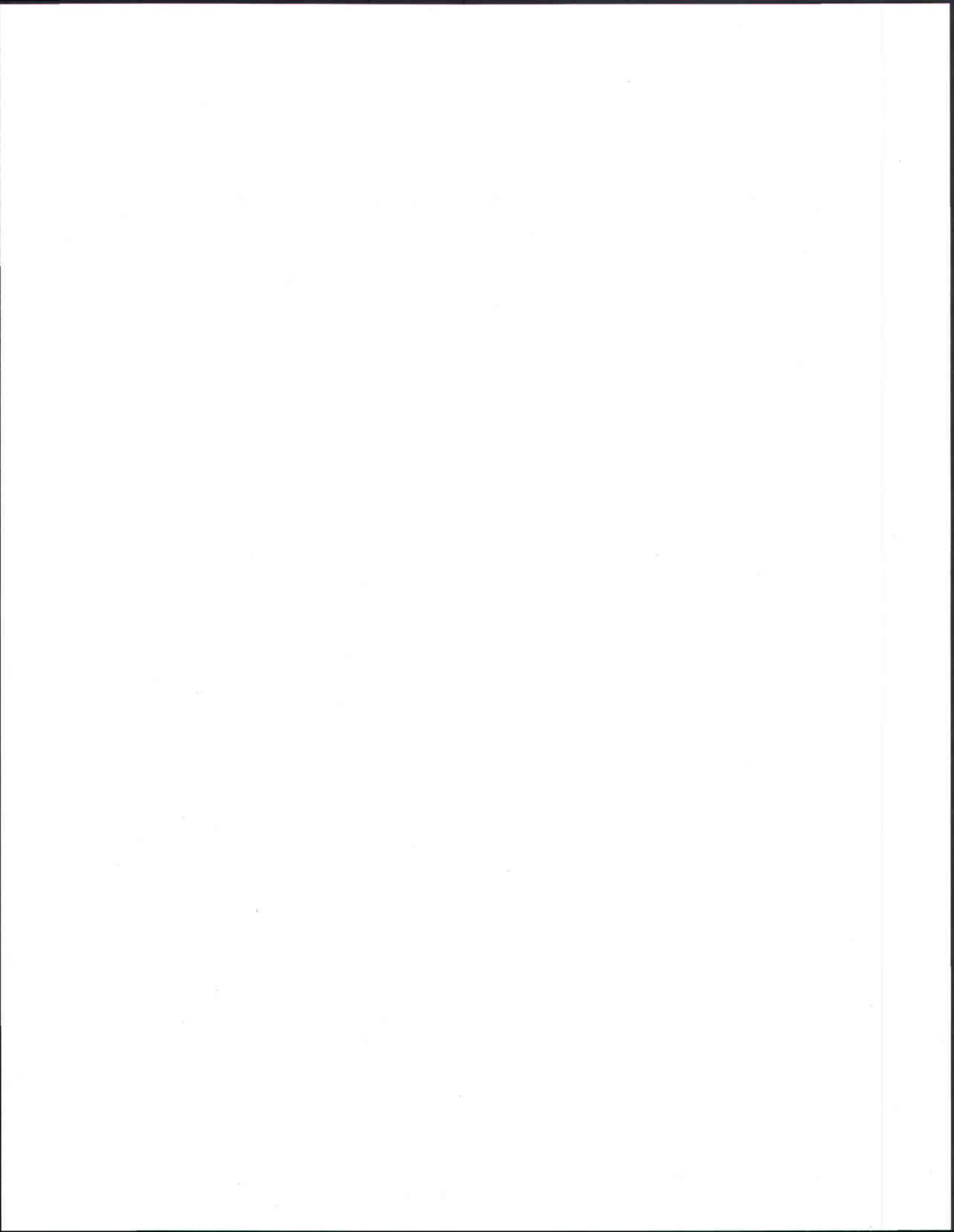
Dans le cas de l'exemple traité :  $m = 0.216 \text{ g}_s/\text{g}_x.\text{h}$

Exemple de calcul de dX/dt

$$\text{Point 1 : } dX/dt = (2.25 - 0.46) / (4 - 0) = 0.45$$

$$\text{Point 2 : } dX/dt = (3.63 - 0.86) / (8 - 4) = 0.69$$

$$\text{Point n : } dX/dt = (X_{n+1} - X_{n-1}) / (t_{n+1} - t_{n-1})$$



## ANNEXE 4 : QUALITÉ DU PRODUIT FINI ET DE L'EFFLUENT DE FERMENTATION

### Fiche nutritionnelle de la biomasse produite par la fermentation du LS

Les produits finis issus de la fermentation du LS et du PLS ont été analysés après concentration et séchage par atomisation de la crème de biomasse obtenue après fermentation. Le tableau suivant compare la composition des biomasses obtenues avec une composition typique d'un concentré de protéines de lactosérum à 35 % (p protéines/p matières sèches).

Tableau 33- Composition physicochimique des biomasses produites par fermentation du LS

Paramètre	Produit de la fermentation du PLS	Produit de la fermentation du LS	Concentré de protéines de lactosérum*
	% (p/p)	% (p/p)	% (p/p)
Humidité	4.5	4.7	5.0
Protéines totales (N Kjeldahl ×6.25)	47.0	52.0	34.0
Cendres	8.0	8.0	7.0
Matières grasses	2.4	2.5	
Glucides totaux	42.0	42.5	
<b>Profil des acides aminés</b>			
Lysine	3.74	4.35	3.23
Méthionine	0.38	0.53	0.74
Thréonine	2.16	2.48	1.88
Tryptophane	0.48	0.66	1.63
Glutamine	-	-	3.4
Arginine	1.97	2.02	1.22
Phénylalanine	1.35	1.62	1.18
Isoleucine	1.54	1.87	2.24
Valine	1.79	2.25	2.13
Leucine	2.23	3.18	2.67

\*tiré de Che et al. (2012)

Le dosage des acides aminés a été réalisé par chromatographie en phase liquide à haute performance.

### Qualité de l'effluent à la fin de la fermentation

Le tableau suivant représente les valeurs des paramètres physicochimiques caractérisant le lactosérum en tant que substrat ainsi que l'effluent à la sortie du procédé de fermentation développé au cours de cette étude.

**Tableau 34- Composition physicochimique du LS et de l'effluent après séparation de la biomasse**

Paramètres	Lactosérum (substrat)	Eau résiduelle
pH	6.2±0.2	4.5±0.2
DCO (mg/L)	39305	2100
DBO5 (mg/L)	31444	1680
Carbone organique total (% p/v)	-	0.14
Azote total (% p/v)	-	0.029
Lactose (% p/v)	3.5	<0.1%
Minéraux (% p/v)	1.2	0.81
Ca (mg/L)	460	245
K (mg/L)	1663	510
Mg (mg/L)	142	87
Na (mg/L)	592	1522
P (mg/L)	535	83
S (mg/L)	737	1588

Le dosage des minéraux a été effectué par spectrométrie par torche à plasma (ICP-AES).

## ANNEXE 5 : VALEURS DES PARAMÈTRES D'AGITATION, DE TRANSFERT ET DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE AU COURS DE LA CULTURE DE KM SUR LE PLS (CHAP. 7).

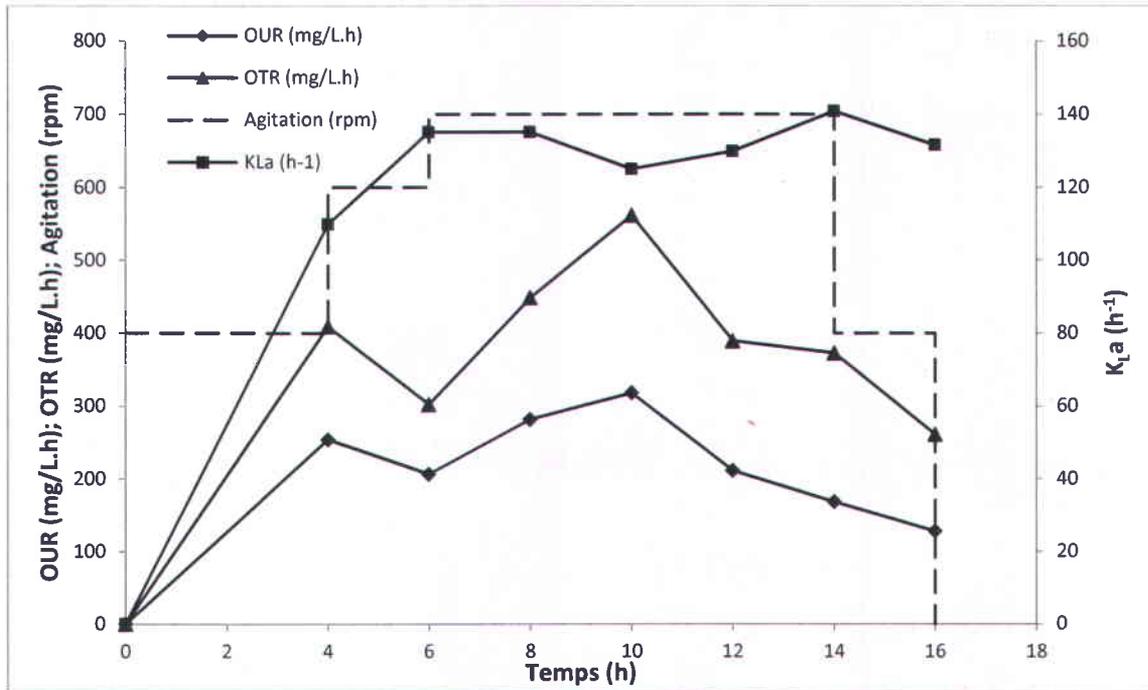


Figure 33- Profils de OTR, OUR et  $K_La$  au cours de la culture de KM sur le PLS. Conditions :  $T=34.8^{\circ}C$ ; [lactose]=35g/L; Aération=1 vvm; agitation=400-750 RPM

