

Titre: Valorisation de substrats complexes et peu coûteux pour la
Title: production d'acide lactique par voie biologique

Auteur: Rosalie Allard Massicotte
Author:

Date: 2017

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Allard Massicotte, R. (2017). Valorisation de substrats complexes et peu coûteux
Citation: pour la production d'acide lactique par voie biologique [Mémoire de maîtrise,
École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/2724/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/2724/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Michel Perrier, & Mariya Marinova
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

VALORISATION DE SUBSTRATS COMPLEXES ET PEU COÛTEUX POUR LA
PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR VOIE BIOLOGIQUE

ROSALIE ALLARD MASSICOTTE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

AOÛT 2017

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

VALORISATION DE SUBSTRATS COMPLEXES ET PEU COÛTEUX POUR LA
PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR VOIE BIOLOGIQUE

présenté par : ALLARD MASSICOTTE Rosalie

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. HENRY Olivier, Ph. D., président

M. PERRIER Michel, Ph. D., membre et directeur de recherche

Mme MARINOVA Mariya, Ph. D., membre et codirectrice de recherche

M. ADJALLÉ Kokou, Ph. D., membre

DÉDICACE

“Science knows no country, because knowledge belongs to humanity, and is the torch which illuminates the world. Science is the highest personification of the nation because that nation will remain the first which carries the furthest the works of thought and intelligence.” Louis Pasteur

REMERCIEMENTS

La rédaction d'un mémoire exige de la patience et de la détermination. Certaines embuches nous apparaissent insurmontables et le soutien d'une équipe expérimentée est indispensable pour les surmonter. J'aimerais donc remercier ceux qui m'ont aidé à repousser mes limites et à traverser les difficultés survenues pendant ma maîtrise.

Tout d'abord, j'aimerais faire des remerciements spéciaux à mes codirecteurs de recherche, Dr. Mariya Marinova et M. Hassan Chadjaa. Merci de m'avoir guidé lors de ma maîtrise et d'avoir su m'apporter le support dont j'avais besoin pour poursuivre mes études. Merci d'avoir écouté avec attention mes idées, même les plus extravagantes, et d'avoir su me proposer un projet de recherche intéressant et stimulant. Merci à Pr. Michel Perrier, pour avoir accepté ma candidature lors de ma maîtrise. J'aurais aimé avoir la chance de vous connaître davantage.

Un gros merci à l'équipe du Centre National en Electrochimie et en Technologies Environnementales (CNETE) pour m'avoir accueilli avec générosité et patience dans votre laboratoire. J'ai passé de magnifiques moments avec vous dans le laboratoire ou à l'extérieur et j'ai trouvé des amis formidables. Carolanne, ma cousine de cœur, j'ai adoré nos conversations, parfois un peu étrange, qui mettait toujours du soleil dans ma journée. Joshua, argumenter avec toi était mémorable, bien que j'aie toujours raison. Christophe, Anthony et Jacob, j'adorais venir faire un petit tour dans le labo analytique pour avoir quelques blagues (souvent mauvaise) en réserve. Mathieu, Catherine, Patrik, Jean-François et Mireille, vos conseils et votre expérience m'ont été très précieux. Merci à tous les autres avec qui j'ai interagi et qui m'ont fait confiance.

Merci à mes amis, pour m'avoir permis de décrocher le temps de quelques soirées inoubliable. Marie-Suzanne, Anne-Marie, Shannye, Valérie et tant d'autres.

Pour finir, merci à mon mari et à ma famille. Vous m'avez toujours poussé à faire de mon mieux et à suivre mes passions. Raphaël, je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi. Toujours prêt à m'encourager et à m'écouter. Tu recharges mes batteries par ta seule présence et me permets de toujours continuer. Chloé et Alice, merci d'être présentes dans ma vie et par le fait même d'y apporter de la joie. Cécile et Gilbert, l'un de vous manque à l'appel aujourd'hui, mais vous m'avez toujours entouré de tout l'amour dont je pouvais rêver, je vous aime. Maman, Papa, vous m'avez toujours dit que je pouvais faire tout ce que voulais dans la vie et que rien n'était hors de ma portée

et qu'il suffisait de travailler fort. Vous êtes la raison pour laquelle j'y ai cru. Je vous aime et je ne pourrais rêver de meilleurs parents. Merci.

RÉSUMÉ

Au Québec, une nouvelle norme de gestion des déchets organiques entrera en vigueur en 2020. L'enfouissement des déchets organiques, comme les résidus agroalimentaires, sera interdit et de nouvelles voies de valorisation de ces déchets doivent donc être proposées. L'industrie agroalimentaire doit donc trouver des solutions afin de valoriser ces déchets. Les résidus agroalimentaires sont riches en sucres fermentescibles, comme le fructose, le glucose et le galactose, et sont donc des substrats envisageables pour toutes valorisations biotechnologiques.

L'industrie papetière, importante au Québec, doit composer avec une nouvelle concurrence, soit l'essor des nouveaux médias numériques. L'industrie papetière doit donc trouver des solutions afin de conserver sa rentabilité. Dans cette optique, l'essor des bioraffineries ouvre plusieurs voies de recherche. Un co-courant du procédé de pâte Kraft soluble, comportant principalement des hémicelluloses, est inutilisé et pourrait avoir aussi un bon potentiel dans un bioprocédé, une fois hydrolysé pour y libérer les sucres, principalement du xylose. Par contre, celui-ci contient une quantité d'inhibiteurs potentiellement problématique. Le procédé de pâte thermomécanique, qui permet de séparer les sucres de la lignine dans la biomasse, permet donc de créer un courant, l'hydrolysate de pâte thermomécanique, composé essentiellement de glucose et de xylose.

Ces trois substrats sont donc utilisés, dans ce mémoire, comme source de carbone pour le bioprocédé de production d'acide lactique grâce à une bactérie lactique polyvalente, *Lactobacillus rhamnosus*. L'acide lactique est utilisé dans plusieurs industries, mais, présentement, une importante augmentation de la demande de ce produit est causée par l'industrie du bioplastique. En effet, l'acide lactique est un précurseur important pour la production d'acide polylactique, un plastique biodégradable.

L'hydrolysate Kraft n'a pas permis la production d'acide lactique, car les composés toxiques présents dans le substrat, combiné à la nature moins fermentescible des sucres disponibles (xylose) ont inhibé la fermentation lactique avec *Lactobacillus rhamnosus* et ce, même avec des ajouts d'azote et de minéraux. Par contre, l'hydrolysate de pâte thermomécanique a permis la production

de 66,9 g/L d'acide lactique et démontre une productivité de 1,9 g d'acide lactique/g de sucre consommé, avec des ajouts d'azote et de minéraux. Les résidus agroalimentaires ont permis de produire 62,5 g /L d'acide lactique et ont démontré une productivité de 1,5 g d'acide lactique/g de sucre consommé, avec des ajouts d'azote et de minéraux, bien qu'une concentration de 42,8 g/L ait été atteinte sans l'ajout de minéraux.

ABSTRACT

Lactic acid is used in several industries, such as the food and the cosmetic industries. Currently, a significant increase in the demand for this product occurs due to the bioplastic industry. Indeed, lactic acid is an important precursor to produce polylactic acid, a biodegradable plastic.

On the other hand, the pulp and paper industry, which is important in Quebec, faces new competition, the rise of new digital media. The paper industry needs therefore to find solutions to maintain its profitability. A co-current of the dissolving Kraft pulp and paper process, composed mainly of hemicelluloses, is unused and could have good potential in a bioprocess, once hydrolyzed to release the sugars, mainly xylose. It contains a potentially problematic amount of inhibitors which is a challenge to produce any bioproduct. The thermomechanical pulping process, allowing to separate the sugars from the lignin in the biomass, thus making possible to create a stream, the thermomechanical pulp hydrolysate, essentially composed of glucose and xylose. That stream does not have many inhibitors like the Kraft hydrolysate and could be a part of the development of biorefineries and opens several research avenues.

However, in Quebec, a new organic waste management standard will take effect in 2020. The landfill of organic waste such as food waste, will be banned and new ways to waste recycling must be found. The food industry must find solutions to valorize the waste. The food residues are rich in fermentable sugars, such as fructose, glucose and galactose, and are possible substrates in biotechnological processes.

These three substrates are therefore used in this work as a carbon source for lactic acid production by a polyvalent lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus*. The Kraft hydrolyzate did not allow the production of lactic acid, as the toxic compounds present in the substrate, combined with the less fermentable nature of available sugars (xylose), inhibited lactic fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* even with nitrogen and minerals additions. On the other hand, the thermomechanical pulp hydrolysate allowed the production of 66.9 g/L lactic acid and with a productivity of 1.9 g lactic acid/g sugar consumed, with nitrogen and minerals additions. The food residues allow the production of 62.5 g/L lactic acid and demonstrated a productivity of 1.5 g lactic acid/g sugar consumed, with nitrogen and minerals additions, a concentration of 42.8 g/L was achieved without the addition of minerals.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
LISTE DES ANNEXES	XVI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE	3
2.1 Acide Lactique	3
2.2 Substrats provenant de l'industrie papetière	6
2.2.1 Procédé Kraft.....	6
2.2.2 Procédé de pâte thermomécanique	8
2.3 Substrat provenant de l'industrie agroalimentaire	8
2.4 Analyse critique de la littérature	9
CHAPITRE 3 OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE	10
3.1 Objectifs	10
3.2 Méthodologie	12
CHAPITRE 4 PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DU SUBSTRAT.....	13
4.1 Méthodologie	13
4.1.1 Préparation des substrats	13

4.1.2	Caractérisation des substrats	15
4.2	Résultats de la caractérisation	20
4.2.1	Hydrolysats Kraft.....	20
4.2.2	Hydrolysats de pâte thermomécanique	22
4.2.3	Résidus agroalimentaires.....	24
CHAPITRE 5 FERMENTATION LACTIQUE.....		26
5.1	Méthodologie de mise au point du procédé	26
5.1.1	Choix du micro-organisme.....	27
5.1.2	Choix des conditions de culture	28
5.1.3	Choix des suppléments.....	30
5.2	Essais en Erlenmeyer et en bioréacteur.....	31
5.2.1	Hydrolysats Kraft.....	33
5.2.2	Hydrolysats de pâte thermomécanique	35
5.2.3	Résidus agroalimentaires.....	36
5.3	Résultats des fermentations.....	39
5.3.1	Essai 1 : Milieu de référence MRS.....	39
5.3.2	Hydrolysats Kraft.....	41
5.3.3	Hydrolysats de pâte thermomécanique	52
5.3.4	Résidus agroalimentaires.....	54
5.3.5	Synthèses et comparaison des trois types de substrats carbonés.....	70
CHAPITRE 6 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....		72
BIBLIOGRAPHIE		74
ANNEXES		81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4-1 Caractérisation de l'hydrolysat de bois du procédé Kraft.....	21
Tableau 4-2 Caractérisation minérale de l'hydrolysat du procédé Kraft	22
Tableau 4-3 Caractérisation de l'hydrolysat de pâte thermomécanique	23
Tableau 4-4 Caractérisation minérale de l'hydrolysat de pâte thermomécanique	23
Tableau 4-5 Caractérisation générale des résidus agroalimentaires.....	25
Tableau 4-6 Caractérisation minérale des résidus agroalimentaires	26
Tableau 5-1 Composition en minéraux et en composés azotés du milieu de culture.....	31
Tableau 5-2 Essais liés à l'hydrolysat Kraft.....	33
Tableau 5-3 Essais liés à l'hydrolysat de pâte thermomécanique	35
Tableau 5-4 Essai avec les résidus agroalimentaires	36
Tableau 5-5 Composition du milieu de culture initial de l'essai « fed-batch » en bioréacteur 1,3 L.	38
Tableau 5-6 Conditions utilisées lors de l'essai « fed-batch »	38
Tableau 6-1 Planification de l'échantillonnage en erlenmeyer et en bioréacteur	81

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 Voie métabolique de la fermentation lactique homofermentaire (Tessier, 2007)	3
Figure 2-2 Voie métabolique de la fermentation lactique hétérofermentaire (Tessier, 2007)	4
Figure 2-3 Procédée Kraft avec l'étape de préhydrolyse	7
Figure 2-4 Procédé de pâte thermomécanique	8
Figure 2-5 Procédé d'obtention du substrat provenant de l'industrie agroalimentaire	9
Figure 3-1 Méthodologie générale du projet.....	12
Figure 4-1 Processus de préparation du substrat issu du procédé Kraft.....	14
Figure 4-2 Programmation de température du four du GC pour l'analyse du limonène	18
Figure 5-1 Importance de la contrainte de substrats dans l'élaboration de plusieurs aspects critiques de la production d'acide lactique	27
Figure 5-2 Courbe de croissance de <i>L. rhamnosus</i> dans le milieu de référence MRS.....	39
Figure 5-3 Suivi de la densité optique et du pH lors de la fermentation lactique par <i>L. rhamnosus</i> dans le milieu de référence MRS	40
Figure 5-4 Courbe de production d'acide organique et de consommation de glucose avec <i>L. rhamnosus</i> et le milieu de référence MRS	41
Figure 5-5 Courbe de croissance de <i>L. rhamnosus</i> dans l'hydrolysate Kraft supplémenté de minéraux et d'azote	42
Figure 5-6 Courbe de croissance de <i>L. rhamnosus</i> dans l'hydrolysate Kraft détoxifié et avec des ajouts d'azote et de minéraux.....	43
Figure 5-7 Courbe de croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> dans l'hydrolysate Kraft concentré 3X et supplémenté d'azote et de minéraux	44
Figure 5-8 Courbe de croissance de <i>L. rhamnosus</i> dans un milieu composé de 20 g/L de xylose avec l'ajout d'azote et de minéraux.....	45
Figure 5-9 Production d'acides organiques et consommation de sucre de <i>L. rhamnosus</i> lors de l'essai 5.....	46

Figure 5-10 Courbe de croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> dans l'hydrolysat Kraft supplémenté de 20 g/L de glucose, d'azote et de minéraux	47
Figure 5-11 Courbe de croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> dans l'hydrolysat Kraft non détoxifié et supplémenté de 20 g/L de glucose, d'azote et de minéraux.....	48
Figure 5-12 Variation du pH dans la fermentation de l'hydrolysat Kraft détoxifié et supplémenté de 20 g/L de glucose, d'azote et de minéraux	49
Figure 5-13 Courbe de production d'acide lactique et de consommation de glucose et de xylose	50
Figure 5-14 Sommaire de la production d'acides organiques et de la consommation de sucre dans les essais avec l'hydrolysat Kraft	51
Figure 5-15 Courbe de croissance de <i>L.rhamnosus</i> dans l'hydrolysat de pâte thermomécanique supplémenté d'azote et de minéraux	53
Figure 5-16 Production d'acides organiques et consommation des sucres par <i>L. rhamnosus</i> dans l'hydrolysat de pâte thermomécanique supplémenté d'azote et de minéraux.....	53
Figure 5-17 Courbe de croissance de <i>L. rhamnosus</i> dans les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote	55
Figure 5-18 Consommation du sucre par <i>L. rhamnosus</i> dans l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote.....	56
Figure 5-19 Production d'acides organiques par <i>L. rhamnosus</i> dans l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote.....	57
Figure 5-20 Évolution du pH lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote	57
Figure 5-21 Évolution de la concentration en limonène dans la fermentation de <i>L. rhamnosus</i> dans l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote	58
Figure 5-22 Courbe de croissance de <i>L. rhamnosus</i> dans les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote et de minéraux.	60
Figure 5-23 Consommation du sucre par <i>L. rhamnosus</i> lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote et de minéraux.....	61

Figure 5-24 Production d'acides organiques par <i>L. rhamnosus</i> lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote et de minéraux.....	61
Figure 5-25 Évolution du pH lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote et de minéraux.	62
Figure 5-26 Courbe de croissance de <i>L. rhamnosus</i> dans les résidus agroalimentaires 1/3 supplémentés d'azote et de minéraux.....	63
Figure 5-27 Consommation du sucre par <i>L. rhamnosus</i> lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires 1/3 supplémentés d'azote et de minéraux.....	64
Figure 5-28 Production d'acides organiques par <i>L. rhamnosus</i> lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires 1/3 supplémentés d'azote et de minéraux.....	65
Figure 5-29 Évolution du pH lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires 1/3 supplémentés d'azote et de minéraux.	66
Figure 5-30 Courbe de croissance de <i>L. rhamnosus</i> lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires en « fed-batch ».	67
Figure 5-31 Évolution de la concentration de sucre par <i>L. rhamnosus</i> lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires « fed-batch ».	68
Figure 5-32 Production d'acides organiques par <i>L. rhamnosus</i> lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires « fed-batch ».	69
Figure 5-33 Synthèse des essais effectués avec les résidus agroalimentaires.....	70

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

CCTT	Centre Collégial de Transfert Technologique
CNETE	Centre National en Électrochimie et en Technologie Environnementale
COT	Carbone Organique Total
GC	Chromatographe en phase gazeuse
HMF	Hydroxyméthylfurfural
HPLC	Chromatographe liquide à haute performance
ICP	Plasma à couplage inductif
PLA	Acide polylactique

LISTE DES ANNEXES

Annexe A - Échantillonnage	81
----------------------------------	----

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Les normes concernant la gestion des matières résiduelles organiques deviennent de plus en plus sévères au Québec. En effet, le Québec planifie le bannissement de ces matières organiques d'ici 2020 (Gendron et al., 2012). Dans cette optique, plusieurs entreprises rencontrent des problèmes par rapport à la gestion de leurs déchets. Ces entreprises se retrouvent avec une grande quantité de matières organiques inutilisables dans leur procédé conventionnel, mais qu'ils ne peuvent pas enfouir dans les sites d'enfouissement québécois. La revalorisation de ces matières résiduelles organiques est essentielle afin de trouver une alternative viable à l'enfouissement.

Au Québec, 1 286 188 tonnes de déchets organiques sont produites chaque année. Plus particulièrement, les déchets organiques sont principalement produits par l'industrie laitière, par l'industrie de mise en conserve de fruits et de légumes ainsi que par l'industrie des produits de viande. Une grande partie de ses déchets est directement réutilisée par les industries qui les produit en alimentation animale ou en engrais, mais plusieurs milliers de tonnes sont enfouies dans des sites d'enfouissement (Forcier et al., 2013).

D'un autre côté l'industrie des pâtes et papiers, très importante au Québec, est fortement menacée par la compétition internationale ainsi que par l'essor des nouveaux médias numériques (Marinova et al., 2009; Thorp, 2005). Dans ce contexte, l'intégration d'une bioraffinerie verte aux usines de pâte et papiers est une solution non seulement envisagée, mais fortement encouragée. Une bioraffinerie verte intégrée permet l'ajout d'un procédé chimique, biochimique ou thermochimique au procédé de mise en pâte existant afin d'effectuer la production de nouveaux produits biosourcés et de nouvelles molécules plateformes. De plus, la bioraffinerie doit conserver un bilan environnemental positif (Rafione, 2014). La bioraffinerie peut valoriser la biomasse excédentaire produite par l'industrie papetière, ce qui permettrait l'élimination de déchets de procédé, tout en ajoutant une source de revenu intéressante pour l'industrie.

Le marché mondial des bioproduits atteindra 135 milliards de dollars américains en 2020 (King, 2010). Ceux-ci comprennent, en autres, des produits chimiques, des produits cosmétiques, des bioplastiques, des biocarburants et des lubrifiants (CRIBIQ, 2017; King, 2010; Économie, science et innovation Québec; MarketsandMarkets, 2015). L'acide lactique est une molécule plateforme

importante pour l'industrie et elle sera évaluée dans ce mémoire. Le marché de l'acide lactique devrait atteindre 3,82 milliards de dollars en 2020 et croît à un taux de 18 % annuellement (MarketsandMarkets, 2015). Ce produit est donc un choix intéressant pour une valorisation biotechnologique des rejets de l'industrie agroalimentaire, qui doit utiliser sa biomasse excédentaire, et des rejets ou co-courants de l'industrie papetière, qui doit se renouveler. Puisque l'acide lactique est une molécule plateforme, la vente de ce bioproduit cible différentes industries et donc différents marchés à exploiter, surtout le marché des bioplastiques.

CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Acide lactique

L'acide lactique est un acide organique retrouvé naturellement dans une grande variété d'aliments. Originellement isolé dans le lait, cet acide comporte deux isomères, le (L) -lactique ou le (D)-lactique, le premier étant biologiquement important (Ren, 2010). La production d'acide (L) -lactique est donc plus importante et l'acide (D)-lactique est, de plus, nocif pour la consommation humaine à haute concentration (Akerberg et al., 1998; Panesar and Kaur, 2015; Ping et al., 2005).

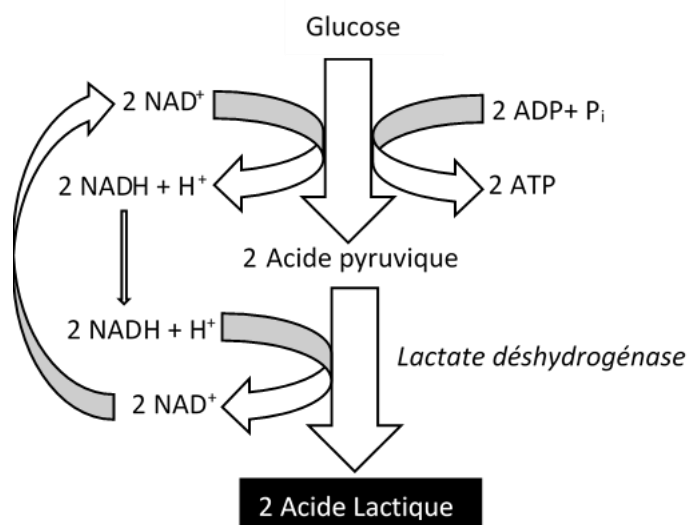


Figure 2-1 Voie métabolique de la fermentation lactique homofermentaire (Tessier, 2007)

L'acide lactique peut être synthétisé chimiquement ou biologiquement. Il est produit chimiquement lors de la réaction entre le cyanure d'hydrogène et l'acétaldéhyde qui forme le lactonitrile sous une haute pression atmosphérique. Ensuite le lactonitrile est hydrolysé avec de l'acide concentré (H₂SO₄ ou HCl) pour former de l'acide lactique et un sel d'ammonium. L'acide lactique est ensuite estérifié avec du méthanol pour former du lactate de méthyle, qui est hydrolysé par de l'eau en condition acide pour purifier l'acide lactique et récupérer le méthanol (Ren, 2010).

Pourtant, il est beaucoup plus facile de produire l'acide lactique biologiquement en utilisant des micro-organismes (Jamshidian et al., 2010). Plusieurs types de bactéries, de levures et de

champignons sont des producteurs d'acide lactique (Abdel-Rahman et al., 2013, 2010; Hofvendap, 2000; Lu et al., 2010; Panesar and Kaur, 2015). Certains micro-organismes sont homofermentaires, d'autres sont hétérofermentaires (Panesar and Kaur, 2015; Ten and Vermerris, 2015). Un micro-organisme homofermentaire, c'est-à-dire capable de métaboliser l'acide lactique pur, et surtout son isomère (L) -lactique pur, sera normalement privilégié pour la production (Panesar and Kaur, 2015).

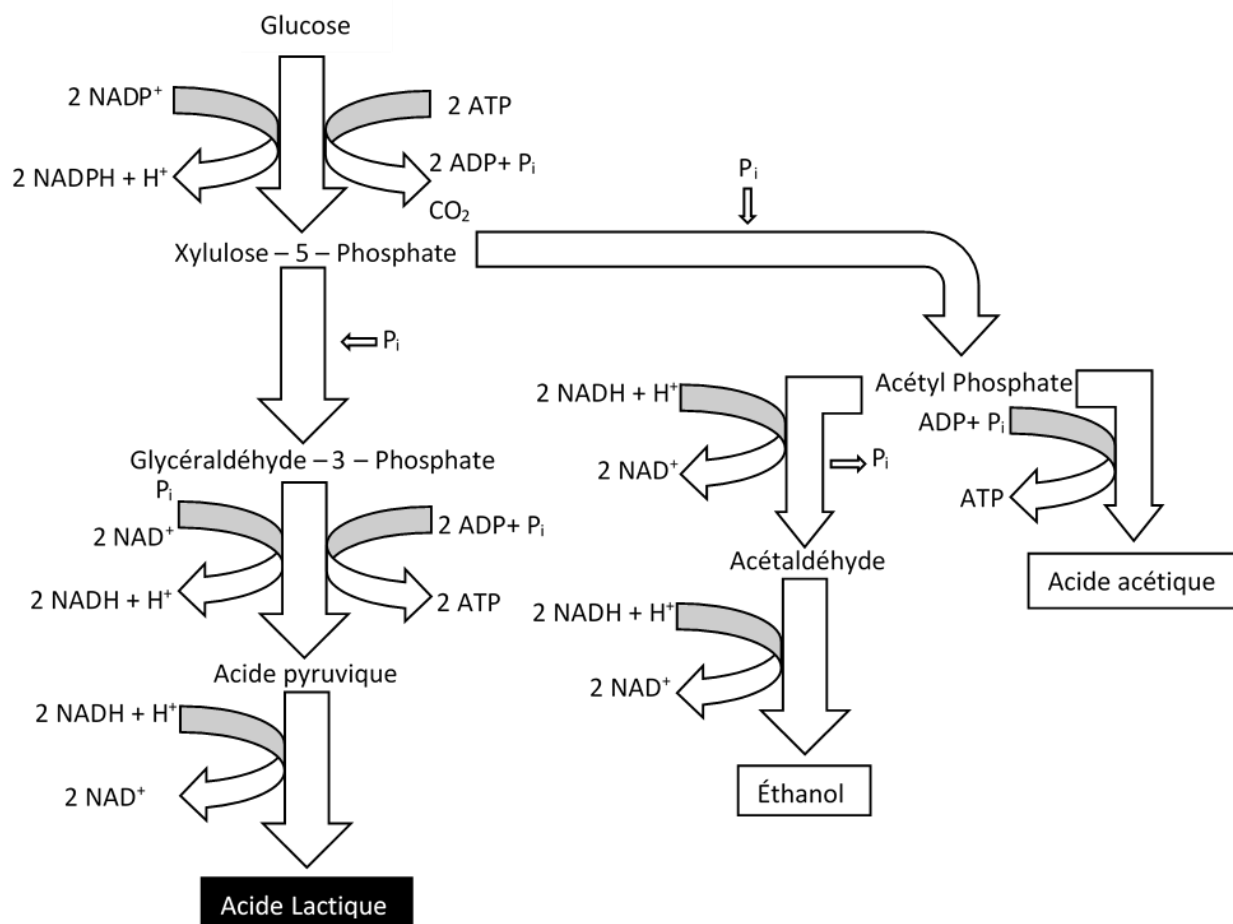


Figure 2-2 Voie métabolique de la fermentation lactique hétérofermentaire (Tessier, 2007)

Plusieurs méthodes innovantes sont présentement testées pour la production biotechnologique de l'acide lactique. En autres, la saccharification et la fermentation simultanées permettent, de façon très innovante, d'effectuer à la fois l'hydrolyse de sucres complexes en sucres simples et la fermentation de ceux-ci pour la production d'acide lactique. Cette méthode permet de réduire le

temps total du procédé tout en réduisant l'effet inhibiteur d'une forte concentration initiale de sucre. (Hofvendap, 2000; Marques et al., 2008; Ping et al., 2005).

De plus, plusieurs études ont tenté de démontrer l'efficacité de l'immobilisation des bactéries lactiques, tout en ayant des résultats mitigés (Hofvendap, 2000). D'un autre côté, les cultures mixtes de bactéries lactiques présentent des avantages fort intéressants pour l'industrie, en réduisant les coûts de stérilisation de matériel, tout en gardant sensiblement les mêmes performances (Choi et al., 2016). Par contre, les cultures mixtes ont les grands désavantages d'être irrégulières et de produire de l'acide lactique couplé avec une large variété de contaminants (Choi et al., 2016).

Ayant une variété importante d'applications, l'acide lactique est présent dans l'industrie alimentaire, mais aussi dans l'industrie cosmétique, dans l'industrie textile, dans l'industrie chimique, dans l'industrie pharmaceutique ainsi que dans l'industrie des colles et plastiques (Assavasirijinda et al., 2016; Kok et al., 2014; Lopes et al., 2013; Lu et al., 2010; Ren, 2010).

Dans l'industrie alimentaire, il est utilisé comme exhausteur de goût, comme acidifiant naturel ou comme agent de conservation (Hofvendap, 2000; Ren, 2010). L'acide lactique est utilisé pour l'ajustement du pH de plusieurs produits cosmétiques, pour les produits anti-acné ainsi que pour certaines injections esthétiques (Butterwick and Lowe, 2009; Narins et al., 2009; Palm et al., 2010; Panesar and Kaur, 2015). Il est aussi utilisé pour la fabrication de nouveaux textiles plus écoresponsable, surtout dans la fabrication de fibres (Bene et al., 2014; Gupta and Revagade, 2007). De plus, l'acide lactique est un bloc de construction pour une grande variété de produits chimiques, tels le propylène glycol, le 2,3-pentanedione l'acétaldéhyde et l'acide pyruvique (Dusselier et al., 2013). Dans l'industrie pharmaceutique, l'acide polylactique (PLA), un polymère biodégradable, de l'acide lactique est, entre autres, utilisé pour le relargage progressif de médicament (He et al., 2013; Sanna et al., 2013; Xu et al., 2009).

L'utilisation du PLA est une alternative envisagée afin de réduire la consommation de plastiques à base de pétrole (Madhavan Nampoothiri et al., 2010). Produit chimiquement à partir d'acide lactique, ce polymère est donc issu de sources renouvelables, puisque l'acide lactique est lui-même issu de la fermentation de sucres divers (Jamshidian et al., 2010; Madhavan Nampoothiri et al., 2010; Neupane et al., 2016). Le bioplastique peut être utilisé pour l'emballage alimentaire, pour

les bouteilles biodégradables, pour les sacs d'épicerie et pour divers contenants de plastiques thermoformés (Henton et al., 2005). C'est donc un choix intéressant lors de l'application du concept d'économie durable et un choix intéressant pour la valorisation biotechnologique des rejets agroalimentaires et de la biomasse forestière.

2.2 Substrats provenant de l'industrie papetière

Deux substrats provenant de l'industrie papetière seront utilisés dans ce projet. Le premier provient du procédé Kraft, tandis que le deuxième provient du procédé de pâte thermomécanique. Les substrats dérivés de l'industrie papetière sont abordables et riches en sucre, tout en réduisant le problème de l'utilisation des ressources agroalimentaires pour des fins économiques, et non alimentaires (Abdel-Rahman et al., 2013; Wee and Ryu, 2009). Par contre, les sucres présents à l'état naturel dans le bois sont complexes et nécessitent donc un traitement assez fort afin de les rendre disponibles pour un bioprocédé. Les deux substrats proviennent de FPInnovations, centre de recherche spécialisé dans les procédés et produits forestiers.

2.2.1 Procédé Kraft

Dans le procédé Kraft, la lignine est retirée à l'aide de deux produits chimiques, l'hydroxyde de sodium ainsi que le sulfure de sodium. Les copeaux de bois cuisent dans ce mélange appelé liqueur blanche. Ensuite, les fibres de cellulose sont séparées du mélange (appelé liqueur noire) et blanchies chimiquement. Les fibres de cellulose sont drainées, pressées et séchées pour en faire la pulpe. La liqueur noire est concentrée, puis utilisée pour la production de vapeur dans la chaudière de récupération. La liqueur est ensuite régénérée par une caustification pour créer la liqueur blanche, utilisée au début du processus (Lee, 2015).

L'ajout d'une préhydrolyse au procédé afin d'y extraire une partie des hémicelluloses permet la production de la pâte soluble. La pâte soluble permet, avec l'ajout de différents procédés, d'obtenir une grande variété de produits, comme de la rayonne, du latex et certaines laques.

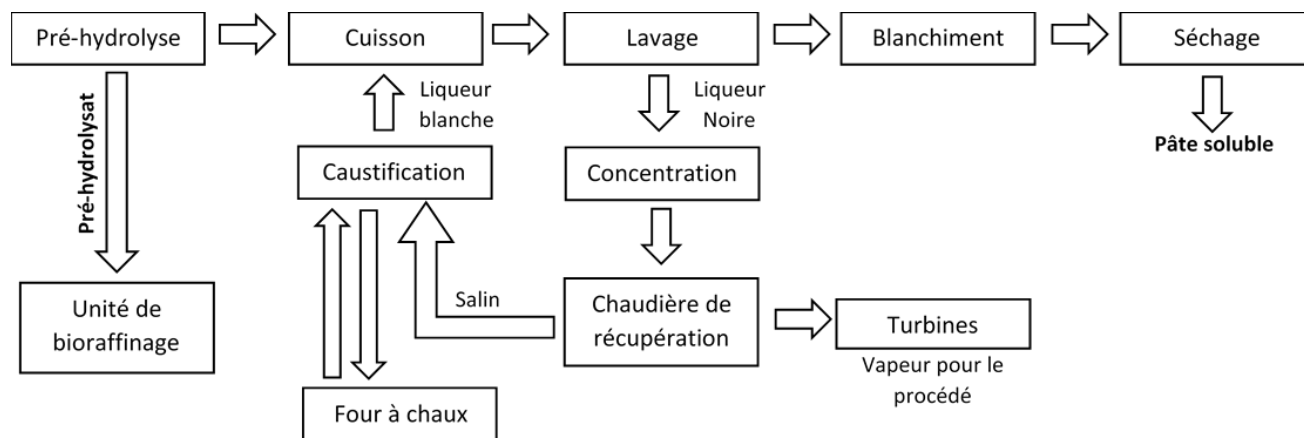


Figure 2-3 Procédée Kraft avec l'étape de préhydrolyse

Ce courant comporte donc principalement des hémicelluloses, un polysaccharide branché composé essentiellement de xylose et de glucose, pour le mélange 60 % tremble et 40 % érable utilisé dans ce projet, mais dont la composition peut changer selon les espèces d'arbres utilisées dans le procédé. Ce mélange comporte une variété d'inhibiteurs, selon la méthode de préhydrolyse, qui ont été caractérisés. La présence de furfuraux, d'hydroxyméthylfurfural (HMF), d'acide acétique, mais surtout de composés phénoliques, comme l'acide gallique ou le syringaldéhyde, peut être problématique pour l'utilisation de ce substrat en présence de micro-organisme. Une détoxification du substrat est donc souvent nécessaire. De plus, l'hydrolyse classique des hémicelluloses à haute température requiert de l'acide sulfurique et crée encore plus d'inhibiteurs (Mechmech et al., 2015; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). Les sucres issus des hémicelluloses du procédé Kraft ont été utilisés lors de plusieurs essais du bioprocédé de production de biobutanol (Baral and Shah, 2014; Mechmech et al., 2015). D'un autre côté, la lignine du procédé Kraft peut également être récupérée à partir de la liqueur noire afin d'obtenir d'autres bioproduits tel les fibres de carbone (Baker and Rials, 2013; Fu et al., 2013; Mainka et al., 2015). Une utilisation complète et optimisée des tous les courants possibles du procédé est donc envisagé et souhaitable.

2.2.2 Procédé de pâte thermomécanique

Le procédé de pâte thermomécanique classique a été modifié par FPIinnovations afin de favoriser l'extraction et la récupération des sucres issus de la cellulose et des hémicelluloses. Le procédé de pâte thermomécanique modifié débute par un prétraitement combinant des produits chimiques doux et un raffinage mécanique. Ensuite, une hydrolyse enzymatique est effectuée. L'hydrolyse est complexe et solubilise à la fois les xylanes et les glucanes présents dans le bois. Deux courants sont donc obtenus, un courant comportant la lignine hydrolysée et un courant comportant les sucres relativement purs. Le premier courant sera converti en lignine pure ou en bioproduit tandis que le deuxième courant sera utilisé principalement pour des fermentations. (Browne, 2012)

Les sucres ainsi obtenus sont presque exempts de composés inhibiteurs, contrairement aux hémicelluloses obtenues avec le procédé Kraft. Une préparation du substrat sans détoxification est donc possible par la suite. Ce substrat est donc optimal pour la revalorisation biotechnologique.

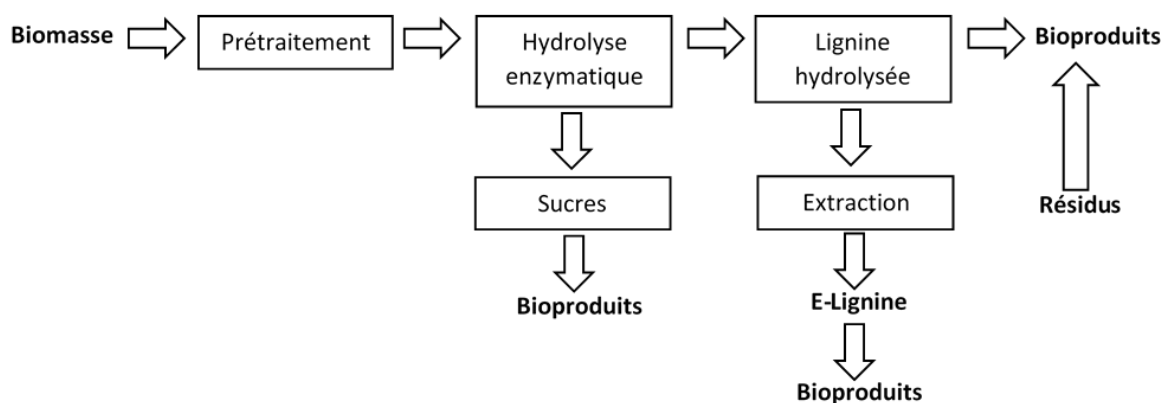


Figure 2-4 Procédé de pâte thermomécanique

2.3 Substrat provenant de l'industrie agroalimentaire

Le substrat provenant de l'industrie agroalimentaire est obtenu par le procédé industriel résumé à la figure 2-5.

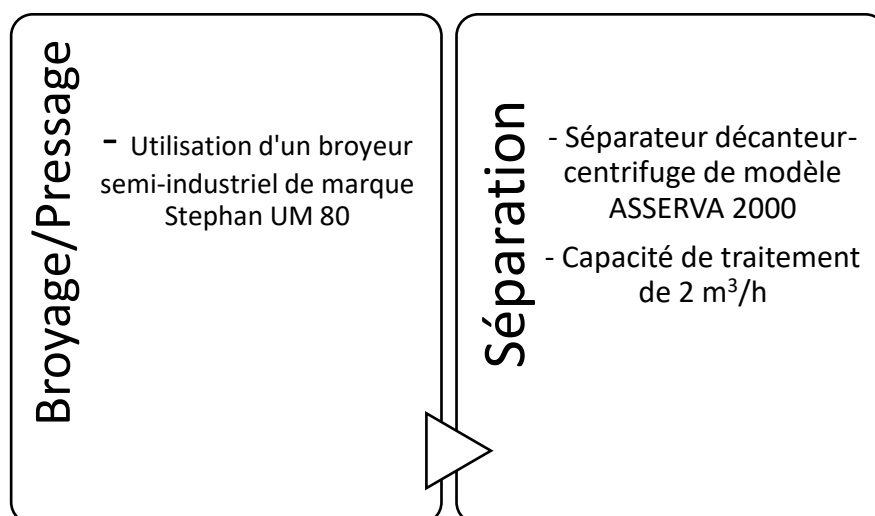


Figure 2-5 Procédé d'obtention du substrat provenant de l'industrie agroalimentaire

Le substrat provenant de l'industrie agroalimentaire peut être utilisé pour une variété d'utilisation. En effet, celui-ci permet la récupération d'huiles essentielles, présent dans la partie plus solide du mélange. De plus, la partie liquide peut, quant à elle, être concentrée et vendue comme mélange de sucres concentrés.

2.4 Analyse critique de la littérature

La production d'acide lactique comporte de nombreuses voies déjà explorées. Ainsi, différentes sources de sucres ont déjà été testées pour les bioprocédés de production d'acide lactique. Parmi ces sources, la biomasse lignocellulosique est bien représentée. En effet, l'hydrolysat de bois ainsi que les eaux usées papetières ont, respectivement, un rendement maximal de 0,98 g d'acide lactique/g d'hydrate de carbone et de 0,97 g d'acide lactique/g d'hydrate de carbone (Marques et al., 2008; Wee and Ryu, 2009). Puisque ces rendements de production sont comparables à ceux obtenus lors de la fermentation du glucose, un sucre hautement fermentescible (Abdel-Rahman et al., 2013). Il est donc intéressant d'investiguer quant à l'efficacité de substrat semblable, mais provenant d'autres sources de l'industrie papetière, ceux décrits à la section 2.2.. Dans cette

optique, l'utilisation des substrats de l'industrie des pâtes et papiers pour la production d'acide lactique a été examinée dans ce projet de maîtrise.

D'un autre côté, la biomasse agroalimentaire est omniprésente lors des recherches sur la fermentation lactique. Une grande variété de biomasses agroalimentaire peut être utilisée comme substrats carbonés pour ces fermentations. La plupart de ces substrats comportent des polysaccharides et une hydrolyse préalable de la biomasse est nécessaire avant son utilisation. On y retrouve le maïs, les patates douces, le manioc (Lu et al., 2010; Pagana et al., 2014; Piassi et al., 2016; Rojan et al., 2005). Une saccharification est souvent effectuée en parallèle par le même micro-organisme (Hofvendap, 2000; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Ping et al., 2005). La compétition avec le secteur alimentaire pour les substrats agroalimentaires est très importante, puisqu'il peut s'agir d'un substrat à la fois efficace et peu coûteux (Lu et al., 2010). L'utilisation des résidus agroalimentaires est donc plus attrayante, car celle-ci permet l'obtention des mêmes avantages que les substrats agroalimentaires classiques, comme le maïs, tout en évitant la compétition avec le secteur alimentaire. De plus, les normes régissant la gestion des déchets résiduels organiques imposeront aux agriculteurs ou aux marchés d'alimentation de disposer adéquatement de leur rejet, ce qui est une bonne source d'approvisionnement en résidus agroalimentaires abordables (Gendron et al., 2012). Certaines entreprises partenaires cherchent donc des façons simples et économiquement viables de se départir de leur rejet. Il est donc intéressant de vérifier l'efficacité de ces rejets pour la production d'acide lactique.

CHAPITRE 3 OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

3.1 Objectifs

Dans un contexte où le marché mondial de l'acide lactique est fortement en hausse, la production de ce bioproduit plateforme est une valeur sûre à court et à long terme (MarketsandMarkets, 2015). D'un autre côté, l'industrie papetière cherche à trouver de nouvelles alternatives pour se démarquer

de la compétition et augmenter sa marge de profit. L'industrie agroalimentaire cherche, quant à elle, à éviter les rejets de déchet organique, dû aux nouvelles normes gouvernementales (Gendron et al., 2012). La combinaison de ces facteurs entraîne une question : pourquoi ne pas utiliser les substrats disponibles dans l'industrie papetière et dans l'industrie agroalimentaire afin d'effectuer la fermentation lactique et donc de produire de l'acide lactique.

L'objectif général de ce projet de recherche est de valoriser des résidus agroalimentaires et des courants de procédé de l'industrie papetière afin de développer un procédé biotechnologique simple et efficace pour la production d'acide lactique à haut rendement.

Pour atteindre cet objectif, il est important de :

- caractériser les différents types de résidus ou de courants industriels disponibles (résidus agroalimentaires et courants de l'industrie papetière);
- déterminer l'efficacité de ces différents types de substrats comme source de carbone dans la fermentation lactique;
- déterminer les ajouts azotés et minéraux importants à additionner aux substrats afin d'augmenter le rendement de production.

L'hypothèse envisagée est que les sucres présents dans les substrats industriels proposés peuvent, avec certains ajouts, être efficace pour la production de l'acide lactique. L'hypothèse sera réfutée si les rendements de production obtenus avec ces substrats sont inférieurs à ceux retrouvés dans la littérature pour des souches microbiennes comparables et un substrat semblable. L'originalité de cette question repose sur la nature des substrats industriels qui nous sont directement fournis par des partenaires industriels et qui sont par le fait même uniques et jamais testés auparavant pour la production d'acide lactique.

3.2 Méthodologie

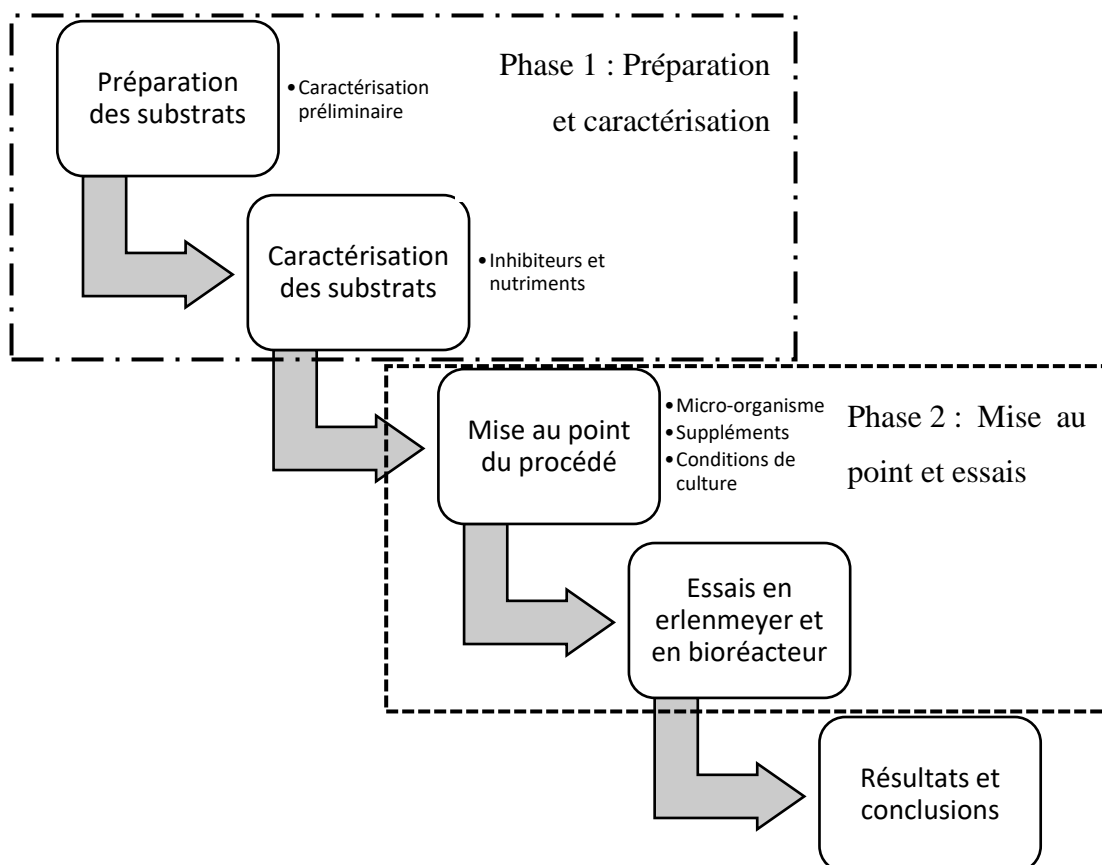


Figure 3-1 Méthodologie générale du projet

Pour atteindre l'objectif fixé pour ce projet, il est essentiel de réaliser des essais de fermentation en erlenmeyer et en bioréacteur et d'analyser les résultats ainsi obtenus. Les essais en erlenmeyer sont plus abordables que ceux réalisés en bioréacteur et permettent d'obtenir des résultats fiables avant d'aller en plus gros volume et ils donnent plusieurs informations importantes pour la conception du procédé. Par contre, plusieurs aspects peuvent différer lors des étapes en bioréacteur, car la conception de ceux-ci peut entraîner des différences dans les résultats. Les étapes de recherche ne peuvent se faire sans la mise au point préalable du procédé. Lui-même est régi par la nature même des substrats qui doivent donc être caractérisés au préalable et ceux-ci doivent être préparés afin d'optimiser leurs performances futures.

Les principales étapes de ce projet sont donc élaborées et seront discutées en détail dans les différents chapitres leur étant attribués.

CHAPITRE 4 PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DU SUBSTRAT

4.1 Méthodologie

4.1.1 Préparation des substrats

4.1.1.1 Préparation du substrat du procédé Kraft

Plusieurs étapes sont nécessaires pour la préparation du substrat du procédé de pâte et papier Kraft à sa réception (Figure 4-1). Celui-ci est fourni par FPInnovations. Le préhydrolysats est obtenu lors du procédé Kraft, à l'étape de la préhydrolyse de copeaux de trembles et d'érables (60 % et 40 %, respectivement). Une étape d'hydrolyse chimique est d'abord nécessaire afin de libérer les monosaccharides. Ensuite, une première détoxification chimique, par floculation, est effectuée, puis une deuxième détoxification, enzymatique cette fois, est réalisée (figure 3-1). Une filtration est effectuée en amont du procédé afin de concentrer les sucres (3X). Cette filtration est effectuée sur une membrane organique NF-270 (Ajao et al., 2015; Allard-massicotte et al., 2017; Mechmech et al., 2015). Les ajustements de pH sont contrôlés par le pH-mètre Accumet AB250 de Fisher Scientific.

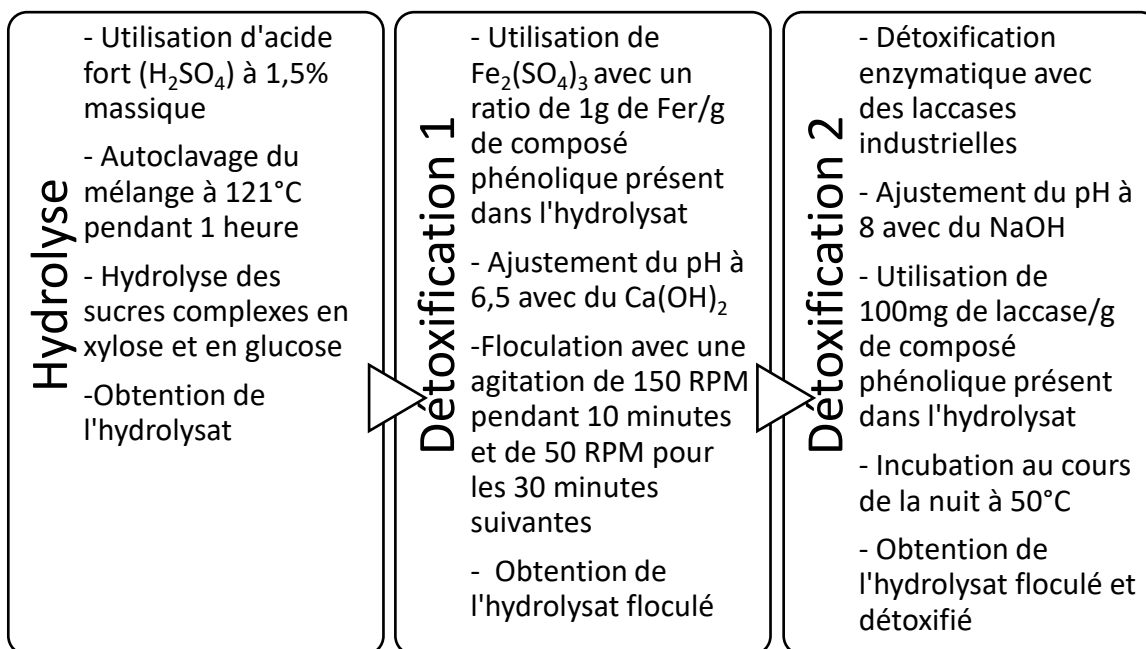


Figure 4-1 Processus de préparation du substrat issu du procédé Kraft

Le substrat maintenant nommé « hydrolysats Kraft » est donc obtenu.

4.1.1.2 Préparation du substrat du procédé de pâte thermomécanique

Ce substrat est également fourni par FPInnovations et est composé de la partie « sucres » obtenue suite à l'hydrolyse enzymatique. Lors de la réception du substrat provenant du procédé de pâte thermomécanique, l'hydrolyse des sucres a déjà été préalablement effectuée. Les seules manipulations à effectuer sont donc celles inhérentes à l'utilisation du milieu en fermentation et elles seront décrites au Chapitre 5.

Le substrat est nommé « Hydrolysats de pâte thermomécanique ».

4.1.1.3 Préparation du substrat issu des résidus agroalimentaires

Lors de la réception du substrat issu des résidus agroalimentaires, le substrat est plutôt hétérogène et contient deux phases, une phase liquide et une phase solide. Une étape de mélange est donc nécessaire et est effectuée dans un mélangeur de cuisine conventionnel. Le mélange est ensuite centrifugé (à la vitesse maximale pour 15 minutes) et la fraction claire est utilisée. Ce mélange est déjà composé de sucres fermentescibles et ne subira donc pas d'étapes subséquentes de préparation.

Le substrat est nommé « résidus agroalimentaires ».

4.1.2 Caractérisation des substrats

La caractérisation des substrats a été effectuée en utilisant le parc d'appareils analytiques du Centre National en Électrochimie et en Technologies Environnementale (CNETE). Ce Centre Collégial de Transfert Technologique (CCTT) est situé à Shawinigan, plus précisément dans les locaux du Collège Shawinigan. Les méthodes utilisées sont développées et optimisées par le CNETE et donc propres à ce centre de recherche.

4.1.2.1 Composés phénoliques

Comme il a été démontré que les composés phénoliques étaient non seulement présents dans l'hydrolysat Kraft, mais que ce sont aussi des importants inhibiteurs de fermentation, l'analyse de ceux-ci a été effectuée. Pour ce faire, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été utilisée. Le chromatographe liquide à haute performance est de marque Agilent Technologie et de modèle 1260 infinity. Les composés phénoliques détectés par cette méthode sont le catéchol, le syringaldéhyde, l'acide gallique et la vanilline. Une colonne Nucleosil C18 (150 mm X 4,6 mm) a été utilisée avec un solvant composé de 15 % d'acétonitrile et de 85 % d'acide phosphorique 10mM. La dilution des échantillons a été effectuée dans le même solvant. Le HPLC

était couplé avec un détecteur de type barrette de diode à des longueurs d'onde de 313 nm et 280 nm.

Une autre méthode a été utilisée pour déterminer la concentration en composés phénoliques totale et pas seulement des quatre mentionnés plus haut. La méthode avec le réactif de Folin-Ciocalteu a donc été utilisée (Singleton and Rossi, 1965). En résumé, 500 μ L d'échantillon contenant des phénols réagissent pendant 3 minutes avec 200 μ L de réactif, et ce dans un solvant d'eau déminéralisée (3800 μ L). Ensuite, 500 μ L d'hydroxyde de sodium sont ajoutés et le mélange est laissé pendant une heure dans l'obscurité. Une lecture en spectrographie à 725 nm est ensuite rapidement effectuée et les résultats comparés à la courbe standard. Le spectrophotomètre utilisé est de marque Pharmacia Biotech et de modèle Novaspec II.

4.1.2.2 Sucres

Les sucres sont une composante des substrats étudiés, car ils sont la source directe d'énergie des micro-organismes responsables de la production d'acide lactique. Plusieurs types de sucres sont probables et une analyse préliminaire a été tout d'abord effectuée. Celle-ci, tout comme les analyses qualitatives subséquentes, a été effectuée sur le même chromatographe liquide à haute performance (HPLC) que précédemment avec une colonne EC Nucleodur RP-NH₂ (250 mm X 4,6 mm, 5 μ m) et un détecteur de type barrette de diode. Le solvant utilisé pour les analyses était composé de 75 % d'acétonitrile, tandis que le solvant pour la dilution des échantillons était plutôt composé de 50 % d'acétonitrile. L'analyse préliminaire consiste à comparer les temps de rétention de plusieurs types de sucres avec ceux obtenus dans nos échantillons. Pour s'assurer de la concordance, il est possible d'ajouter une certaine quantité de ces sucres à nos échantillons afin de comparer l'intensité des pics dans les chromatogrammes et donc de vérifier nos conclusions. Ensuite, une courbe standard est créée avec les sucres déterminés et les analyses quantitatives sont effectuées.

4.1.2.3 Acides organiques

L'analyse des acides organiques est essentielle, puisque la production de ceux-ci est l'objectif premier de ce projet de maîtrise. L'acide lactique est l'acide organique ciblé, mais la fermentation acide mixte, causée par une limitation en glucose, peut induire la production d'autres acides organiques, principalement l'acide acétique (Hofvendap, 2000). Afin de détecter les acides dont le coefficient de dissociation acide (pKa) est bas, les échantillons sont dilués dans de l'acide sulfurique 0,008N (ou 0,08 N, si besoin). L'acide sulfurique 0,008N est également utilisé comme solvant dans la méthode. Les acides organiques sont détectés par un détecteur de type barrette de diode et séparés dans une colonne Agilent Hi-Plex H chauffée à 55 °C, sur le même HPLC que précédemment. Un détecteur à indice de réfraction peut également être utilisé pour certains acides, celui-ci est alors chauffé à 40 °C.

4.1.2.4 Minéraux

Les minéraux sont une composante essentielle dans une fermentation, car ils sont souvent des cofacteurs importants d'enzyme. En particulier, il a été démontré que le magnésium et le manganèse étaient particulièrement importants dans la fermentation lactique (Cui et al., 2012). Un spectrophotomètre à plasma à couplage inductif (ICP) a été utilisé pour la mesure de plusieurs minéraux. Cet ICP était de marque PerkinElmer et du modèle Optima 4300 DV. Le détecteur est un « Segmented-array Charge-coupled-device Detector » (SCD). L'aluminium, le calcium, le cuivre, le fer, le potassium, le lithium, le magnésium, le manganèse, le sodium, le nickel, le plomb, le soufre et le zinc sont dosés par la méthode utilisée. Les longueurs d'onde utilisées pour l'analyse sont : Al : 396,153 nm, Ca : 317,933 nm, Cu : 327,393 nm, Fe : 238,204 nm, K : 766,490 nm, Li : 670,784 nm, Mg : 285,213 nm, Mn : 257,610 nm, Na : 589,592 nm, Ni : 231,604 nm, Pb : 220,353 nm, S : 181,975 nm et Zn : 206,200 nm.

Chacun des échantillons est préalablement acidifié ou digéré, dans le cas d'un échantillon solide, avec de l'acide nitrique. Le débit de la pompe d'échantillonnage est 1,50 mL/min, le débit du gaz

pour le plasma est de 15 L/min, le débit du gaz auxiliaire est de 0,2 L/min et le débit du gaz pour le nébuliseur : 0,80 L/min. La fréquence radio du plasma utilisé est de 1300W.

4.1.2.5 D-Limonène

Presque exclusivement présent dans les agrumes, ce composé semble inhiber significativement la croissance bactérienne, spécialement chez les *Lactobacillus* (Bevilacqua and Corbo, 2010). La présence de cet inhibiteur pourrait donc s'avérer problématique. Le limonène est détecté dans un chromatographe à phase gazeuse (GC) de marque Agilent Technologies et du modèle 7890A et avec une colonne OV624. Le détecteur à indice de réfraction est maintenu à une température de 300 °C et le four suit la gamme de température présentée à la Figure 4-2. Le méthanol est utilisé comme solvant de dilution et d'éluion (Davidowski and Brian, 2009; Williams and Pierce, 1998).

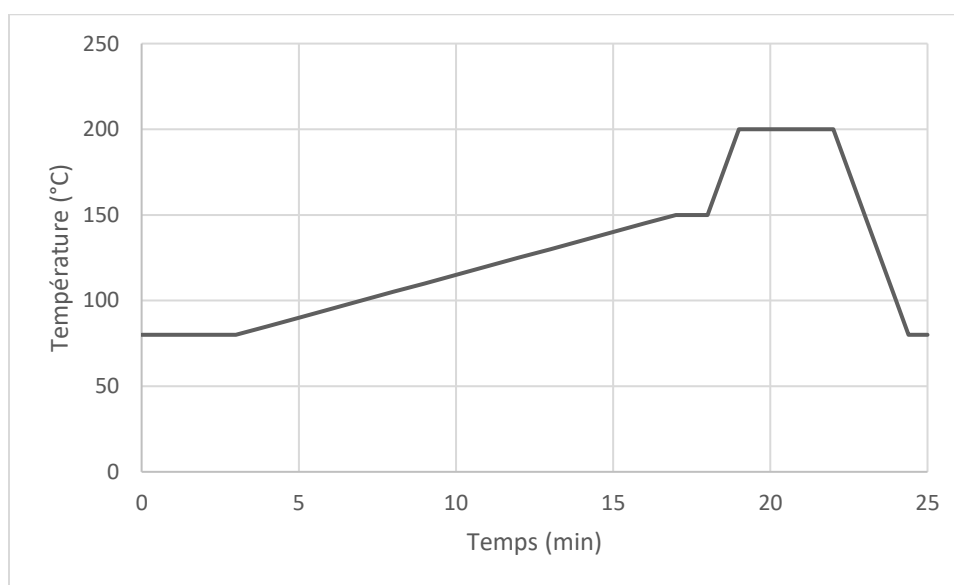


Figure 4-2 Programmation de température du four du GC pour l'analyse du limonène

4.1.2.6 Carbone organique total (COT)

Le carbone organique total est une mesure du carbone présent dans l'échantillon, autant les formes facilement oxydables que les formes très difficilement altérables. Pour ce faire, un appareil COT est utilisé. Celui-ci est de marque Shimadzu et de modèle TOC-L CPH. Cet appareil permet une combustion totale du carbone. Pour ce faire, l'oxydation se produit à 680 °C et est catalysée par la présence d'oxygène pur. Du CO₂ est donc obtenu proportionnellement à la quantité initiale de carbone et le CO₂ est quantifié à l'aide d'un détecteur infrarouge et d'une courbe standard. La dilution des échantillons est donc effectuée dans l'eau pure, afin d'éviter la contamination par d'autres composés carbonés.

4.1.2.7 Azote total Kjeldap

Tout comme les sucres et les minéraux, l'azote est l'un des éléments essentiels pour une fermentation réussie. L'azote total est quantifié grâce à la méthode de Kjeldap et de l'appareil à distillation Kjeltec 3200 (autodistillation unit). L'azote est d'abord minéralisé avec de l'acide sulfurique et un catalyseur de sulfate de cuivre. L'azote est donc sous sa forme NH₄⁺ et l'ajout de NaOH provoque la formation de vapeurs d'ammoniac. Celles-ci sont ensuite condensées dans un mélange d'acide borique, de rouge de méthyle et de bleu de bromothymol. L'ammoniac est donc retenu sous sa forme acide et il est titré avec de HCl.

4.1.2.8 Hydroxyméthylfurfural et furfuraux

L'hydroxyméthylfurfural (HMF) et les furfuraux sont des molécules inhibitrices à haute concentration, bien que moins inhibitrices que les composés phénoliques (Mechmech et al., 2015). Il est donc essentiel de les quantifier. Il est possible de le faire par HPLC, le même que précédemment. Pour ce faire, la même colonne et le même détecteur que pour les composés phénoliques, soit, respectivement, la Nucleosil C18 et le détecteur de type barrette de diode, sont

utilisés. L'élution est effectuée avec un solvant composé de 84 % d'acétonitrile, de 1 % d'acide acétique et de 15 % d'eau pure. La dilution des échantillons est effectuée dans de l'eau pure.

4.2 Résultats de la caractérisation

4.2.1 Hydrolysat Kraft

La caractérisation de l'hydrolysat Kraft permet de mettre en évidence la présence de xylose comme sucre fermentescible principal. De plus, la quantité faible d'azote déterminé est problématique, puisque c'est un des nutriments essentiels à la croissance et à la production d'acide lactique chez les micro-organismes, spécialement chez les homofermentaires, qui produisent parfois des acides mixtes en condition de manque. La quantité de composés phénoliques présents dans l'hydrolysat Kraft peut être problématique, bien que la dose inhibitrice sur les souches productrices d'acide lactique n'ait pas été démontrée (tableau 4-1). Cette caractérisation est effectuée sur l'hydrolysat doublement détoxifié (méthode chimique et méthode enzymatique) et non filtré. Les variations du substrat seront expliquées dans les sections suivantes.

Tableau 4-1 Caractérisation de l'hydrolysat de bois du procédé Kraft

Paramètres	Valeurs
Xylose (g/L)	18,1
Glucose (g/L)	1,06
Phénols totaux UV/visible (g/L)	0,80
Carbone Organique Total (g/L)	21,1
Azote Total Kjeldap (g/L)	0,04
Acide lactique (g/L)	0,47
Acide acétique (g/L)	4,50
Acide propionique (g/L)	0,03
HMF (PPM)	112
Furfural (PPM)	411
Acide Gallique (PPM)	23,1
Catechol (PPM)	370
Vanilline (PPM)	39,8
Syringaldéhyde (PPM)	45,4
pH	8,00

De façon générale, l'hydrolysat Kraft comporte une grande quantité de calcium, de sodium et de soufre. Ces éléments peuvent s'expliquer par le procédé de préparation de l'hydrolysat Kraft, qui comporte à la fois un ajustement de pH avec du $\text{Ca}(\text{OH})_2$, un ajustement de pH avec du NaOH et une acidification avec de l'acide sulfurique. Par contre, une trop grande quantité de ces minéraux, spécialement le sodium et le calcium, peut être préjudiciable. Le magnésium, le manganèse et le potassium sont également retrouvés dans l'hydrolysat Kraft, ce qui est avantageux pour les fermentations, car ce sont des nutriments essentiels, spécialement le magnésium et le manganèse.

Tableau 4-2 Caractérisation minérale de l'hydrolysat du procédé Kraft

Minéraux (ppm)	
Ca	4220
K	322
Mg	177
Mn	22
Na	143
S	356

4.2.2 Hydrolysat de pâte thermomécanique

Dans l'hydrolysat de pâte thermomécanique, on retrouve une grande quantité de sucres, soit 53,3 g/L de xylose et 105,7 g/L de glucose. Cette quantité de sucre est la plus importante parmi nos trois substrats et indique donc un bon potentiel de production d'acide lactique. Par contre, la quantité d'azote est relativement faible et nécessitera donc l'ajout d'un supplément azoté tel de l'extrait de levure ou des peptones. Le substrat semble également contenir peu de composés phénoliques des autres molécules inhibitrices du bois (HMF-furfural). Il est possible de noter la petite quantité de minéraux présents dans l'hydrolysat de pâte thermomécanique et une supplémentation sera sûrement nécessaire, surtout pour le magnésium et le manganèse.

Tableau 4-3 Caractérisation de l'hydrolysat de pâte thermomécanique

Paramètres	Valeurs
Xylose (g/L)	53,3
Glucose (g/L)	105,7
Phénols totaux UV/visible (g/L)	0,77
Carbone Organique Total (g/L)	60,8
Azote Total kjeldap (g/L)	0,30
Acide lactique (g/L)	2,08
Acide acétique (g/L)	2,48
Acide propionique (g/L)	0,19
Acide Butyrique (g/L)	0,18
HMF (PPM)	0,14
Furfural (PPM)	4,28
Vanilline (PPM)	0,51
Syringaldéhyde (PPM)	0,21
pH	4,8

Tableau 4-4 Caractérisation minérale de l'hydrolysat de pâte thermomécanique

Minéraux (ppm)	
Ca	227
Fe	0,41
K	74
Mg	35
Mn	1,2
Na	1800
S	110
Zn	1,6

4.2.3 Résidus agroalimentaires

Les résidus agroalimentaires comportent une fraction liquide et une fraction solide. La phase liquide est celle contenant les sucres fermentescibles, puisque ceux-ci sont solubles, mais la partie solide peut contenir certains minéraux essentiels et est donc caractérisée à cet effet. En observant la couleur et la texture du mélange, il est possible de penser qu'il y a une forte présence d'agrumes dans celui-ci. De plus, l'odeur caractéristique de ceux-ci est évidente.

Les sucres présents dans le substrat sont le saccharose, le fructose et le glucose. Ceux-ci sont habituellement hautement fermentescibles, spécialement le glucose et le fructose. Le saccharose est un dimère combinant un fructose et un glucose et nécessite un clivage pour être consommé. En général, la quantité de composés phénoliques présents dans les résidus agroalimentaires est plus élevée que dans l'hydrolysate Kraft et l'hydrolysate de pâte thermomécanique. Par contre, la nature de ces composés phénoliques indique qu'il s'agit de composés phénoliques différents de ceux retrouvés dans le bois. En effet, on retrouve peu ou pas d'acide gallique, de syringaldéhyde, de catechol et de vanilline. Pouvant également avoir un effet inhibiteur, les autres composés phénoliques sont souvent antimicrobiens et sont donc à considérer pour la suite. Le limonène, un hydrocarbure terpénique, peut aussi être un puissant agent antimicrobien et présent de façon naturelle dans les agrumes, est retrouvé en grande quantité dans le mélange de résidus agroalimentaire récupérée. La quantité d'azote totale présente dans le substrat est très faible et le milieu devra probablement être supplémenté de ce nutriment.

Tableau 4-5 Caractérisation générale des résidus agroalimentaires

Paramètres	Valeurs
Xylose (g/L)	0,10
Fructose (g/L)	18
Glucose (g/L)	20
Saccharose (g/L)	27
Phénols totaux UV/visible (g/L)	1,1
Carbone Organique Total (g/L)	47
Azote Total kjeldap (g/L)	0,80
Acide lactique (g/L)	0,25
Acide acétique (g/L)	0,10
Acide propionique (g/L)	0,31
HMF (PPM)	2,1
Furfural (PPM)	0,50
Acide Gallique (PPM)	0,00
Catechol (PPM)	31
Vanilline (PPM)	0,10
Syringaldéhyde (PPM)	1,0
Limonène (g/L)	2,0
pH	2,5

Les minéraux présents dans les résidus agroalimentaires sont souvent nécessaires comme oligo-éléments pour les micro-organismes. Ceux-ci peuvent être un cofacteur enzymatique dans une voie importante pour la production d'acide lactique ou être un important élément d'une vitamine. Le magnésium et le manganèse semblent jouer un rôle important dans la production d'acide lactique (Cui et al., 2012).

Tableau 4-6 Caractérisation minérale des résidus agroalimentaires

Minéraux Fraction liquide (ppm)		Minéraux Fraction Solide (ppm)	
Ca	212	Ca	339
K	1670	K	1659
Mg	93,4	Mg	92,3
Mn	11,3	Mn	<LD
Pb	<LD	Pb	62,5
S	69,2	S	92,8

Excepter pour le plomb, il ne semble pas avoir de différence énorme entre la fraction liquide et la fraction solide des résidus agroalimentaires. Une supplémentation avec la fraction solide semble donc être superflue, d'autant plus qu'une fraction solide complique les étapes de fermentation et de purification subséquentes.

CHAPITRE 5 FERMENTATION LACTIQUE

5.1 Méthodologie de mise au point du procédé

Pour la production d'acide lactique, plusieurs facteurs sont critiques. Dans ce projet, la contrainte de l'utilisation des substrats complexes est présente et déterminera les autres aspects critiques du projet.

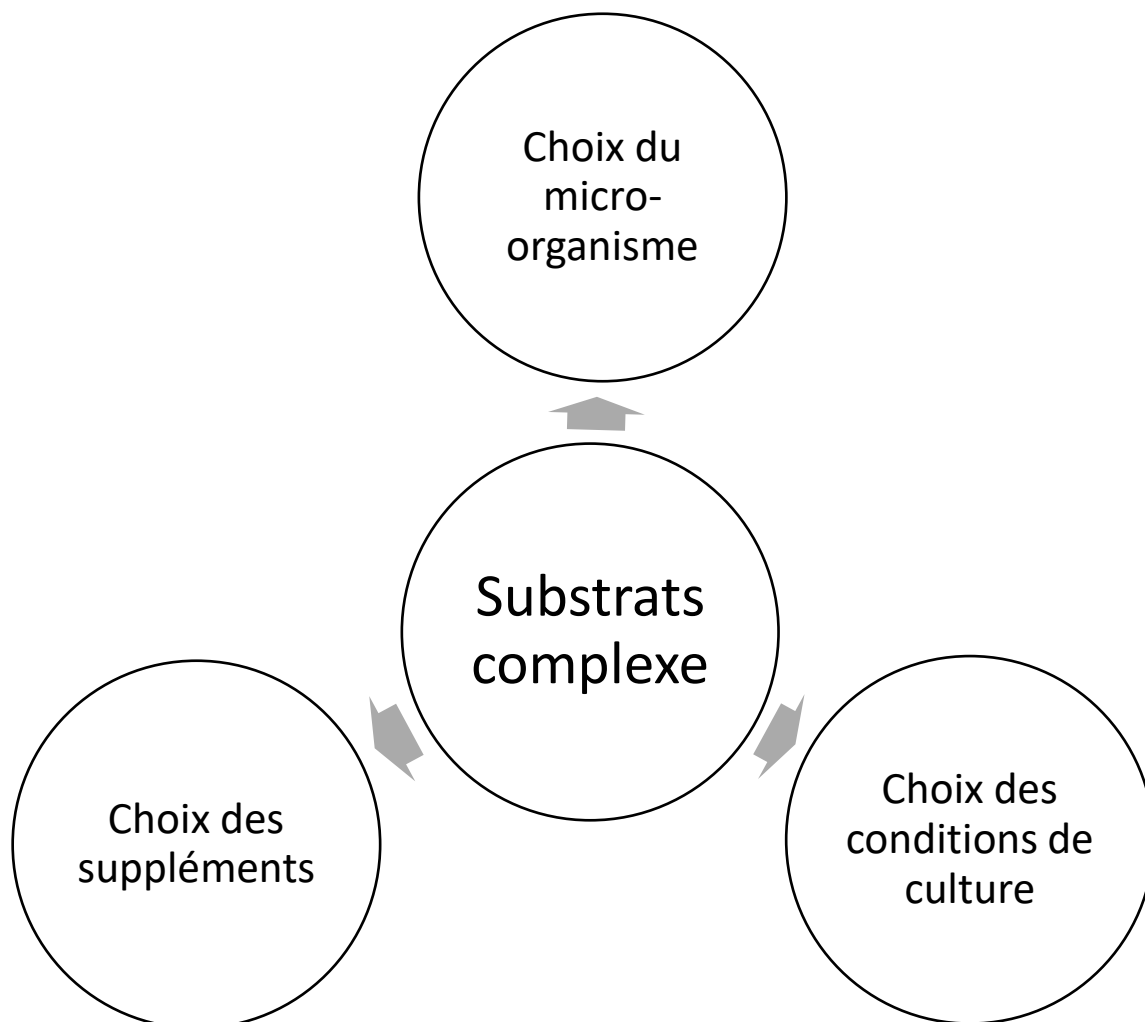


Figure 5-1 Importance de la contrainte de substrats dans l'élaboration de plusieurs aspects critiques de la production d'acide lactique

5.1.1 Choix du micro-organisme

Un des aspects les plus critiques du bioprocédé de production d'acide lactique est le choix du micro-organisme producteur. En effet, celui-ci déterminera non seulement la quantité maximale d'acide lactique, mais aussi le mode de fermentation utilisé. Comme discuté précédemment, une fermentation homofermentaire permet une production d'acide lactique plus pur et donc des étapes de purifications simplifiées, de même qu'une culture pure. De plus, le micro-organisme choisi doit être polyvalent par rapport à la source de carbone utilisé et donc aux différents types de substrats

étudiés. Un micro-organisme capable de métaboliser à la fois le fructose, le glucose, le saccharose et le xylose sera recherché.

Un micro-organisme facile à utiliser et bien documenté facilite grandement le travail de mise au point des protocoles et de comparaison des résultats avec la littérature. Dans cette optique, un micro-organisme modèle ou provenant d'une collection de souche est recommandé.

En prenant en compte tous ces facteurs, la souche choisie fut *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Cette souche typique est contenue dans une banque de souche réputée (ATCC). C'est un probiotique et il est donc non pathogène. La possibilité pour les entreprises d'avoir un coproduit, soit la biomasse, est très attrayante. De plus, certains essais ont démontré l'utilisation du xylose par cette souche et donc, par extension, la possibilité d'utilisation de l'hydrolysate Kraft comme source de nutriment (Marques et al., 2008). Celle-ci a également un bon rendement de production avec le glucose est une bactérie facilement cultivable (Hofvendap, 2000).

5.1.2 Choix des conditions de culture

Puisque les substrats complexes sont déjà hydrolysés ou sous forme de sucres simples naturellement, l'utilisation d'une fermentation et une saccharification simultanées serait un choix inutile et coûteux. De même, l'immobilisation des cellules n'a pas démontré suffisamment de bons résultats pour justifier la complexification de la fermentation et donc d'augmenter les risques d'erreurs. Étant intrinsèquement liées au choix de la souche, les conditions de culture sont critiques pour le bon fonctionnement de la fermentation lactique. Comme les choix de culture en erlenmeyer et en bioréacteur 1L ont été faits, les conditions les plus importantes à déterminer sont :

- La température;
- Le pH;
- L'oxygène dissous et l'agitation;
- L'ajout de substrat.

5.1.2.1 La température

Dans la littérature, les températures de fermentation utilisées varient entre 35 °C et 42 °C et la température la plus efficace pour la production d'acide lactique semble être 37 °C (Cui et al., 2012; Livia et al., 2015; Pejin et al., 2015). Une température de 42 °C va induire une plus grande production de biomasse, ce qui est intéressant dans le cas où la production de probiotique est visée. Par contre, dans notre cas, la production d'acide lactique est privilégiée à la production de biomasse et une température de 37 °C sera donc choisie.

5.1.2.2 Le pH

Dans cette fermentation, l'aspect du pH est plus problématique. En effet, une production d'acide lactique optimale s'effectuera à un pH entre 6 et 7, mais la plupart des industries choisissent de maintenir leur fermentation à un pH plus bas, soit de 5 (Gonc, 1997; Mojovic et al., 2012; Pagana et al., 2014; Pejin et al., 2017). Il est important de mentionner qu'un pH sous 5.5 allonge le temps de fermentation, et peut aussi diminuer le rendement de production d'acide lactique (Gonc, 1997). Dans cette optique, un pH de 6,5 a été choisi comme pH initial. Par la suite, pour conserver le plus longtemps possible un pH près de celui-ci, un agent tampon très utilisé a été ajouté, le carbonate de calcium (CaCO_3). En effet, l'ajout de ce stabilisateur de pH permet de limiter l'abaissement du pH et donc d'avoir des concentrations finales en acide lactique bien plus hautes (Marques et al., 2008; Mojovic et al., 2012; Pejin et al., 2017, 2015). La concentration de carbonate de calcium choisie est 30 g/L, respectant la quantité utilisée dans les expérimentations de Marques et al (2008). En bioréacteur 1,3L, la quantité de carbonate de calcium peut être moindre, puisque le pH est ajusté automatiquement avec du NaOH 6N. La concentration choisie est donc de 15 g/L initialement et le pH est contrôlé à 6,5.

5.1.2.3 Oxygène dissous

L'oxygène dissous requis pour la fermentation lactique avec *Lactobacillus rhamnosus* semble très peu documenté. Par contre, des conditions d'aérobies douces sont, pour la plupart du temps, utilisées (Lopes et al., 2013). Pour cette raison, une agitation de 130 RPM sera utilisée afin de fournir un apport constant en oxygène, sans créer d'excès de celui-ci. De plus, un essai préliminaire sans aération n'a pas produit de croissance. En bioréacteur, une aération de 1vvm, mais avec une agitation douce à 100 RPM sera choisie. L'oxygène dissous ne sera pas contrôlé avec une cascade d'agitation et un seuil minimal d'oxygène.

5.1.2.4 L'ajout de substrat

L'ajout de substrat, aussi appelé « Fed-Batch » est utilisée seulement lors de l'essai en bioréacteur de 1,3 L avec les résidus agroalimentaires. Cet essai a pour but de réduire l'effet inhibiteur du limonène sur la fermentation. Pour cet essai, 400 mL du substrat dilué 1/3 est ajouté dans le bioréacteur, puis 500 mL de résidus agroalimentaires purs sont ajoutés avec un débit de 1,4 mL/min, entre le temps 22 h et le temps 28 h. Le substrat est complété d'azote à la même concentration qu'indiqué à la section suivante. La méthode complète de fermentation en bioréacteur fera l'objet d'un résumé dans la section 5.2.3.

5.1.3 Choix des suppléments

Puisqu'il a été démontré que le magnésium et le manganèse haussaient significativement la quantité d'acide lactique produite et agissent en synergie, un supplément automatique de ces deux minéraux a donc été ajouté au milieu de culture. Le magnésium et le manganèse semblent avoir un impact important sur la voie des pentoses-phosphates et visent précisément plusieurs enzymes de cette voie métabolique afin d'en faciliter la liaison avec leur substrat (Lew et al., 2013).

Puisque les *Lactobacillus* nécessitent normalement une importante quantité d'azote dans leur milieu de culture et que l'ajout de suppléments azotés semble donc avoir des effets très positifs sur la production d'acide lactique (Cui et al., 2012).

De plus, la composition du milieu standard de *L. rhamnosus*, soit le Lactobacilli MRS, contient à la fois de l'extrait de levure, de l'extrait de bœuf, du magnésium sous forme de $MgSO_4$ et du manganèse sous forme de $MnSO_4$. On a donc un milieu de culture choisi avec les ajouts de composé suivant :

Tableau 5-1 Composition en minéraux et en composés azotés du milieu de culture

Composition	Quantité (g/L)
MgSO₄ heptahydrate	1,0
MnSO₄ monohydrate	0,78
Extrait de bœuf	10
Extrait de levure	5,0
CaCO₃	30

5.2 Essais en Erlenmeyer et en bioréacteur

La plupart des essais ont été effectués en erlenmeyer de 1 L et avec 500 mL du substrat complexe à tester. Dans le cas, décrit à la section 5.1.4.3., les essais ont été effectués dans des bioréacteurs 1,3 L de marque Eppendorf New-Brunswick et de modèle Bioflo 115. Tous les essais sont effectués en triplicata.

Les substrats ont été stérilisés avec l'ajout minéral dans un autoclave, directement dans leur contenant d'origine. Tous les ajouts azotés ont été stérilisés à part, par autoclavage, dans 30 mL d'eau distillée. Cette stérilisation supplémentaire est requise afin d'éviter la réaction de Maillard et donc la perte de certains sucres et composés azotés.

Des échantillons à des temps réguliers ont été prélevés. Les temps d'échantillonnage peuvent être modifiés selon les résultats obtenus de la fermentation et l'allure générale de celle-ci. Par exemple, si le premier essai effectué avec les résidus agroalimentaires présente une croissance et une modification du pH seulement après 48 h, moins d'échantillons seront effectués pendant ces premiers 48 h et plus lors du passage de ce seuil. Un volume maximal représentant 10 % du volume total de l'essai a été prélevé pour les échantillons afin de conserver un volume représentatif dans l'essai. Donc pour 500 mL, 50 mL d'échantillon ont été prélevés, au maximum. Pour chaque échantillonnage, dont la planification est à l'Annexe A, un décompte cellulaire, l'analyse du pH, l'analyse des sucres et l'analyse des acides organiques ont été effectués. De plus, au début et à la fin de chaque essai, l'analyse du carbone organique total et de l'azote total Kjeldap a été réalisée.

Le suivi de la quantité de micro-organismes sera effectué par ensemencement sur gélose *Lactobacilli* MRS. Chaque échantillon a été dilué de façon appropriée et 100 µL de celui-ci a été étendu avec des billes de verre stérile sur la gélose. Cette manipulation a été effectuée en triplicata et chaque pétri a été incubé pendant 48 h à 37 °C dans un incubateur à cet effet. Le nombre de colonies requis pour un comptage est entre 30 et 300. Le comptage des colonies a été effectué manuellement. En cas de discordance entre les pétris d'un même échantillon, l'ensemencement de cet échantillon a été recommencé.

Les autres analyses, soit l'azote total Kjeldap, le carbone organique total, les sucres, les acides organiques, et le pH ont été effectuées de la même manière que lors de la caractérisation du substrat.

5.2.1 Hydrolysat Kraft

Tableau 5-2 Essais liés à l'hydrolysat Kraft

Hydrolysat Kraft		Ratio Carbone/Azote
1	Milieu de référence MRS	6,3
2	Hydrolysat Kraft + minéraux et azote	17
3	Hydrolysat Kraft détoxifié + minéraux et azote	14
4	Hydrolysat Kraft 3X concentré et détoxifié + minéraux et azote	21
5	20 g/L xylose + suppléments + minéraux et azote	7
6	Hydrolysat Kraft + 20 g/L glucose + minéraux et azote	22
7	Hydrolysat Kraft détoxifié + 20 g/L glucose + minéraux et azote	20

Essai 1 : Le premier essai de ce projet est effectué dans un milieu de référence pour les *Lactobacillus*, le milieu Lactobacilli MRS. Ce milieu synthétique est l'un des plus standards pour la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* et il est donc important de l'utiliser comme référence.

Essai 2 : Par la suite, un essai avec l'hydrolysat Kraft standard non détoxifié a été effectué, puisque les sucres présents s'élèvent à environ 20 g/L, ce qui équivaut au milieu de référence. De plus, l'ajout azoté et minéral standard a été effectué afin d'ajouter les nutriments essentiels à l'hydrolysat et favoriser la croissance du *Lactobacillus*. Ce milieu est une variation de celui caractérisé dans la section 4.3.2., car il n'a pas été détoxifié. Ce substrat comporte donc plus d'inhibiteurs (3,44 g/L de phénols totaux, 0,059 g/L d'acide gallique, 0,070 g/L de vanilline et 0,160 g/L de catéchol), mais une quantité similaire de tous les autres éléments caractérisés.

Essai 3 : Un essai avec l'hydrolysate Kraft standard détoxifié et l'ajout minéral et azoté a été ensuite effectué. Cet essai a pour but de vérifier l'effet du retrait des inhibiteurs par la méthode classique sur l'efficacité de la fermentation lactique. Théoriquement, le retrait d'inhibiteurs devrait augmenter le rendement ou, du moins, réduire le temps de culture requis afin d'atteindre la concentration maximale de produit.

Essai 4 : Pour pouvoir comparer avec les deux autres substrats, qui contiennent beaucoup plus de sucre (environ 3X plus), un essai avec l'hydrolysate concentré avec une membrane organique NF-270 a été effectué. La même quantité de minéraux et azotés a été ajoutée afin d'obtenir la même concentration initiale en ces éléments. Théoriquement, du à la quantité plus grande de sucres et de l'enlèvement partiel des inhibiteurs dans la filtration membranaire, un meilleur rendement de production devrait être obtenu avec ce milieu. On y retrouve environ la même quantité générale d'acide organique et de minéraux que dans le substrat classique, mais avec une quantité de xylose de 51 g/L. Par contre, la quantité de composés phénolique augmente beaucoup, car la détoxification enzymatique est moins efficace avec ce substrat comparé à celui moins concentré et il en résulte une concentration de 2,19 g/L de composé phénolique, comparé à 0,80 g/L avec le substrat moins concentré.

Essai 5 : Pour vérifier l'efficacité du xylose, principal sucre de l'hydrolysate Kraft du bois de feuillu, pour la croissance du micro-organisme et pour la production d'acide lactique un essai a été effectué avec seulement ce sucre et les ajouts azotés

Essai 6-7 : Ensuite, pour vérifier l'effet synergique entre la présence d'inhibiteurs et l'absence de glucose, le substrat principal de *L. rhamnosus*, un ajout de 20 g/L de glucose a été effectué à l'essai 2 et à l'essai 3. L'ajout de glucose devrait améliorer grandement les résultats de la fermentation lactique, surtout si on tient compte du fait que le xylose obtient de bien plus petits rendements de production que le glucose (Abdel-Rahman et al., 2010; Santos et al., 2008). De plus, si le milieu contient des inhibiteurs en concentrations élevées, il y a beaucoup de conditions adverses pour la croissance de *L.rhamnosus* et la production d'acide lactique par celui-ci et un milieu plus favorable ne peut qu'aider à augmenter les rendements de production.

5.2.2 Hydrolysat de pâte thermomécanique

Tableau 5-3 Essais liés à l'hydrolysat de pâte thermomécanique

Hydrolysat de pâte thermomécanique		Ratio Carbone/Azote
1	Milieu de référence MRS	6,3
2	Hydrolysat de pâte thermomécanique + minéraux et azote	34,0

En ce qui a trait à l'hydrolysat de pâte thermomécanique, l'hydrolysat semble plutôt favorable pour la croissance et la production d'acide lactique. En effet, celui-ci contient une quantité appréciable de sucres, qui sont, pour la grande majorité, du glucose. De plus, la méthode d'obtention utilisée ne génère presque pas d'inhibiteurs, contrairement à l'hydrolysat Kraft. Une étape de détoxification n'est donc pas requise.

Essai 2 : Un seul autre essai est donc réalisé avec l'hydrolysat de pâte thermomécanique, en plus de l'essai de référence identique à celui présenté dans la section précédente. L'hydrolysat de pâte thermomécanique est utilisé tel quel, avec l'ajout azoté et l'ajout minéral habituel.

5.2.3 Résidus agroalimentaires

Tableau 5-4 Essai avec les résidus agroalimentaires

Résidus agroalimentaires		Ratio Carbone/Azote
1	Milieu de référence MRS	6,3
2	Résidus agroalimentaires	57
3	Résidus agroalimentaires + azote	20
4	Résidus agroalimentaires + minéraux et azote	16
5	Résidus agroalimentaires 1/3 + minéraux et azote	9,5
6	Résidus agroalimentaires 1/3 + minéraux et azote + ajout résidus agroalimentaires (« fed-batch »)	12

Essai 1 : Un essai avec le milieu de référence MRS a été effectué pour pouvoir l'utiliser comme base de comparaison pour l'efficacité des milieux complexes, tout comme lors des essais avec les autres substrats.

Essai 2 : Ensuite, un essai avec les résidus agroalimentaires purs, qui peuvent contenir à la fois un peu d'azote et un peu de minéraux essentiels (Mg^{2+} et Mn^{2+}) selon la caractérisation que l'on a effectuée, a été réalisé. L'utilisation des résidus agroalimentaires purs représenterait un net avantage industriel, tant par rapport du prix du milieu de culture que par rapport à la simplicité d'opération.

Essai 3 : Un essai avec les résidus agroalimentaires et un ajout azoté seulement sans l'ajout minéral a été effectué. Cet essai a comme objectif d'observer l'effet de l'azote sur le rendement de production en acide lactique. Puisque les *Lactobacillus* sont très capricieux concernant les quantités d'azotes disponibles dans le milieu de culture et que le substrat n'en contient pas énormément au

départ (0,80 g/L), l'ajout de l'extrait de levure et de l'extrait de bœuf composant l'ajout azoté devrait produire des résultats intéressants. Par contre, il y a une quantité intéressante de magnésium (93 ppm) et de Manganèse (11 ppm) dans les résidus agroalimentaires. Pour cette raison, l'ajout de minéraux n'a pas été effectué.

Essai 4 : Pour correspondre aux essais avec l'hydrolysate Kraft et vérifier l'effet de l'ajout minéral sur la production d'acide lactique, un essai avec l'ajout minéral et azoté standard a été effectué. Le rendement de production devrait s'améliorer légèrement, puisque le magnésium et le manganèse semblent être importants pour le fonctionnement des enzymes de la voie des pentoses phosphates (Lew et al., 2013).

Essai 5 : Afin de pouvoir comparer avec l'hydrolysate Kraft, un essai avec les résidus agroalimentaires dilué 1/3 a été effectué. Cette dilution avait pour objectif d'équilibrer la concentration de sucres à un niveau semblable à l'hydrolysate Kraft. De plus, le même ajout azoté et minéral a été effectué, afin de comparer la base des substrats et non les ajouts présents dans ceux-ci. De plus, la présence d'inhibiteurs bactériens tel le limonène ou des composés phénoliques pourrait ralentir ou inhiber la fermentation et la dilution du substrat pourrait donner certaines informations utiles pour déterminer l'importance de l'inhibition par ces composés.

Essai 6 : Finalement, un essai dans un bioréacteur de 1,3 L a été effectué. Cet essai était différent de tous les autres et pour cette raison, un résumé de la méthode de cet essai sera effectué dans cette section.

Le milieu de base reste semblable, avec quelques modifications discutées dans les sections précédentes soit : 5.1.2.4

Tableau 5-5 Composition du milieu de culture initial de l'essai « fed-batch » en bioréacteur 1,3 L.

Composition	Quantité
Substrat complexe dilué 1/3	400 mL
MgSO₄ heptahydrate	1,02 g/L
MnSO₄ monohydrate	0,78 g/L
Extrait de bœuf	10 g/L
Extrait de levure	5 g/L
CaCO₃	15 g/L

Les résidus agroalimentaires utilisés ont été dilués 1/3 afin de diminuer la quantité d'inhibiteurs présents dans le milieu. Un volume de 400 mL de celui-ci a été utilisé initialement dans le bioréacteur. Un ajout constant de résidus agroalimentaires purs, soit non dilués, et supplémentés de l'ajout azoté et minéral classique a été effectué entre 22 h et 28 h, après le début de la fermentation. Le volume total de l'ajout était de 500 mL et il a été ajouté à un débit de 1,4 mL/min. L'ajout progressif des sucres permettrait une croissance accrue des micro-organismes, par l'ajout de sucres dans la fermentation, tout en réduisant l'effet des inhibiteurs présents dans le substrat, en les ajoutant progressivement. Les conditions suivantes ont été utilisées dans cet essai.

Tableau 5-6 Conditions utilisées lors de l'essai « fed-batch »

Paramètre	
pH	6,5
Ajustement du pH	NaOH 6M
Température	37 °C
Agitation	100 rpm
Oxygène dissous	1vvm

La fermentation en bioréacteur s'échelonne sur 48 h, selon les horaires d'échantillonnage et d'analyse présentés à l'annexe A.

5.3 Résultats des fermentations

5.3.1 Essai 1 : Milieu de référence MRS

Pour cet essai témoin, il est possible de noter une phase de latence rapide (environ 4 h), une phase exponentielle rapide (entre 4 h et 16) ainsi qu'une phase stationnaire longue (entre 16 h et 40 h). Le taux de croissance maximale (μ_{\max}) de cette fermentation est de $0,37 \text{ h}^{-1}$. De plus, le rendement $Y_{x/s}$ est de $4,69 \times 10^8 \text{ UFC/g}$ de glucose. Celui-ci est calculé avec la formule :

$$Y_{x/s} = \frac{\text{Biomasse produite} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right)}{\text{Substrat disponible} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right)}$$

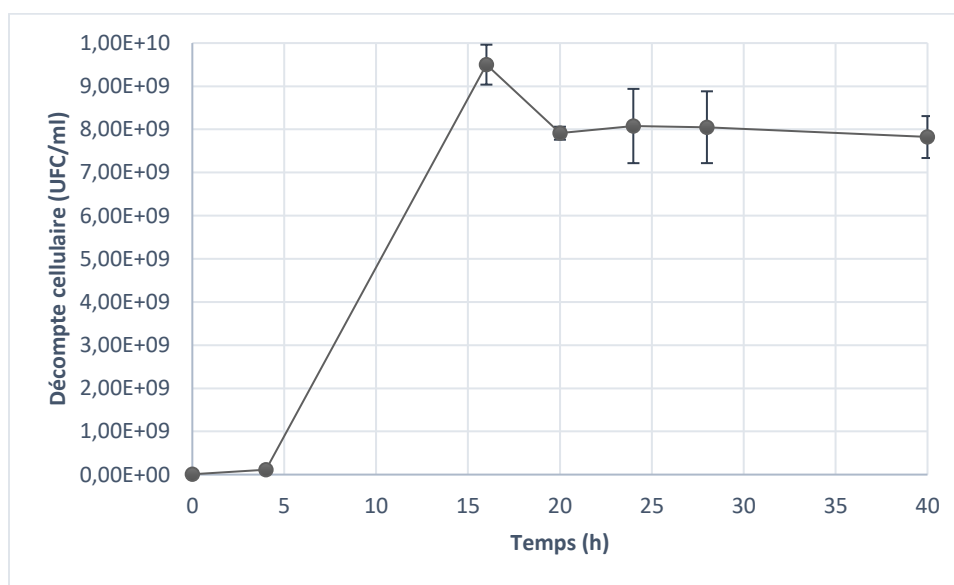


Figure 5-2 Courbe de croissance de *L. rhamnosus* dans le milieu de référence MRS

Il a été possible de déterminer également la densité optique sur cet essai, étant donné l'absence de carbonate de calcium. Il est possible d'observer une concordance dans l'allure générale de la courbe

de croissance effectuée avec le décompte cellulaire et celle effectuée avec la densité optique, ce qui indique une bonne concordance dans les résultats (Figure 5-2 et Figure 5-3).

L'analyse du pH a été effectuée sur l'échantillon et une légère baisse est observée, normale lors de la production d'acide lactique. Le pH reste toujours au-dessus de 5.0, ce qui est au donc supérieur au pH critique qui diminue grandement la production d'acide lactique (Figure 5-3).

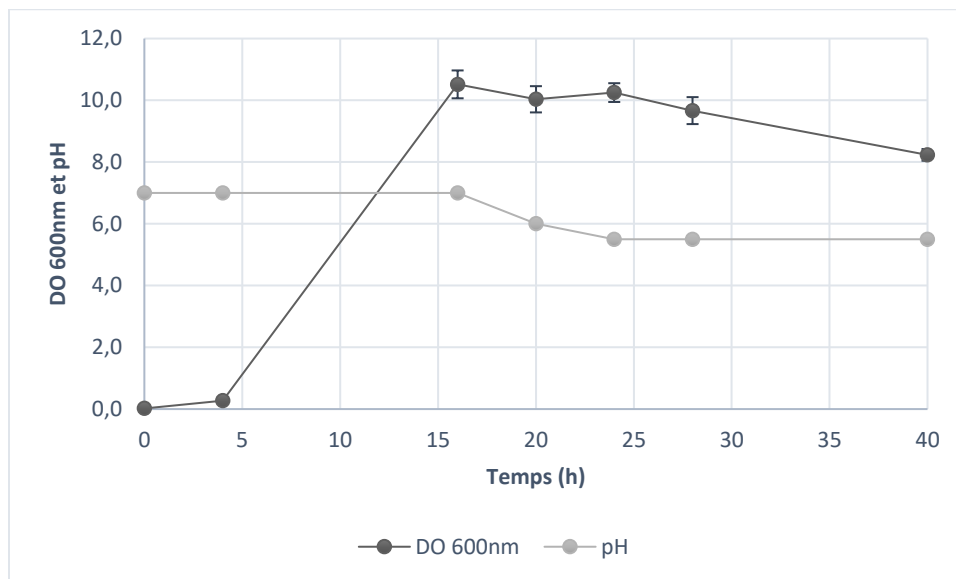


Figure 5-3 Suivi de la densité optique et du pH lors de la fermentation lactique par *L. rhamnosus* dans le milieu de référence MRS

En ce qui a trait à la production d'acide lactique, *L. rhamnosus* possède une productivité maximale de 0,93 g d'acide lactique/g de glucose. Celui-ci est calculé à l'aide de la formule :

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Acide lactique produit } \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{Substrat disponible } \left(\frac{g}{L}\right)}$$

La production s'effectue en concordance avec la croissance cellulaire, puisque c'est un produit primaire. De plus, elle s'effectue aussi en parallèle avec la consommation de glucose.

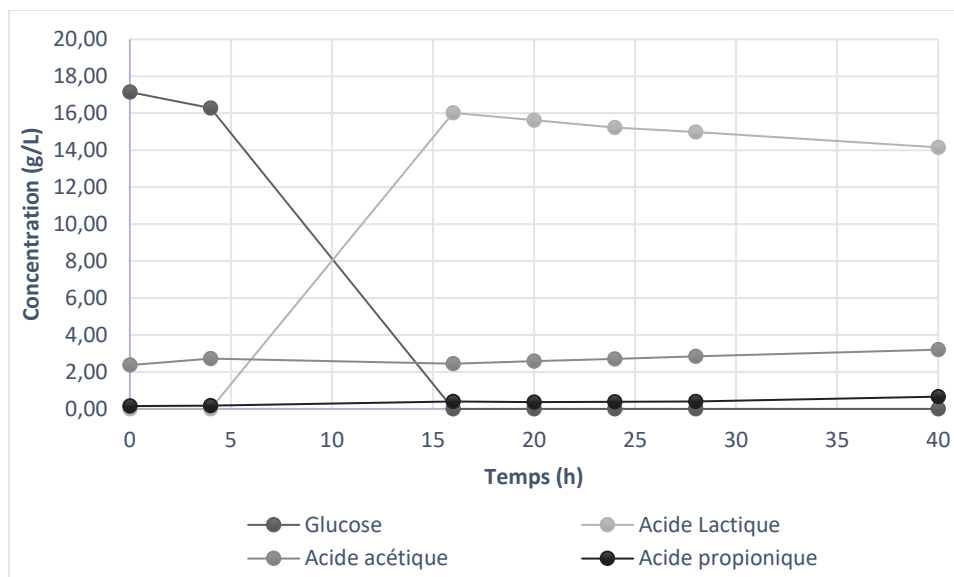


Figure 5-4 Courbe de production d'acide organique et de consommation de glucose avec *L. rhamnosus* et le milieu de référence MRS

La production maximale d'acide lactique est assez moyenne avec 16,2 g/L. Par contre, compte tenu de la quantité de glucose présent dans le milieu, cette quantité est acceptable.

5.3.2 Hydrolysat Kraft

Les fermentations avec l'hydrolysat Kraft comportaient plusieurs défis. Parmi ceux-ci, le plus grand est, sans contredit, l'inhospitalité du substrat. En effet, en plus de contenir des inhibiteurs importants, le milieu est très pauvre en glucose, mais riche en xylose. Le xylose est un sucre plus difficilement fermentable.

5.3.2.1 Essai 2 : Hydrolysat Kraft + minéraux et azote

Il est possible de noter qu'il n'y a pas croissance de *L. rhamonosus* dans ce milieu. En effet, la quantité de cellules viables diminue drastiquement et rapidement dans cette fermentation. Lors de

la fermentation témoin avec le milieu MRS, une concentration cellulaire maximale de $9,5 \times 10^9$ UFC/mL est obtenue, ce qui est très loin du résultat obtenu lors de cet essai.

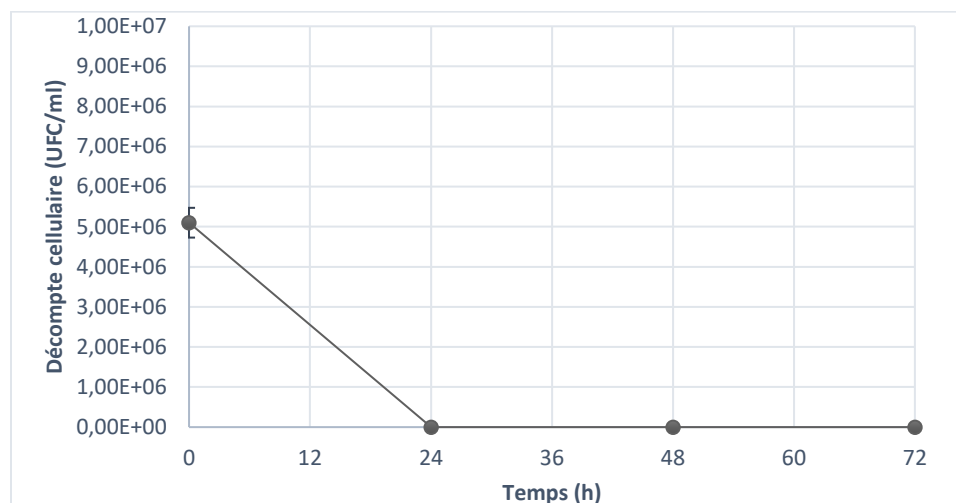


Figure 5-5 Courbe de croissance de *L. rhamnosus* dans l'hydrolysate Kraft supplémenté de minéraux et d'azote

Il en résulte donc d'une quantité quasi inexistante d'acide lactique et autres acides organiques produits et d'aucune consommation de xylose ou de glucose.

Il est possible de conclure que l'hydrolysate Kraft non détoxifié ne permet pas la croissance de *L. rhamnosus* et la production effective d'acide lactique ou d'autres acides organiques. La présence d'inhibiteurs et l'absence de glucose peuvent influencer ces résultats. Des traitements supplémentaires seront donc nécessaires pour la production d'acide lactique.

5.3.2.2 Essai 3 : Hydrolysate Kraft détoxifié + minéraux et azote

Dans cette optique, la détoxification de l'hydrolysate semble être une option prometteuse. En effet, la diminution de la concentration en composés phénoliques pourrait favoriser grandement la

fermentation lactique. Par contre, l'utilisation de calcium et de sodium lors des ajustements de pH pourrait avoir un effet inhibiteur sur la fermentation. De plus, si la bactérie lactique n'assimile pas bien le xylose, la détoxification n'aura aucun impact sur la production d'acide lactique. C'est ce qui semble se passer lors de cet essai.

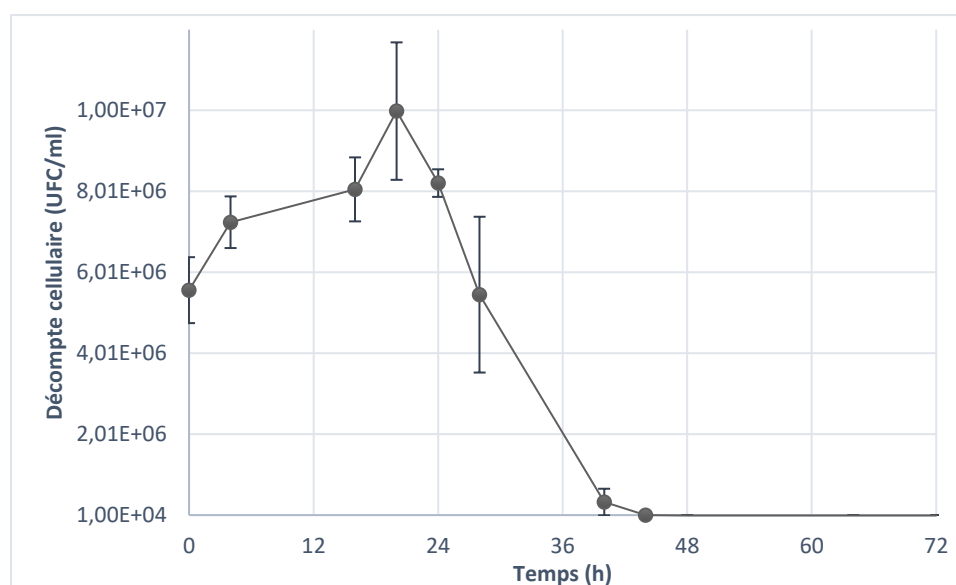


Figure 5-6 Courbe de croissance de *L. rhamnosus* dans l'hydrolysat Kraft détoxifié et avec des ajouts d'azote et de minéraux

Il est possible de noter une croissance active dans le milieu, bien qu'avec son $9,99 \times 10^6$ UFC/mL (Figure 5-6), la quantité de cellules présentes dans le milieu n'atteint pas la quantité présente dans le milieu témoin MRS, soit $9,5 \times 10^9$ UFC/mL. Par contre, la production d'acide lactique est nulle, ce qui témoigne d'un problème avec le substrat. On remarque tout de même une légère production d'acide acétique, soit 0,50 g/L, ce qui indique une certaine activité métabolique, principalement concentrée sur la croissance cellulaire, mais aussi sur une certaine production d'acide organique.

5.3.2.3 Essai 4 : Hydrolysat Kraft 3X concentré et détoxifié + minéraux et azote

Il est également possible que la quantité de xylose dans le milieu ne soit pas suffisante pour atteindre le seuil requis pour une croissance cellulaire et une production d'acide lactique. Dans cette optique, un essai avec l'hydrolysat concentré en sucres, mais comportant aussi beaucoup plus d'inhibiteurs a été effectué. La croissance de *L. rhamnosus* est nulle et il y a rapidement un déclin de la quantité de bactéries lactiques dans le milieu de culture (Figure 5-7).

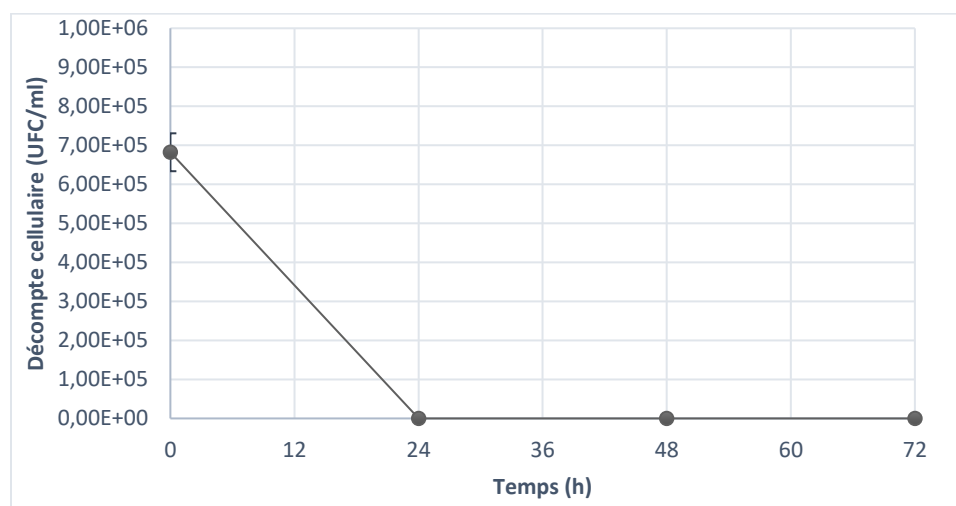


Figure 5-7 Courbe de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* dans l'hydrolysat Kraft concentré 3X et supplémenté d'azote et de minéraux

Tout comme lors de l'essai #2 et de l'essai #3, la quantité d'acide lactique produite est nulle. La quantité plus importante de composés phénoliques dans le milieu, seul changement outre la concentration en sucres, peut facilement expliquer l'échec de cette fermentation lactique.

5.3.2.4 Essai 5 : 20 g/L xylose + suppléments + minéraux et azote

À la suite des essais précédents, il a été pertinent de vérifier l'utilisation du xylose par *Lactobacillus rhamnosus*. Il est en effet possible que les difficultés précédentes soient causées, en partie, par l'absence de glucose, un substrat bien plus facile à assimiler pour la plupart des bactéries. Il est possible de remarquer à la Figure 5-8 que la croissance bactérienne est assez importante, pour obtenir une concentration cellulaire maximale de $1,1 \times 10^8$ UFC/mL, ce qui est inférieur au résultat obtenu lors de la fermentation témoin avec le milieu MRS, soit $9,5 \times 10^9$ UFC/mL, mais qui s'en rapproche plus que tous les autres essais (Figure 5-8). Le xylose est donc un sucre adéquat pour la croissance de *Lactobacillus rhamnosus*.

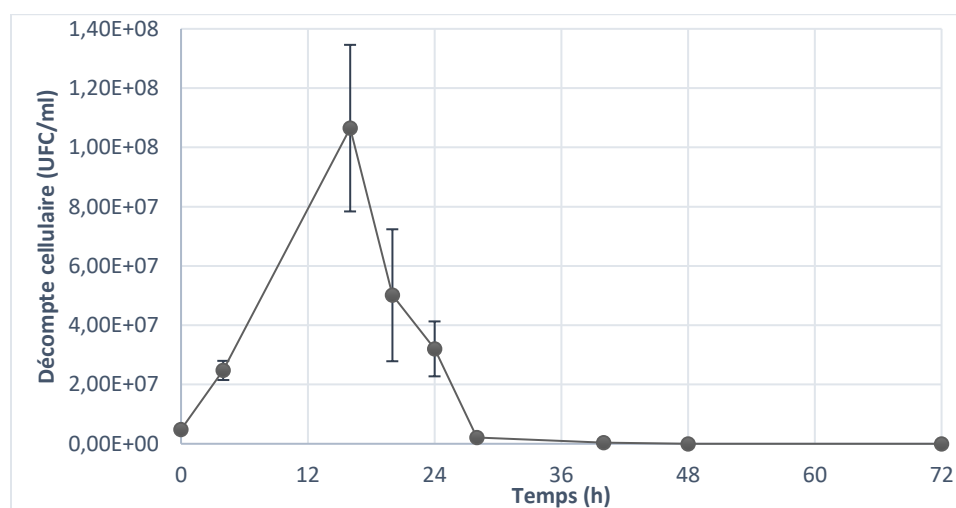


Figure 5-8 Courbe de croissance de *L. rhamnosus* dans un milieu composé de 20 g/L de xylose avec l'ajout d'azote et de minéraux

Le μ_{\max} de cette fermentation est $0,17 \text{ h}^{-1}$ et est donc plus bas que celui de la fermentation témoin ($0,37 \text{ h}^{-1}$). Il est donc possible d'affirmer que le xylose est un sucre moins efficace pour la croissance de *L. rhamnosus*.

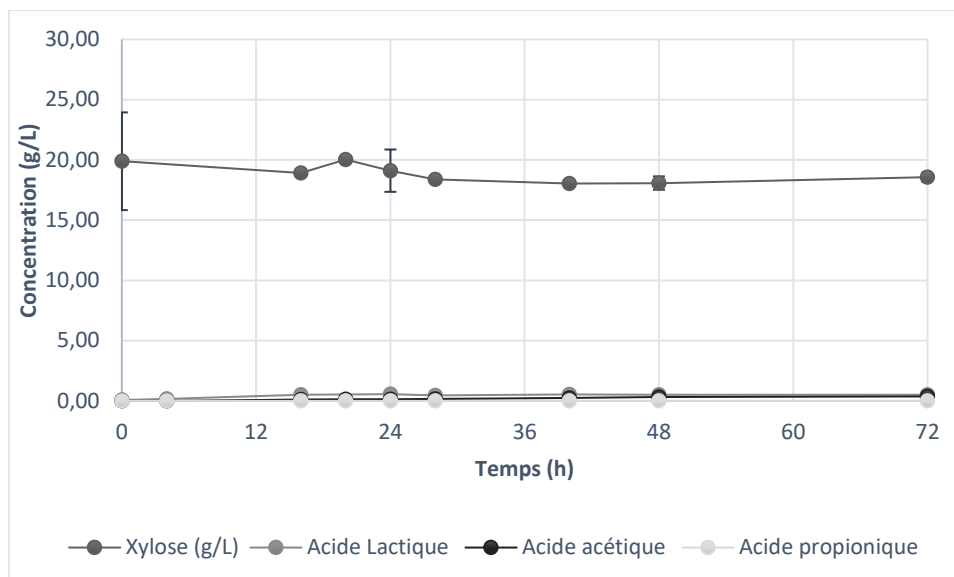


Figure 5-9 Production d'acides organiques et consommation de sucre de *L. rhamnosus* lors de l'essai 5.

Dans cet essai, *Lactobacillus rhamnosus* produit 0,46 g/L d'acide lactique. Cette quantité maximale est atteinte à 48 h et c'est donc le temps limite utilisé pour calculer les autres paramètres. La quantité d'acide lactique produite est très faible comparé aux résultats obtenus en utilisant un sucre comme le glucose. Dans le témoin, une production de 16,2 g/L est réalisée. De plus, la consommation de sucres est très faible, on voit une consommation de seulement 1,81 g/L de xylose. En bref, le xylose semble permettre une assez bonne croissance cellulaire de *L. rhamnosus*, mais limiter grandement la quantité d'acide lactique produite (Figure 5-9).

5.3.2.5 Essai 6 : Hydrolysat Kraft + 20 g/L glucose + minéraux et azote

Suite au résultat de l'essai 5, l'efficacité limitée du xylose pour la production d'acide lactique a été démontrée. L'ajout de glucose dans l'hydrolysat Kraft pour une fermentation peut permettre d'infirmer ou de confirmer cette théorie. Si la fermentation avec l'ajout de glucose fonctionne correctement, la raison la plus probable des échecs des essais précédents sera que le xylose n'est tout simplement pas adapté à cette souche pour la production d'acide lactique. Par contre, si cet

essai ne fonctionne pas correctement, d'autres hypothèses seront envisagées. Une de ces hypothèses est qu'il pourrait exister un effet synergique entre la nature du sucre principal et la quantité de composés phénoliques présents dans l'hydrolysat Kraft non détoxifié.

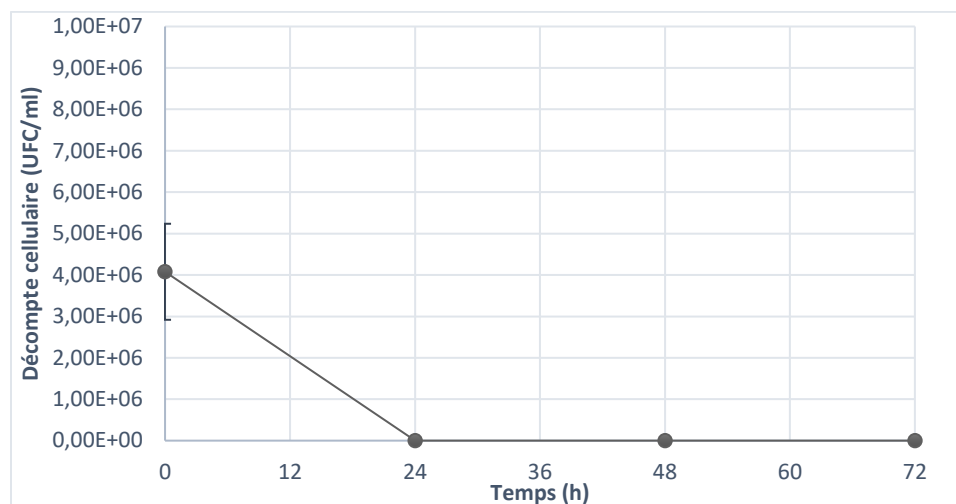


Figure 5-10 Courbe de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* dans l'hydrolysat Kraft supplémenté de 20 g/L de glucose, d'azote et de minéraux

Il est possible de remarquer que, comme lors des essais précédents avec l'hydrolysat non détoxifié, la croissance cellulaire est nulle et la phase de déclin est rapidement observée. Il est donc possible de dire que l'absence de glucose n'est pas la seule problématique de ce substrat. Il est fort possible que la quantité et la nature des composés phénoliques présents dans ce substrat provoquent une forte inhibition de la croissance et donc de la production d'acide lactique.

5.3.2.6 Essai 7 : Hydrolysat Kraft détoxifié + 20 g/L glucose + minéraux et azote

Afin d'envisager toutes les possibilités, un essai avec l'hydrolysat détoxifié et l'ajout de 20 g/L de glucose a été effectué. Cet essai a permis de vérifier si la diminution de la concentration de composés phénoliques permettrait d'accroître la production d'acide lactique, en présence de glucose. Au départ, on peut remarquer, même si la différence est subtile sur la Figure 5-11, une

diminution de la densité cellulaire au cours des 24 premières heures. Il est possible que cela indique la présence d'un choc toxique qui aurait tué une partie des cellules (diminution d'environ 1 log).

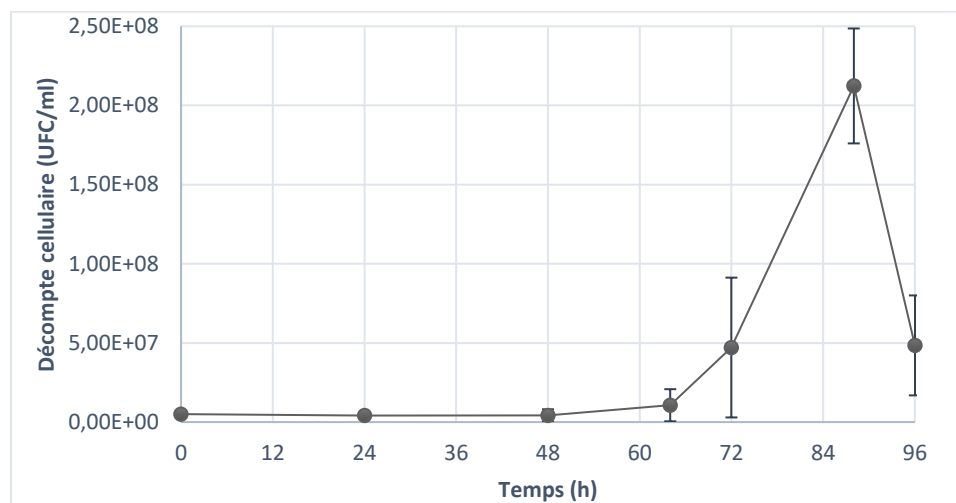


Figure 5-11 Courbe de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* dans l'hydrolysate Kraft non détoxifié et supplémenté de 20 g/L de glucose, d'azote et de minéraux

Au vu des résultats encourageants notés au temps 72 h, la fermentation a été prolongée jusqu'au temps 96 h. Donc, à partir de 72 h, on voit une nette progression de la densité cellulaire et une baisse du pH, ce qui peut indiquer la présence d'acide lactique. Le μ_{\max} de la fermentation reste assez faible, avec $0,09 \text{ h}^{-1}$, mais la croissance reste positive jusqu'au temps 88h et la densité cellulaire atteint un sommet de $2,12 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$.

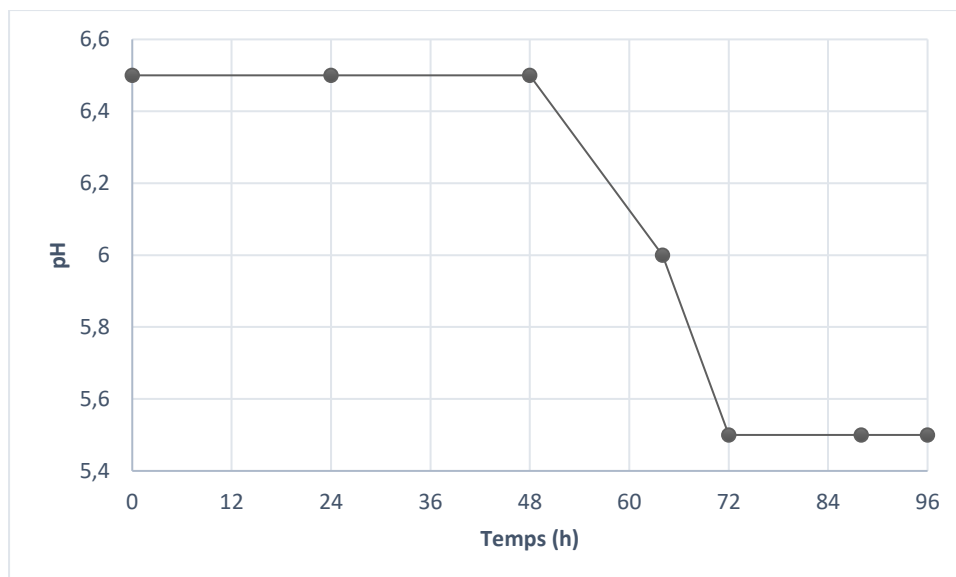


Figure 5-12 Variation du pH dans la fermentation de l'hydrolysat Kraft détoxifié et supplémenté de 20 g/L de glucose, d'azote et de minéraux

La production d'acide lactique dans cet essai est supérieure à la production lors de l'essai 6, qui contient seulement du xylose. En effet, la production d'acide lactique atteint 2,67 g/L, avec une productivité maximale de 0,07 g d'acide lactique/g de sucres disponibles (Figure 5-13). Par contre, le xylose issu de l'hydrolysat Kraft n'a pas été consommé, ce qui indique une nette préférence pour le glucose, mais aussi l'impossibilité d'utiliser l'hydrolysat comme supplément sucré à un milieu quasi synthétique afin d'améliorer la production.

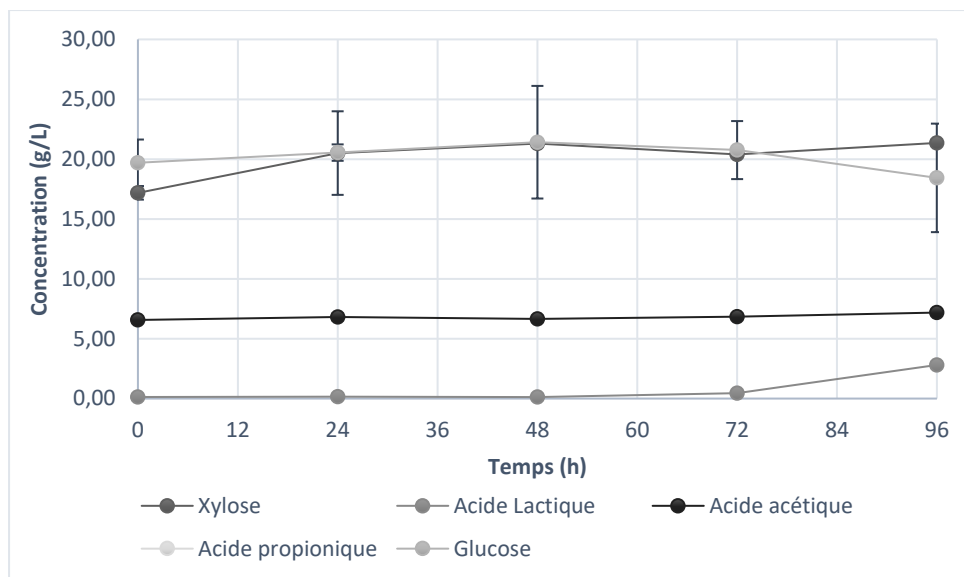


Figure 5-13 Courbe de production d'acide lactique et de consommation de glucose et de xylose

5.3.2.7 Synthèse des essais avec l'hydrolysats Kraft

Dans les essais réalisés pour l'hydrolysats Kraft, plusieurs phénomènes ont été observés. Tout d'abord, les essais réalisés avec l'hydrolysats, détoxifié ou non, n'ont pas permis d'atteindre l'objectif fixé, soit une production d'acide lactique semblable à celle obtenue dans la littérature. En effet, en plus de ne pas produire d'acide lactique, la croissance bactérienne était faible, quand il y en avait une. En cherchant la solution à ce problème, la première hypothèse a été que la quantité de xylose présent dans le milieu était trop faible pour permettre une fermentation. En ce sens, la concentration des sucres par une membrane organique avant la fermentation n'a pas permis d'améliorer les résultats. Aucune croissance de *L. rhamnosus* ou production d'acide lactique n'a été observée. La seconde hypothèse était que la nature du sucre, à cinq carbones, était inexploitable par la bactérie lactique. Il a été possible de noter l'insuffisance du xylose pour la production d'acide lactique avec *Lactobacillus rhamnosus* dans l'essai 5. En effet, même dans un milieu synthétique exempt de composés phénoliques ou d'autres inhibiteurs connus, la production d'acide lactique de la bactérie a été très réduite, soit 0,46 g/L, comparée à celle obtenue dans le milieu synthétique témoin MRS. Par contre, il est possible de noter une certaine efficacité du xylose pour la croissance des micro-organismes. En effet, un taux de croissance maximum de 0,17 h⁻¹ est ainsi obtenu. Suite

à ces résultats, la possibilité d'utiliser l'hydrolysate Kraft comme base et d'y ajouter une certaine quantité de glucose a été soulevée.

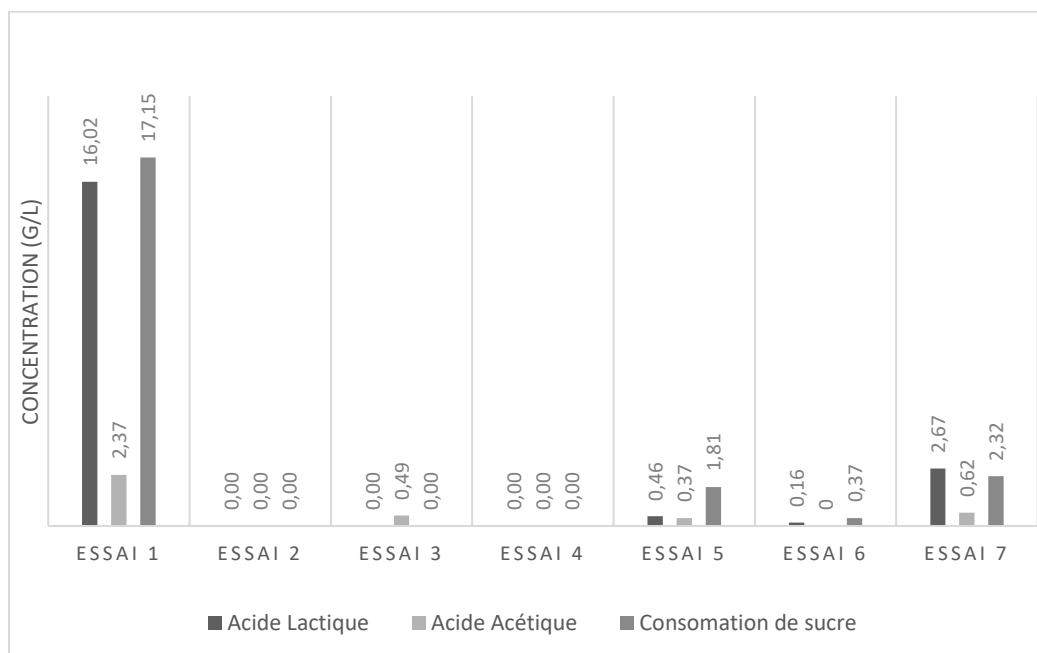


Figure 5-14 Sommaire de la production d'acides organiques et de la consommation de sucre dans les essais avec l'hydrolysate Kraft

Cette possibilité ouvrirait la porte à l'utilisation du xylose pour accroître la quantité de micro-organismes dans un milieu contenant du glucose, alors que celui-ci serait utilisé pour la production d'acide lactique. L'hydrolysate non détoxifié n'a pas démontré de résultat intéressant, ce qui soulève un autre problème du substrat : les inhibiteurs. En effet, l'inefficacité de l'hydrolysate Kraft pour la production d'acide lactique avec *L. rhamnosus* peut être causé par l'effet combiné ou synergique de la nature des sucres, métabolisés sans produire d'acide lactique, et de la présence d'inhibiteurs dans le milieu qui provoque un choc toxique. Pour appuyer cette hypothèse, le dernier essai, dans l'hydrolysate détoxifié, a démontré des résultats plus encourageants. En effet, il a été possible de produire 2,67 g/L d'acide lactique (Figure 5-14). Par contre, cette valeur est très inférieure à celle obtenue lors de l'essai témoin. La diminution de la quantité de composés phénoliques contribue à l'accroissement de la production d'acide lactique, tous comme l'ajout de glucose dans l'hydrolysate Kraft.

5.3.3 Hydrolysat de pâte thermomécanique

5.3.3.1 Essai 2 : Hydrolysat de pâte thermomécanique + minéraux et azote

L'hydrolysat de pâte thermomécanique contient une grande quantité de glucose. Ce sucre hautement fermentescible provoque une bonne production d'acide lactique. Par contre, l'hydrolysat de pâte thermomécanique contient aussi du xylose, qui est moins efficace pour la production d'acide lactique. La quantité d'inhibiteurs présents dans l'hydrolysat de pâte thermomécanique est, théoriquement, semblable à la quantité présente dans l'hydrolysat Kraft, mais, en pratique, la nature des composés phénoliques est bien différente, puisque le procédé d'obtention est différent et ils peuvent donc avoir une influence moindre sur la fermentation lactique.

Lors de l'essai avec l'hydrolysat de pâte thermomécanique, une croissance rapide de *Lactobacillus rhamnosus* a été observée. En 28 h, la concentration maximale en cellules a été atteinte avec $1,45 \times 10^{10}$ UFC/mL. Lorsqu'on compare avec la quantité obtenue lors de l'essai témoin avec le MRS, qui est de $9,5 \times 10^9$ UFC/mL, il est possible de noter une augmentation significative de la concentration cellulaire. Le μ_{\max} obtenu avec cette fermentation est semblable à celui obtenu dans la fermentation témoin, avec, respectivement, $0,36 \text{ h}^{-1}$ et $0,37 \text{ h}^{-1}$. Le rendement maximal $Y_{x/\text{glucose}}$ est de $1,55 \times 10^8$ UFC/g de glucose, alors que le xylose présent dans le substrat est à peine consommé (3,57 g/L).

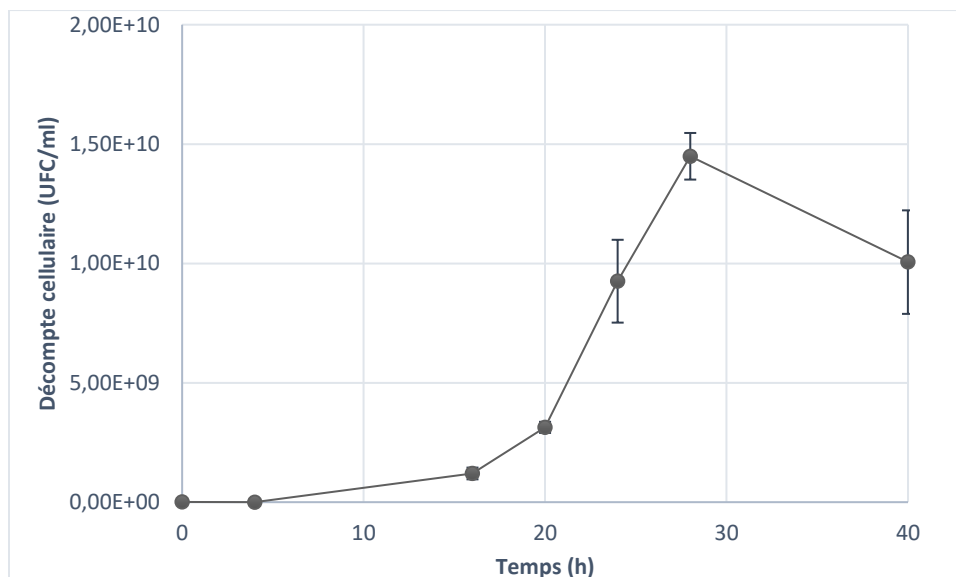


Figure 5-15 Courbe de croissance de *L.rhamnosus* dans l'hydrolysate de pâte thermomécanique supplémenté d'azote et de minéraux

La quantité d'acide lactique produite dans cet essai est très importante, soit 66,9 g d'acide lactique maximal à 40h. Un rendement $Y_{P/S}$ de 0,7 g d'acide lactique/g de glucose est ainsi obtenu (Figure 5-16).

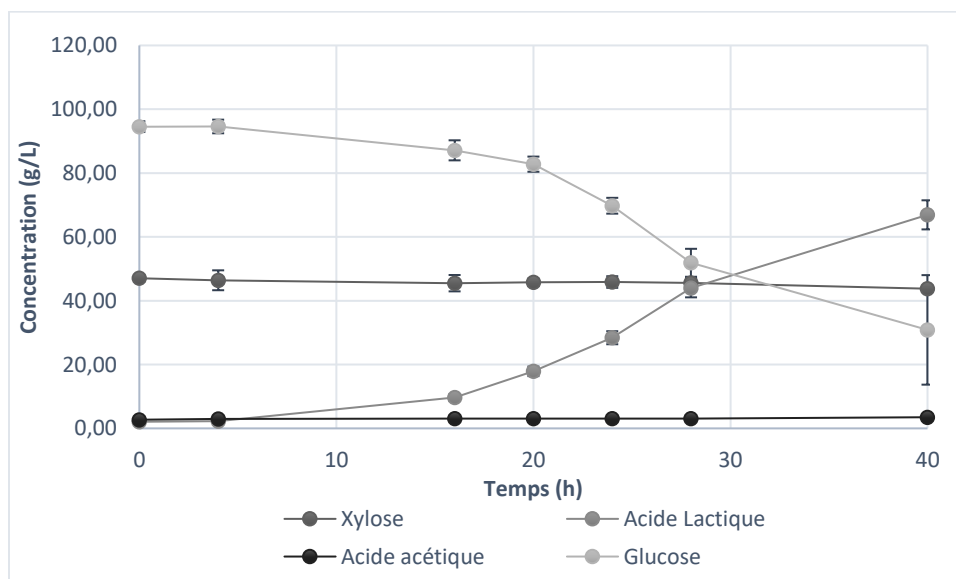


Figure 5-16 Production d'acides organiques et consommation des sucres par *L. rhamnosus* dans l'hydrolysate de pâte thermomécanique supplémenté d'azote et de minéraux

Lors de cet essai, le temps alloué à la fermentation a été écourté, puisque le pH était stabilisé, ce qui indiquait, dans tous les autres essais, un arrêt de la production d'acide lactique. Par contre, après des analyses supplémentaires, il est apparent que la quantité de glucose résiduelle au temps final est trop élevée (30,86 g/L) et que l'allure générale de la courbe de production d'acide lactique indique un léger ralentissement, mais aussi une production active de l'acide lactique. Il est donc probablement possible d'augmenter la quantité d'acide lactique produite de quelques grammes par litre en rallongeant le temps de fermentation.

5.3.4 Résidus agroalimentaires

Les résidus agroalimentaires comportent plusieurs défis importants. Le plus grand est, sans contredit, la présence éventuelle d'inhibiteurs. La nature des résidus, composés principalement d'agrumes, indique la possible présence de limonène. Malgré ce défi, la présence de sucres hautement fermentescibles comme le glucose et le fructose représente un avantage pour la production d'acide lactique. Il y a aussi du saccharose, un sucre légèrement plus difficile à métaboliser pour la majorité des micro-organismes, car c'est un dimère de fructose et de glucose, qui doit être hydrolysé avant l'utilisation. De plus, les résidus agroalimentaires contiennent une certaine quantité de magnésium et de manganèse, ce qui peut contribuer à la production d'acide lactique.

5.3.4.1 Essai 2 : Résidus agroalimentaires

Dans cet essai, aucun supplément d'azote ou de magnésium n'était ajouté, puisque la quantité d'azote et de minéraux dans les résidus agroalimentaires est, de base, assez importante.

Les résultats de cet essai ont démontré l'impossibilité d'une fermentation lactique dans les résidus agroalimentaires non supplémentés. En effet, aucune croissance de *L. rhamnosus* n'a été observée et une diminution instantanée de la concentration cellulaire a même été observée lors de

l'inoculation. Cette diminution, semblable à un choc toxique, pourrait être causée par un composé inhibiteur ou toxique présent dans le milieu. Le limonène en est un exemple important, puisque présent en bonne quantité dans les résidus agroalimentaires.

5.3.4.2 Essai 3 : Résidus agroalimentaires + Azote

Puisque les minéraux, surtout le magnésium et le manganèse, sont présents dans les résidus agroalimentaires, un essai avec un supplément d'azote seulement a été effectué. Dans cet essai, une concentration cellulaire maximale de $8,6 \times 10^9$ UFC/mL a été obtenue, avec un μ_{\max} de $0,23 \text{ h}^{-1}$. Les valeurs maximales de croissance sont donc inférieures à celles obtenues pour l'essai témoin avec le milieu MRS, qui a démontré une concentration cellulaire maximale de $9,5 \times 10^9$ UFC/mL et un μ_{\max} de $0,37 \text{ h}^{-1}$. Une des hypothèses qui explique un taux de croissance plus bas dans ce milieu est la nature des sucres présents dans les résidus agroalimentaires. En effet, le fructose et/ou le galactose peuvent être métabolisés plus lentement par *L. rhamnosus* que le glucose, seul sucre présent dans le milieu de culture MRS.

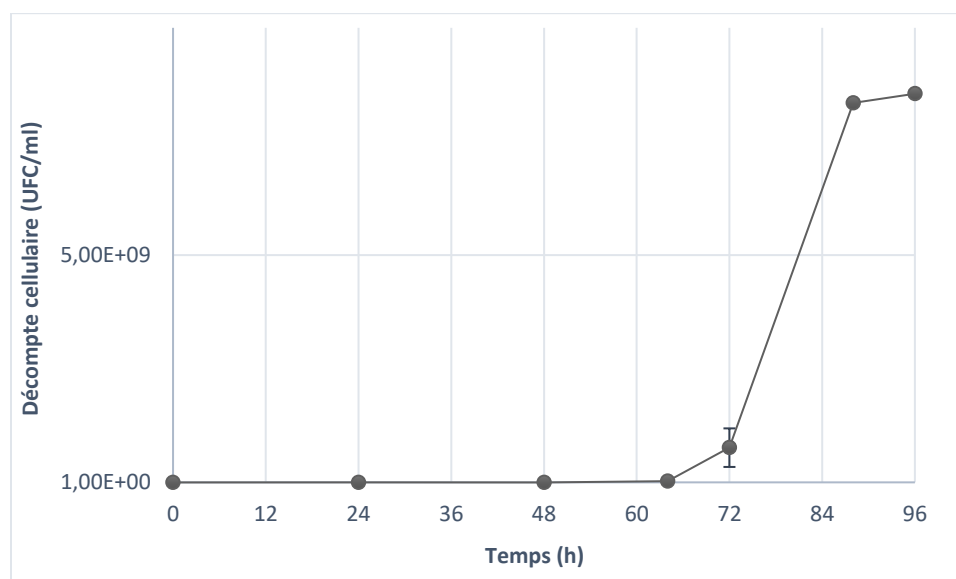


Figure 5-17 Courbe de croissance de *L. rhamnosus* dans les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote

Deux types de sucres ont été consommés préférentiellement, le fructose et le glucose. Une petite quantité de galactose a été consommée, ce qui indique la présence des enzymes nécessaires pour métaboliser ce sucre. Il est possible de voir une nette préférence du micro-organisme pour les monosaccharides. Le ratio $Y_{x/s}$ est de $1,45 \times 10^8$ UFC/g de sucres dans la phase de croissance, ce qui semble confirmer l'hypothèse que les sucres présents dans les résidus agroalimentaires, spécialement le fructose et le saccharose, sont moins favorables pour la croissance de *L. rhamnosus* (Figure 5-17).

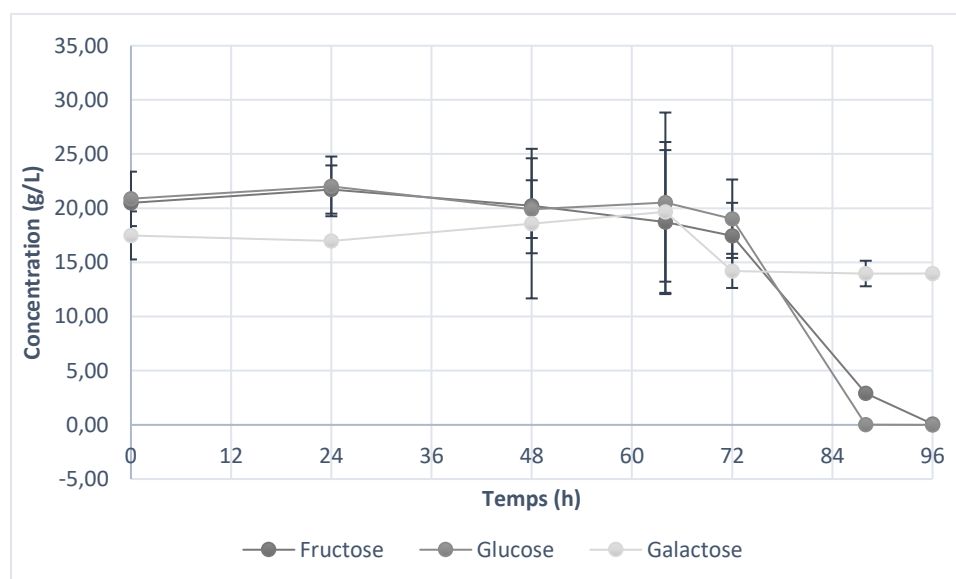


Figure 5-18 Consommation du sucre par *L. rhamnosus* dans l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote

Lors de cet essai, *Lactobacillus rhamnosus* a produit 42,8 g/L d'acide lactique et 0,53 g/L d'acide acétique (Figure 5-19). Le rendement $Y_{P/S}$ est donc de 0,7 g d'acide lactique/g de sucres consommé, pendant la phase exponentielle. À la fin de la fermentation, 14,0 g/L de sucrose sont considérés comme résiduels et sont donc inutilisés, ce qui est une perte de rendement (Figure 5-18). La production d'acide lactique est donc effective dans ce substrat, avec seulement l'ajout d'une source d'azote et non de minéraux. Par contre, il y a encore place à amélioration en ce qui a trait aux rendements de croissance et de production d'acide lactique

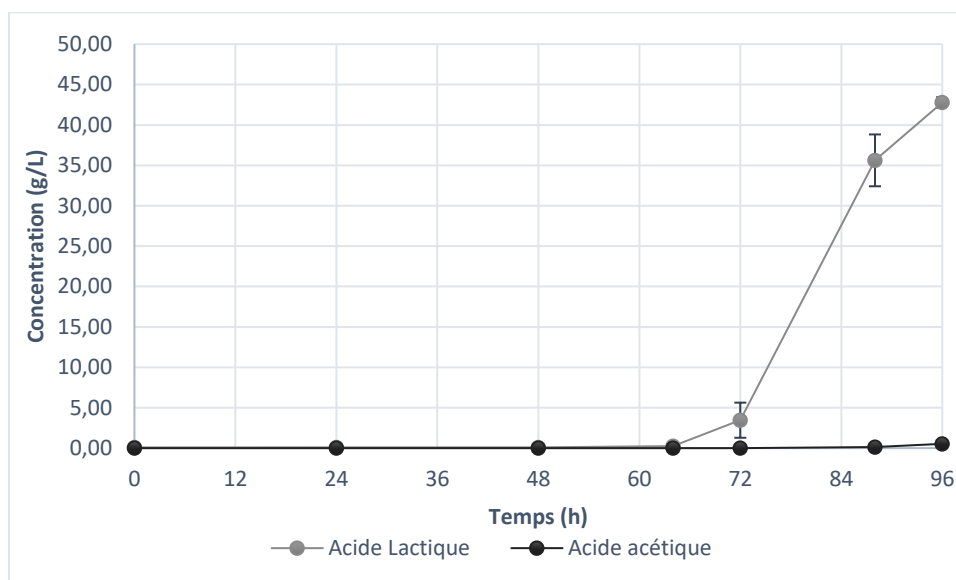


Figure 5-19 Production d'acides organiques par *L. rhamnosus* dans l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote

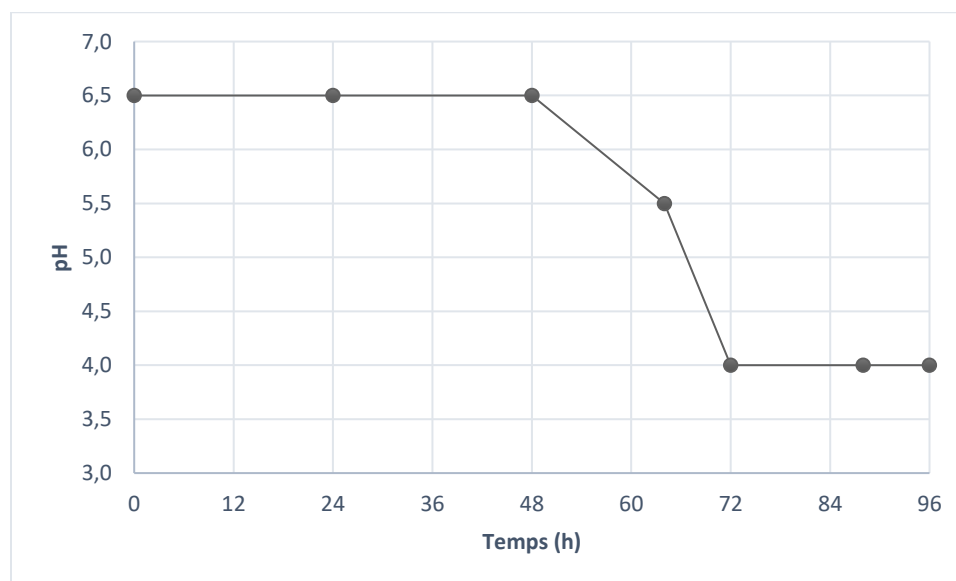


Figure 5-20 Évolution du pH lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote

Lors de la production d'acide lactique, il est possible de noter une forte baisse du pH du milieu, qui se stabilise ensuite à 4. Cette baisse du pH pourrait créer une certaine inhibition sur la production d'acide lactique, puisque le pH optimal de croissance et de production d'acide lactique est entre 6 et 7 et qu'une diminution sous 5,5 allonge significativement le temps de fermentation requis. D'un autre côté, l'abaissement du pH est tout à fait normal, compte tenu de la nature du produit visée, et indique, au contraire, une bonne efficacité du procédé (Figure 5-20).

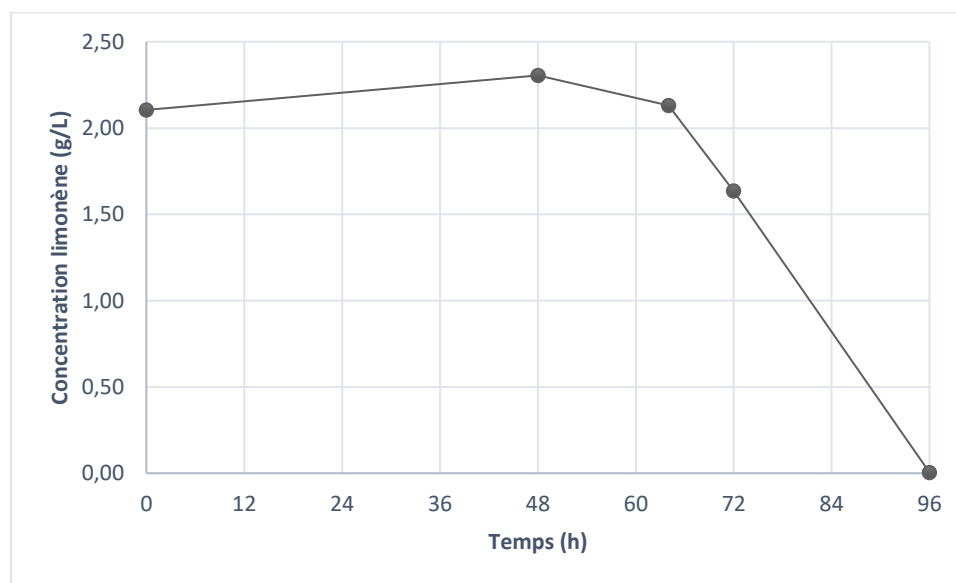


Figure 5-21 Évolution de la concentration en limonène dans la fermentation de *L. rhamnosus* dans l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote

Lors de la fermentation, une très longue phase de latence a été remarquée. En effet, une petite croissance a été observée avant 48h, ce qui a retardé également la phase de production d'acide lactique. Bien que peu visibles à la Figure 5-17, les données brutes démontrent une diminution de la concentration bactérienne lors des 24 premières heures de la fermentation. Un choc toxique causé par un composé inhibiteur, comme le limonène, pourrait avoir affecté momentanément la croissance ou augmenter le temps d'adaptation. Ensuite, les bactéries pourraient avoir synthétisé les enzymes nécessaires pour dégrader le composé problématique et commencer leur croissance. Dans cette optique, le limonène a été quantifié lors de cette fermentation. Les résultats ont démontré un abaissement de la concentration en limonène lors de la phase de croissance du micro-organisme.

Deux hypothèses sont plausibles pour expliquer ces résultats : soit la diminution de la concentration en limonène est la cause de la croissance, soit la croissance des micro-organismes a induit l'abaissement. Dans la première hypothèse, le limonène est considéré comme un inhibiteur, dont la concentration diminue pour des raisons extérieures, comme l'évaporation, ou intérieur, comme la production d'enzyme approprié. Puis, grâce à cet abaissement, la croissance devient possible et est proportionnelle à la diminution. Dans la deuxième hypothèse, un autre facteur provoque une longue phase de latence, puis *L. rhamnosus* utilise le limonène comme source de carbone et le consomme entièrement. Avec les résultats obtenus, il est impossible de discriminer l'une des deux hypothèses.

5.3.4.3 Essai 4 : Résidus agroalimentaires + minéraux et azote

Puisque la quantité de minéraux dans les résidus agroalimentaires reste tout de même relativement faible, un essai avec l'ajout d'azote et l'ajout de minéraux a été effectué. Dans cet essai, une concentration cellulaire maximale de $2,2 \times 10^{10}$ UFC/mL a été obtenue, avec un μ_{\max} de $0,23 \text{ h}^{-1}$. Les valeurs maximales de croissance sont donc bien différentes de celles obtenues pour l'essai témoin avec le milieu MRS, qui a démontré une concentration cellulaire maximale de $9,5 \times 10^9$ UFC/mL et un μ_{\max} de $0,37 \text{ h}^{-1}$ (Figure 5-22). La croissance cellulaire est moins importante dans cet essai, avec un μ_{\max} inférieur à celui du milieu témoin, mais elle est plus longue et conduit à une concentration cellulaire maximale plus élevée que dans le témoin. Comme le μ_{\max} de cet essai est identique à celui obtenu lors de l'essai précédent, il est possible de considérer ce μ_{\max} comme typique pour ce substrat, dans ces conditions de culture spécifique et avec cette distribution de types de sucres. Comme chaque lot de résidus agroalimentaires peut varier, il est fort possible que les résultats obtenus contiennent des différences selon le lot utilisé.

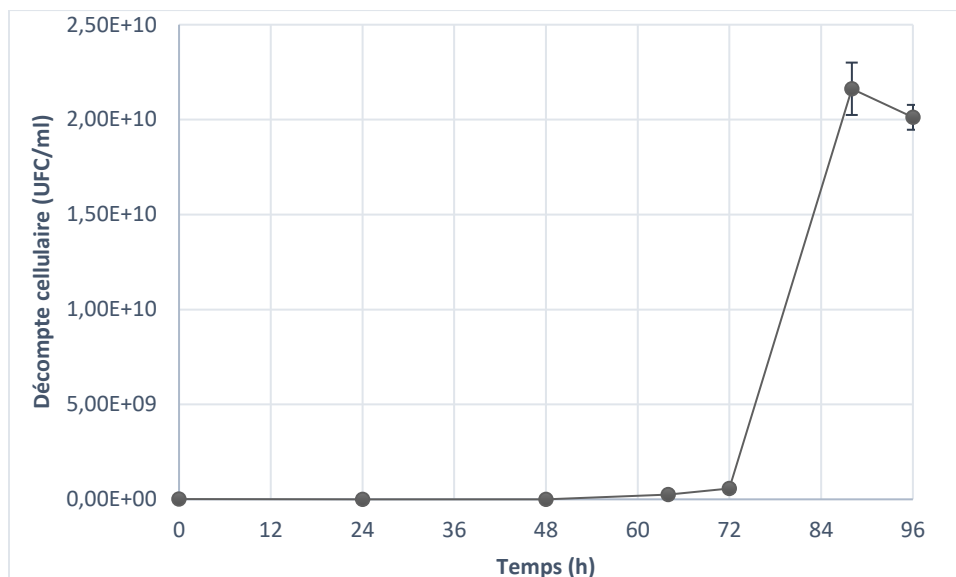


Figure 5-22 Courbe de croissance de *L. rhamnosus* dans les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote et de minéraux.

Lors de cet essai, le glucose et le fructose sont entièrement consommés après 88 h. Par contre, il reste toujours une quantité résiduelle de galactose présent dans le substrat. Il est donc encore possible de voir une nette préférence du micro-organisme pour les monosaccharides. Le ratio $Y_{x/s}$ est de $2,86 \times 10^8$ UFC/g de sucres dans la phase de croissance, ce qui est supérieur à celui obtenu lors de l'essai précédent. L'ajout d'une source de minéraux semble donc rendre plus efficace le métabolisme des sucres pour la croissance de *L. rhamnosus*. Une des possibilités est qu'un ou que les deux minéraux ajoutés, soit le magnésium et le manganèse, soient des cofacteurs importants d'enzyme dans la voie des pentoses-phosphates. L'efficacité obtenue dans l'essai témoin est plus basse que celle obtenue lors de cet essai, ce qui démontre une nette amélioration par rapport aux résultats de l'essai.

La quantité d'acide lactique produite dans cet essai est de 62,5 g/L et la quantité d'acide propionique est de 0,9 g/L (Figure 5-24). Aucun acide acétique n'est produit. Le rendement $Y_{P/S}$ est de 0,8 g d'acide lactique/g de sucres consommés durant la phase exponentielle. Les résultats de production d'acide lactique sont plus élevés que les précédents et indiquent une amélioration du procédé, induit par l'ajout d'une source d'azote.

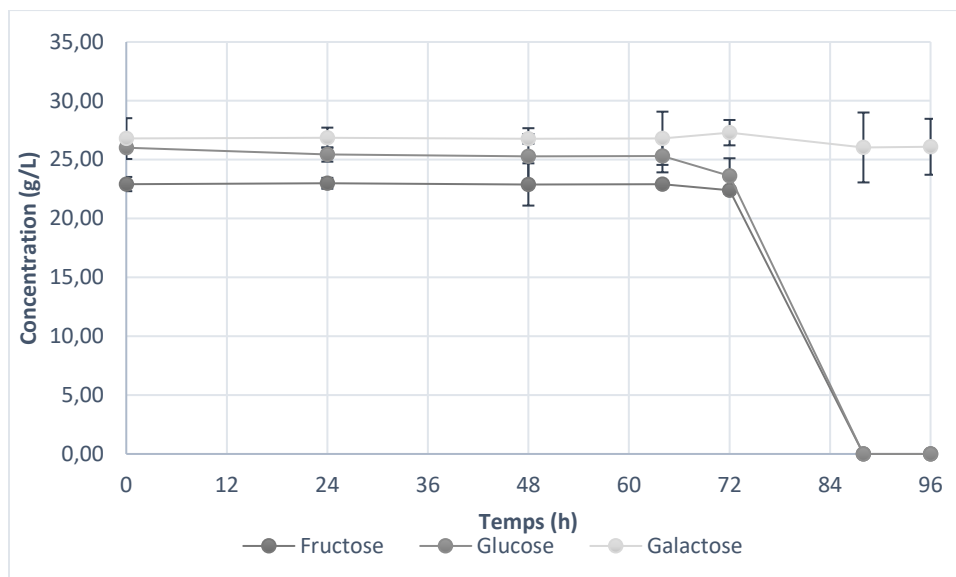


Figure 5-23 Consommation du sucre par *L. rhamnosus* lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote et de minéraux.

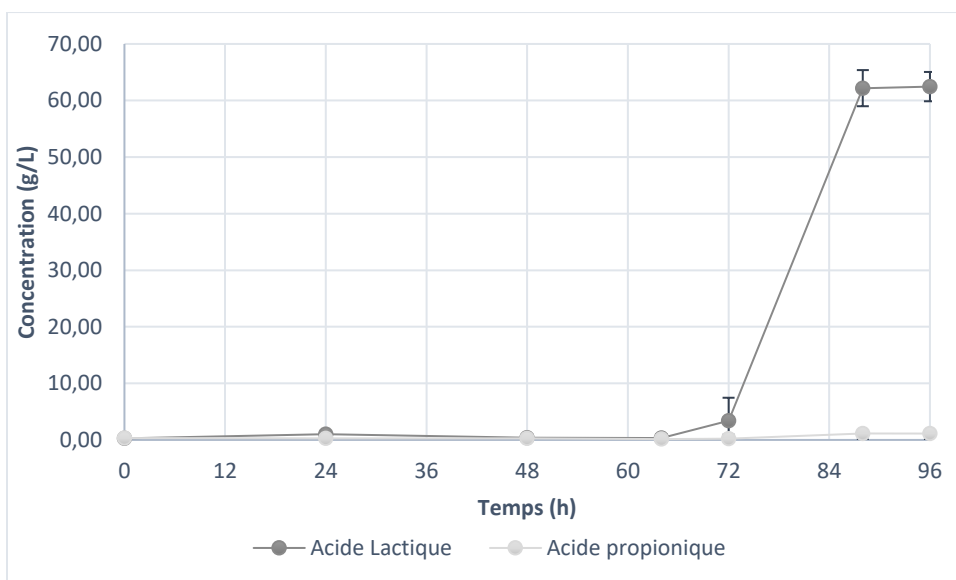


Figure 5-24 Production d'acides organiques par *L. rhamnosus* lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote et de minéraux.

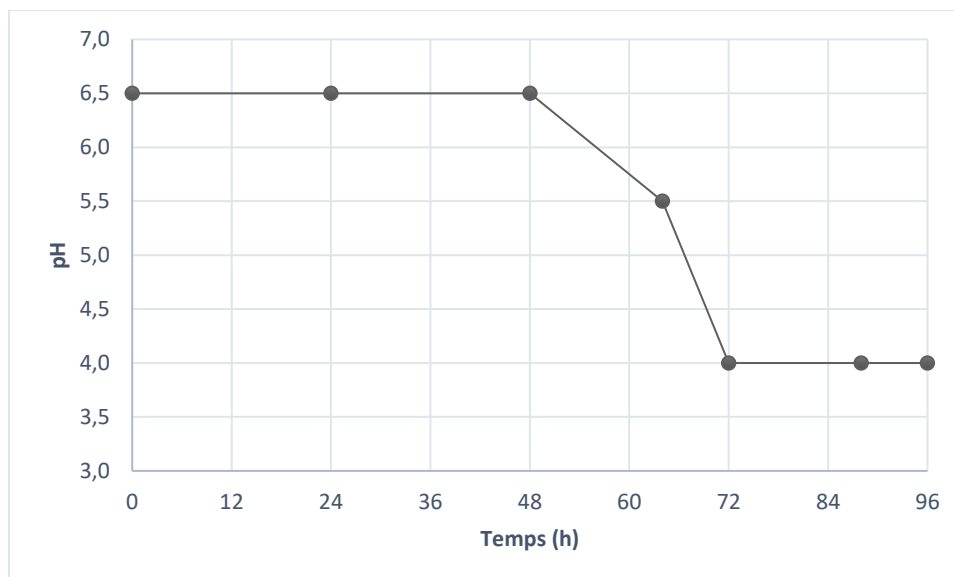


Figure 5-25 Évolution du pH lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote et de minéraux.

Tout comme lors de l'essai précédent, les acides organiques produits provoquent une baisse du pH, qui peut être problématique lors de la fermentation, mais qui démontre également l'efficacité de la méthode.

5.3.4.4 Essai 5 : Résidus agroalimentaires 1/3 + minéraux et azote

Puisque la phase de latence est très longue et qu'il est préférable d'avoir une base de comparaison valable avec l'essai témoin, un essai avec les résidus agroalimentaires dilués 1/3 a été effectué. Cet essai contient une quantité de sucres approximativement égale à celle présente dans le témoin, ce qui permet de voir l'efficacité des sucres contenus dans les résidus agroalimentaires.

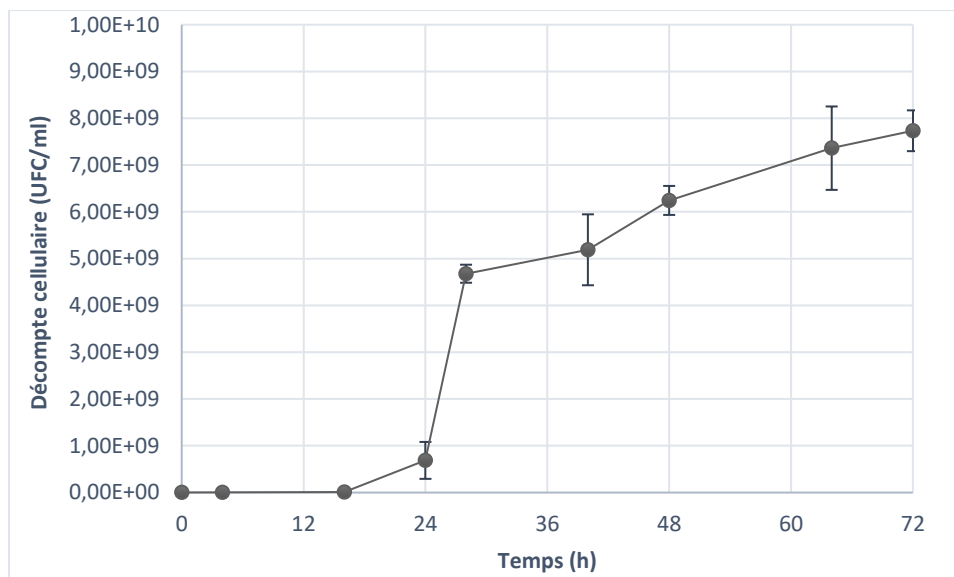


Figure 5-26 Courbe de croissance de *L. rhamnosus* dans les résidus agroalimentaires 1/3 supplémentés d'azote et de minéraux.

Lors de cet essai, une concentration cellulaire maximale de $7,7 \times 10^9$ UFC/mL a été obtenue, avec un μ_{\max} de $0,33 \text{ h}^{-1}$. Les valeurs maximales de croissance sont donc très semblables à celles obtenues pour l'essai témoin avec le milieu MRS, qui a obtenu une concentration cellulaire maximale de $9,5 \times 10^9$ UFC/mL et un μ_{\max} de $0,37 \text{ h}^{-1}$. On note donc une efficacité de croissance similaire à celle obtenue dans le témoin. L'hypothèse de l'inhibiteur présent dans les résidus agroalimentaires devient plus évidente, puisque la période de latence dans cet essai a énormément diminué, en effet, elle est passée d'environ 48 h à environ 16 h. Par contre, il est possible que la quantité de sucres présents dans les résidus agroalimentaires provoque l'inhibition. Puisque trois types de sucres sont présents, et chacun dans des concentrations raisonnables (sous la barre des 20g/L utilisés dans l'essai témoin), il est fortement improbable que cela soit le cas. De plus, l'absence de diminution importante de la quantité de *L. rhamnosus* au début de la fermentation dans cet essai, contrairement aux autres essais, est un argument supplémentaire pour confirmer cette hypothèse.

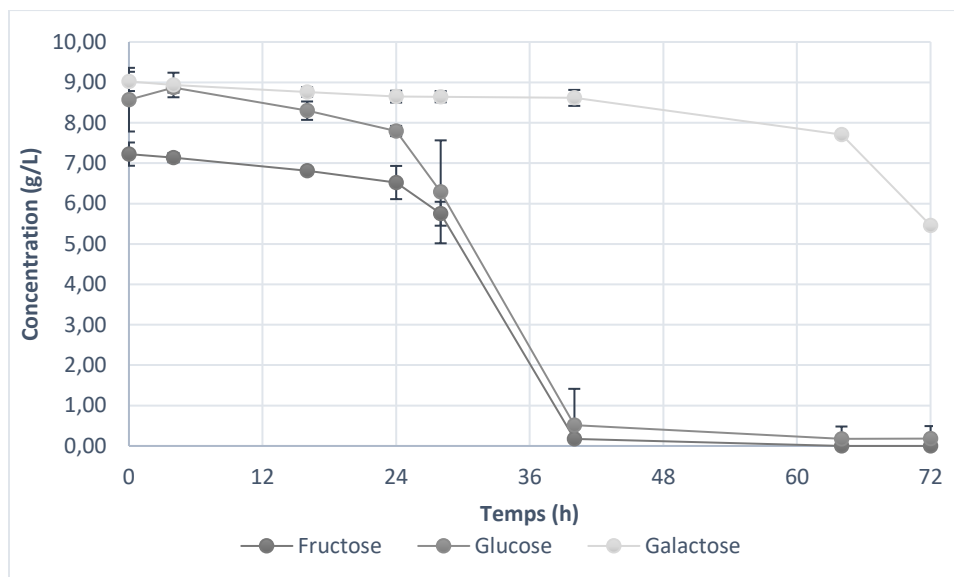


Figure 5-27 Consommation du sucre par *L. rhamnosus* lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires 1/3 supplémentés d'azote et de minéraux.

Lors de cet essai, il est possible de remarquer, tout comme dans les autres essais, que le galactose est très peu consommé. Le ratio $Y_{x/s}$ est de $3,12 \times 10^8$ UFC/g de sucres, ce qui est supérieur à celui obtenu lors de l'essai précédent, mais inférieur à l'essai témoin. Compte tenu du fait que la quantité de sucres est trois fois plus faible que lors de la fermentation avec les résidus agroalimentaires non dilués, la diminution de ce ratio était prévisible, puisqu'il y a moins d'inhibition par excès de substrat. Par contre, les sucres dans le substrat dilué atteindront plus rapidement une concentration critique ou il y aura une limitation par manque de substrat à consommer. Par exemple, cette concentration critique peu représenter 15 % des sucres totaux dans l'essai avec le substrat dilué, mais seulement 5 % dans l'essai avec le substrat non dilué.

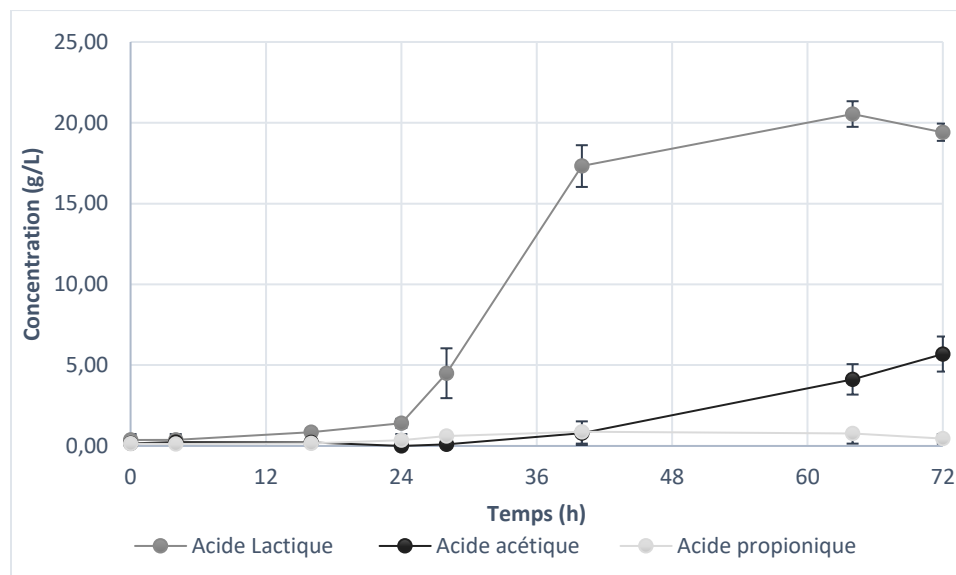


Figure 5-28 Production d'acides organiques par *L. rhamnosus* lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires 1/3 supplémentés d'azote et de minéraux.

Une quantité maximale de 20,5 g/L d'acide lactique a été produite dans cet essai (Figure 5-28). Cela correspond à un rendement de 0,8 g d'acide lactique/g de sucres consommés dans la phase de croissance. Le rendement est très semblable à celui obtenu lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires non dilués, mais plus petit que celui obtenu avec l'essai témoin dans le MRS (0,93 g d'acide lactique/g de glucose). Par contre, 5,5 g/L d'acide acétique ont été produits. Bien que démontrant que le métabolisme n'était pas complètement homofermentaire, probablement dû au manque de sucres, la production d'acide acétique comme coproduit pourrait être intéressante pour l'industrie. La présence d'acide acétique compliquerait cependant toutes les étapes de purification suivant la fermentation et donc la récupération d'acide lactique.

La diminution du pH est plus faible lors de cet essai, ce qui est facilement expliqué par la quantité plus faible d'acides organiques produits.

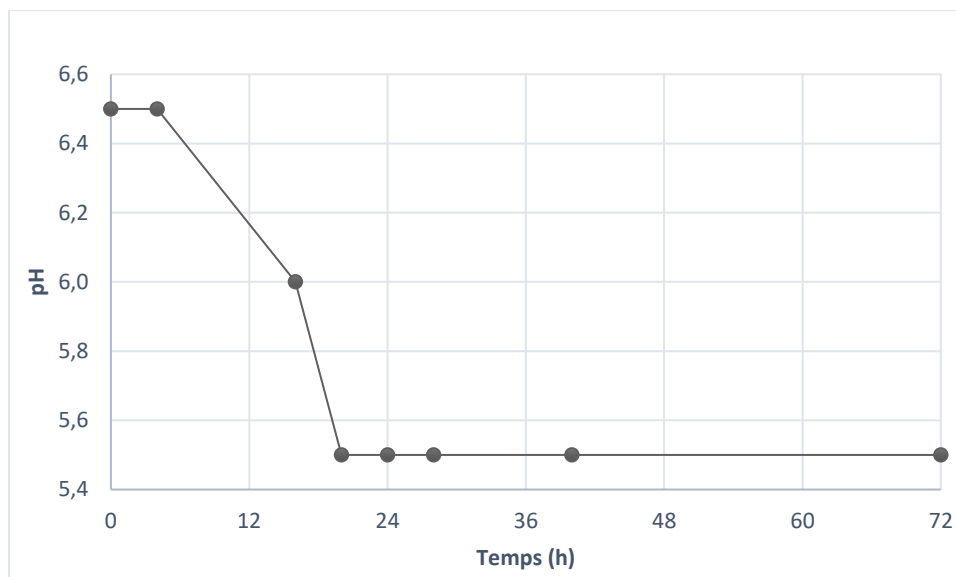


Figure 5-29 Évolution du pH lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires 1/3 supplémentés d'azote et de minéraux.

5.3.4.5 Essai 6 : Résidus agroalimentaires 1/3 + minéraux et azote + ajout de résidus agroalimentaires (« fed-batch »)

Tout d'abord, il est intéressant de noter l'allure générale de la courbe. Lors de la période où l'ajout du substrat est effectué, on remarque une diminution de la concentration cellulaire. Ce phénomène est probablement causé par le composé inhibiteur présent dans le substrat. Cet essai, qui avait essentiellement pour but de limiter l'inhibition par le composé toxique, semble donc remplir son office, car, bien que présente, la diminution est nettement moins marquée que dans les essais précédents, où la concentration cellulaire tombait sous la barre des $X 10^2$ UFC/mL. La concentration cellulaire maximale dans cet essai est de $3,51 \times 10^9$ UFC/mL, tandis que le μ_{\max} est de $0,27 \text{ h}^{-1}$ avant la période d'ajout de substrat et de $0,15 \text{ h}^{-1}$ après la période d'ajout.

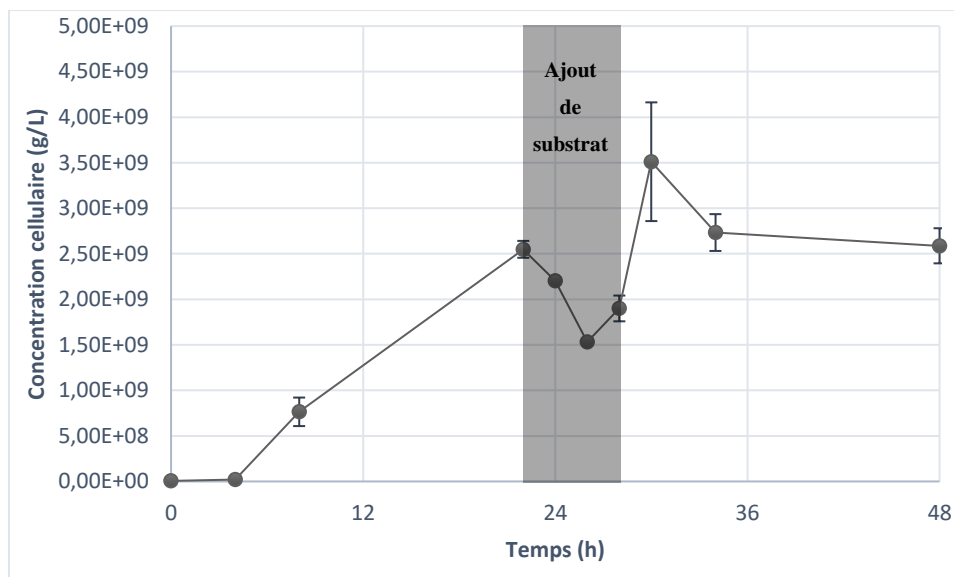


Figure 5-30 Courbe de croissance de *L. rhamnosus* lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires en « fed-batch ».

L'ajout des résidus agroalimentaires non dilué dans le milieu de culture a été planifié selon les données obtenues lors de l'essai précédent, puisque le milieu de base était semblable. Par contre, plusieurs facteurs n'ont pas été considérés lors de cette planification. Les différences entre les essais en erlenmeyer et cet essai en fermenteur sont nombreuses et ont donc contribué à une cinétique de croissance et de consommation de sucres plus rapide. Entre autres, l'agitation est maintenant effectuée avec un agitateur à turbine Rushton. L'aération supplémentaire et l'ajustement automatique du pH peuvent également accélérer la cinétique de croissance de *L. rhamnosus*. La concentration de sucres dans l'essai « fed-batch » a atteint un seuil critique (sous la limite de détection) avant que l'ajout de substrat commence, dû à ces différences. Normalement, pour être efficace, la concentration en sucres ne doit jamais atteindre un seuil critique qui change selon la nature du sucre et le micro-organisme utilisé. Pour cet essai, l'ajout de substrat correspondait au début de la phase exponentielle dans l'essai en erlenmeyer avec les résidus agroalimentaire 1/3, mais, dans l'essai « fed-batch » les bactéries lactiques atteignaient déjà la fin de la phase exponentielle. La poussée de croissance qu'aurait dû induire le substrat a donc été plus difficile, surtout compte tenu de la présence possible de composés toxiques. De plus, la période d'ajout de substrat aurait pu être plus longue, puisque presque tous les sucres, incluant le galactose, ont été consommés très rapidement après la fin de cette période.

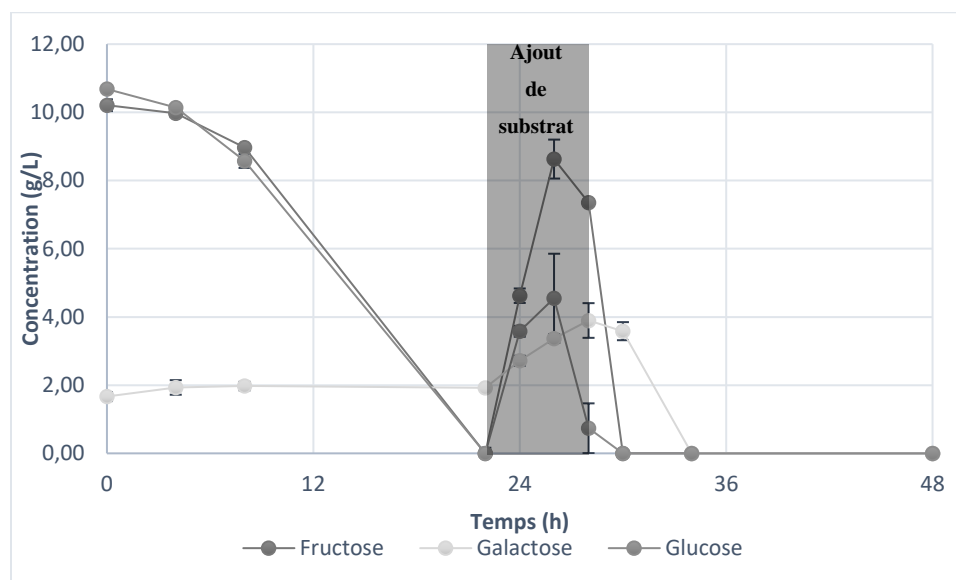


Figure 5-31 Évolution de la concentration de sucre par *L. rhamnosus* lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires « fed-batch ».

Un ratio $Y_{X/S}$ de $9,1 \times 10^7$ UFC/ g de sucres est obtenu lors de cet essai, ce qui est plus bas que dans les autres essais. Ce résultat est probablement causé par le choc toxique présent lors de la période d'ajout de substrat, qui a diminué la quantité de *Lactobacillus rhamnosus*. Il est possible de remarquer aussi ce phénomène en observant la courbe de production des acides organiques. En effet, une stabilisation de la quantité des deux acides organiques produits est observée lors de la période d'ajout de substrat. La quantité d'acide lactique produite est de 42,6 g, au maximum (Figure 5-32). De plus, 20,9 g/L d'acide acétique ont également été produits. Le métabolisme de *L. rhamnosus* n'était donc pas totalement homofermentaire lors de cet essai. Le manque de sucres présents avant la période d'ajout a pu amplifier ce phénomène, même s'il était déjà visible avant ce manque. Le rendement de $Y_{P/S}$ obtenu est donc de 1,1 g d'acide lactique/g de sucre et le rendement de $Y_{P/S}$ 0,54 g d'acide acétique/g de sucre.

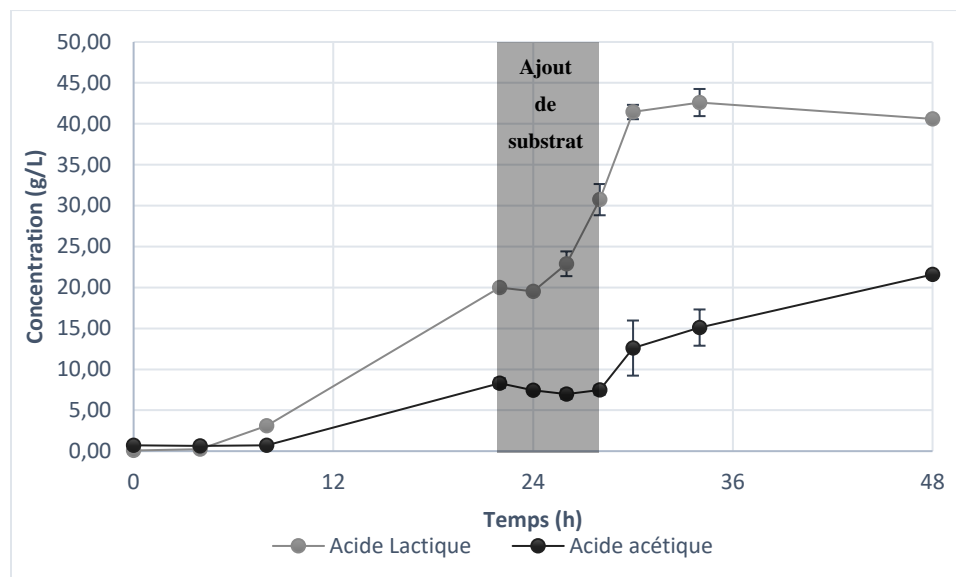


Figure 5-32 Production d'acides organiques par *L. rhamnosus* lors de l'essai avec les résidus agroalimentaires « fed-batch ».

5.3.4.6 Synthèse des essais avec les résidus agroalimentaires

Dans les essais effectués avec les résidus agroalimentaires, une quantité appréciable d'acide a été produite, avec un maximum à 62,5 g/L. Une des problématiques importantes des essais menés avec les résidus agroalimentaires est que le temps de fermentation est très long. En effet, avec les résidus non dilués, 96 h sont nécessaires pour atteindre un maximum de production. Par contre, avec le substrat dilué 1/3, seulement 64 h sont nécessaires. Afin de diminuer le temps de latence et d'améliorer le temps de fermentation, un essai « fed-batch » a été effectué. Le temps de fermentation a été réduit à 34 h, pour obtenir le maximum d'acide lactique, dans cet essai. Par contre, la quantité maximale d'acide lactique est inférieure à celle produite lors l'essai avec les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote et de minéraux. Pour pallier à ce manque, il serait intéressant de concentrer les sucres présents dans les résidus agroalimentaires, avec une filtration membranaire, puis d'utiliser ce concentré lors de la période d'ajout de substrat. La quantité de sucres ajoutés pourra donc être plus importante et la quantité d'acide lactique produit de même. Par contre, il est difficile de pouvoir juger l'effet du procédé de concentration sur le composé inhibiteur qui semble être présent dans le substrat. Dans l'essai « fed-batch », la production d'une

quantité importante d'acide acétique a été observée. Cet acide pourrait également être récupéré, puis valorisé.

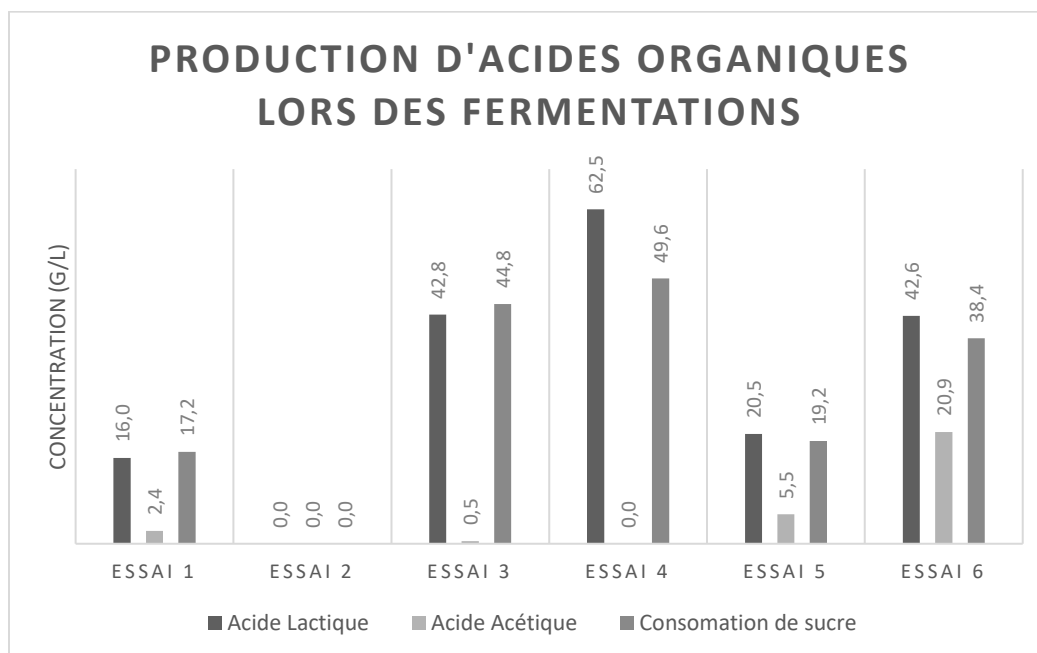


Figure 5-33 Synthèse des essais effectués avec les résidus agroalimentaires

La présence d'azote ajouté est absolument nécessaire pour obtenir une fermentation efficace. De plus, l'ajout de magnésium et de manganèse dans les résidus agroalimentaires contribue à l'accroissement du rendement de production. En effet, la quantité d'acide lactique produit passe de 42,8 g/L à 62,5 g/L, ce qui est une amélioration de 19,7 g/L (46 % d'augmentation).

5.3.5 Synthèses et comparaison des trois types de substrats carbonés

Trois différents substrats ont été évalués dans le présent mémoire, l'hydrolysat Kraft, l'hydrolysat de pâte thermomécanique et les résidus agroalimentaires. Chacun de ces substrats comportait des défis différents.

L'hydrolysat Kraft est composé principalement de xylose, qui est un sucre plus difficile à métaboliser pour *L. rhamnosus*. De plus, celui-ci contient aussi une grande variété d'inhibiteurs, comprenant, principalement, des composés phénoliques. Pour cette raison, la quantité d'acide lactique produit dans l'hydrolysat Kraft a été très limitée, même avec des ajouts de différent type (azote, minéraux et glucose) et une bonne détoxification.

De son côté, l'hydrolysat de pâte thermomécanique a, au contraire, démontré d'excellents résultats, soit un maximum d'acide lactique produit de 66,9 g/L et un $Y_{P/S}$ de 0,7 g d'acide lactique/g de sucre consommé. Par contre, une fermentation plus longue était nécessaire. Les sucres résiduels ont une concentration de 74,6 g/L. L'efficacité de la fermentation n'est donc pas encore au point.

Les résidus agroalimentaires comportent probablement une toxine, le limonène, et la phase de latence avant la fermentation est donc très longue. Malgré ce fait, une concentration maximale de 62,5 g/L a été atteinte en 96 h lors d'un essai comportant des ajouts d'azote et de minéraux. Le rendement $Y_{P/S}$ est alors de 0,8 g d'acide lactique/g de sucre consommé dans la phase exponentielle. Lors d'une fermentation de type « fed-batch », une concentration maximale d'acide lactique de 42,6 g/L est atteinte en 34 h et le rendement $Y_{P/S}$ est alors de 1,1 g d'acide lactique/g de sucre consommé. La concentration d'acide lactique est plus faible, mais celle-ci est produite beaucoup plus rapidement. De plus, une concentration de 20,9 g/L d'acide acétique est alors produite, qui est un produit secondaire intéressant pour l'industrie.

Les critères de base pour considérer l'hypothèse de recherche présentée à la section 3.1 sont d'avoir un rendement comparable à ceux obtenus dans la littérature et une concentration en acide lactique maximale semblable. Puisque *L. rhamnosus* produit, dans la littérature, un maximum de 73,0 g/L et a un rendement de $Y_{P/S}$ 0,97 g d'acide lactique/g de sucre potentiel, les seuls substrats qui répondent au critère et sont considérés efficaces sont l'hydrolysat de pâte thermomécanique et les résidus agroalimentaires.

CHAPITRE 6 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

L'objectif de ce projet était la revalorisation des résidus agroalimentaires et des courants de procédé de l'industrie papetière en produisant de l'acide lactique à l'aide d'un procédé biotechnologique. De plus, la caractérisation des substrats était un objectif parallèle à atteindre.

Les essais réalisés avec l'hydrolysats Kraft n'ont pas permis de produire une quantité d'acide lactique importante. Malgré ce fait, les essais réalisés ont permis de caractériser le substrat et de mettre en évidence certaines informations sur le substrat. Par exemple, celui-ci contient une grande quantité d'inhibiteurs et la bactérie lactique choisie, *Lactobacillus rhamnosus* ne semble pas produire d'acide lactique en leur présence, d'autant plus que le sucre principal dans le substrat est le xylose, plus difficile à métaboliser pour la bactérie lactique. L'utilisation d'une nouvelle souche, plus tolérante aux inhibiteurs présents et qui métabolise mieux le xylose pourrait être une piste de solution.

Les essais réalisés avec l'hydrolysats de pâte thermomécanique ont été limités par le temps disponible. Malgré ce fait, celui-ci a présenté d'excellents résultats avec une production d'acide lactique de 66,9g/L, soit le plus élevé parmi tous les essais effectués. Par contre, cet essai aurait probablement donné de meilleurs résultats s'il avait été effectué sur une plus longue période. D'autres essais devront être réalisés pour confirmer l'efficacité de l'hydrolysats. Étant donné que l'industrie papetière doit trouver des façons de rester rentable malgré l'émergence des nouveaux médias numériques, la production d'acide lactique à partir de l'hydrolysats de pâte thermomécanique pourrait être une voie à explorer plus longuement.

En tenant compte des nouvelles politiques bientôt en vigueur concernant les résidus organique, qui ne pourront plus être jetées dans les sites d'enfouissement, de bonnes avancées ont été effectuées. En effet, les résultats obtenus dans ce projet offrent une nouvelle voie de valorisation des rejets agroalimentaires. Une concentration de 62,5 g/L d'acide lactique, au maximum, a été produite en 96 h dans les résidus agroalimentaires supplémentés d'azote et de minéraux. Par contre, selon les

saisons et les lieux de production, une grande variabilité dans la biomasse disponible est à prévoir et les résultats peuvent donc différer de ceux présentés dans cette étude.

Pour améliorer la production d'acide lactique, il serait intéressant d'explorer davantage la voie de recherche de la fermentation « fed-batch ». La possibilité de concentrer les sucres présents dans les résidus agroalimentaires, puis d'utiliser ceux-ci comme ajout dans la fermentation permettrait d'obtenir une concentration plus importante de sucres et ce, pour un même volume de fermentation.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., Sonomoto, K., 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol. Adv.* 31, 877–902. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.04.002
- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., Sonomoto, K., 2010. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *J. Biotechnol.* 156, 286–301. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.017
- Ajao, O., LeHir, M., Rahni, M., Marinova, M., Chadjaa, H., Savadogo, O., 2015. Concentration and Detoxification of Kraft Prehydrolysate by Combining Nanofiltration with Flocculation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 54, 1113–1122.
- Akerberg, C., Hofevendap, K., Zacchi, G., Hahn-Hagerdal, B., 1998. Modelling the influence of pH , temperature , glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp . *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 682–690.
- Allard-Massicotte, R., Chadjaa, H., Marinova, M., 2017. Phenols Removal from Hemicelluloses Pre-Hydrolysate by Laccase to Improve Butanol Production. *Fermentation* 3. doi:10.3390/fermentation3030031
- Assavasirijinda, N., Ge, D., Yu, B., Xue, Y., Ma, Y., 2016. Efficient fermentative production of polymer-grade d-lactate by an engineered alkaliphilic *Bacillus* sp. strain under non-sterile conditions. *Microb. Cell Fact.* 15, 3. doi:10.1186/s12934-015-0408-0
- Baker, D.A., Rials, T.G., 2013. Recent advances in low-cost carbon fiber manufacture from lignin. *J. Appl. Polym. Sci.* 130, 713–728. doi:10.1002/app.39273
- Baral, N.R., Shah, A., 2014. Microbial inhibitors: formation and effects on acetone-butanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9151–9172. doi:10.1007/s00253-014-6106-8
- Bene, V., Malinová, L., Kalousková, R., 2014. Stability of poly (L -lactic acid) in textile applications. *Polymes Adv. Technol.* doi:10.1002/pat.3329
- Bevilacqua, A., Corbo, M.R., 2010. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Eugenol

- , Limonene , and Citrus Extract against Bacteria and Yeasts , Representative of the Spoiling Microflora of Fruit Juices. *J. Food Prot.* 73, 888–894.
- Browne, T., 2012. NWBC 2012 The 4th Nordic Wood Biorefinery. pp. 214–220.
- Butterwick, K., Lowe, N.J., 2009. Injectable poly-L-lactic acid for cosmetic enhancement : Learning from the European experience. *J. Am. Dermatology* 61, 281–293. doi:10.1016/j.jaad.2008.11.881
- Choi, G., Kim, J., Lee, C., 2016. Effect of low pH start-up on continuous mixed-culture lactic acid fermentation of dairy effluent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 10179–10191. doi:10.1007/s00253-016-7871-3
- CRIBIQ, 2017. La filière québécoise des matériaux biosourcés : chaîne de valeur et opportunités de marchés [WWW Document]. URL <http://cribiq.qc.ca/nos-services/evenements/la-filiere-quebecoise-des-materiaux-biosources-chaîne-de-valeur-et-opportunités-de-marchés> (accessed 4.26.17).
- Cui, F., Wan, C., Li, Y., Liu, Z., Rajashekara, G., 2012. Co-production of Lactic Acid and *Lactobacillus rhamnosus* Cells from Whey Permeate with Nutrient Supplements. *Food Bioprocess Technol.* 5, 1278–1286. doi:10.1007/s11947-010-0426-1
- Davidowski, S., Brian, D., 2009. The Extraction and Quantification of Limonene from Citrus Rinds Using GC / MS. *PerkinElmer* 1–4.
- Dusselier, M., Wouwe, P. Van, Dewaele, A., Makshina, E., Sels, B.F., 2013. Environmental Science Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. *Energy Environ. Sci.* 6, 1415–1442. doi:10.1039/c3ee00069a
- Forcier, F., Gravel, M.-H., Vigneux, J., Doucet, J., Gaudet, D., 2013. Portrait du gisement de résidus organiques de l'industrie agroalimentaire au Québec et estimation des aliments consommables gérés comme des résidus par les ICI de la filière de l'alimentation.
- Fu, K., Yue, Q., Gao, B., Sun, Y., Zhu, L., 2013. Preparation, characterization and application of lignin-based activated carbon from black liquor lignin by steam activation. *Chem. Eng. J.* 228, 1074–1082. doi:10.1016/j.cej.2013.05.028
- Gendron, A., Majeau, J.-A., Fournier, I., Tremblay, I., 2012. Bannissement des matières organiques

de l' élimination au Québec : état des lieux et prospectives Février 2012.

- Gonc, L.M.D., 1997. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 346–351.
- Gupta, B., Revagade, N., 2007. Poly (lactic acid) fiber : An overview. *Prog. Polym. Sci.* 32, 455–482. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.01.005
- He, Q., Wu, W., Xiu, K., Zhang, Q., Xu, F., Li, J., 2013. Controlled drug release system based on cyclodextrin-conjugated poly (lactic acid) - b -poly (ethylene glycol) micelles. *Int. J. Pharm.* 443, 110–119. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.12.042
- Henton, D.E., Gruber, P., Lunt, J., Randall, J., 2005. Polylactic Acid Technology. *Nat. Fibers, Biopolym. Biocomposites* 48674, 527–578. doi:10.1201/9780203508206.ch16
- Hofvendap, K., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 87–107.
- Jamshidian, M., Tehrany, E.A., Imran, M., Jacquot, M., Desobry, S., 2010. Poly-Lactic Acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 552–571. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00126.x
- King, S. D., 2010. The Future of Industrial Biorefineries, In : *World Economic Forum*, 1–38.
- Kok, J., Johansen, E., Kleerebezem, M., Teusink, B., 2014. Lactic Acid Bacteria: embarking on 30 more years of research, in: *The 11 Th International Symposium on Lactic Acid Bacteria*. London, p. 11. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-11
- Lee, H., 2015. Development of lactic and succinic acid biorefinery configurations for integration into a thermomechanical pulp mill.
- Lew, L., Choi, S., Tan, P., Liong, M., 2013. Mn²⁺ and Mg²⁺ synergistically enhanced lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* FTDC 8313 via affecting different stages of the hexose monophosphate pathway. *J. Appl. Microbiol.* 116, 644–653. doi:10.1111/jam.12399
- Lívia, A., Senedese, C., Filho, R.M., Regina, M., Maciel, W., 2015. L-Lactic Acid Production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. *Sci. World J.* doi:10.1155/2015/501029
- Lopes, T., Marques, S., Alves, L., Roseiro, J.C., 2013. The simultaneous utilization of kinetic analysis and flow cytometry in the assessment of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

- physiological states produced by increasing oxygen limitation levels and lactic acid accumulation. *Biochem. Eng. J.* 74, 54–59. doi:10.1016/j.bej.2013.02.002
- Lu, Z., He, F., Shi, Y., Lu, M., Yu, L., 2010. Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients. *Bioresour. Technol.* 101, 3642–3648. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.119
- Madhavan Nampoothiri, K., Nair, N.R., John, R.P., 2010. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour. Technol.* 101, 8493–8501. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.092
- Mainka, H., Täger, O., Körner, E., Hilfert, L., Busse, S., Edelmann, F.T., Herrmann, A.S., 2015. Lignin – an alternative precursor for sustainable and cost-effective automotive carbon fiber. *J. Mater. Res. Technol.* 4, 283–296. doi:10.1016/j.jmrt.2015.03.004
- Marinova, M., Mateos-Espejel, E., Jemaa, N., Paris, J., 2009. Addressing the increased energy demand of a Kraft mill biorefinery: The hemicellulose extraction case. *Chem. Eng. Res. Des.* 87, 1269–1275. doi:10.1016/j.cherd.2009.04.017
- MarketsandMarkets, 2015. Lactic Acid Market by Application (Biodegradable Polymer, Food & Beverage, Personal Care & Pharmaceutical) & Polylactic Acid Market by Application (Packaging, Agriculture, Automobile, Electronics, Textile), & by Geography - Global Trends & Forecasts to 20. doi:10.1016/j.focat.2016.01.048
- Marques, S., Santos, J.A.L., Gírio, F.M., Roseiro, J.C., 2008. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochem. Eng. J.* 41, 210–216. doi:10.1016/j.bej.2008.04.018
- Mechmech, F., Chadjaa, H., Rahni, M., Marinova, M., Ben Akacha, N., Gargouri, M., 2015. Improvement of butanol production from a hardwood hemicelluloses hydrolysate by combined sugar concentration and phenols removal. *Bioresour. Technol.* 192, 287–295. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.012
- Mojovic, L. V., Vukašinovic, M.S., Djukic, A.P., Pejin, J.D., Bulatovic, M.L., 2012. Effect of different fermentation parameters on L -lactic acid production from liquid distillery stillage. *Food Chem.* 134, 1038–1043. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.011
- Narins, R.S., Baumann, L., Brandt, F.S., Fagien, S., Glazer, S., Lowe, N.J., Monheit, G.D., Rendon,

- M.I., Rohrich, R.J., 2009. A randomized study of the efficacy and safety of injectable poly-L-lactic acid versus human-based collagen implant in the treatment of nasolabial fold wrinkles. *J. Am. Dermatology* 62, 448–462. doi:10.1016/j.jaad.2009.07.040
- Neupane, B.P., Tiwari, B.R., Malla, K.P., Gautam, A., 2016. Conversion of Paper Waste Into Bioplastic (Poly-Lactic Acid), in: *Macromolecular Symposia*. pp. 263–267. doi:10.1002/masy.201650007
- Pagana, I., Morawicki, R., Hager, T.J., 2014. Lactic acid production using waste generated from sweet potato processing. *Food Sci. Technol.* 49, 641–649. doi:10.1111/ijfs.12347
- Palm, M.D., Woddhall, K.E., Butterwick, K.J., Goldman, M.P., 2010. Cosmetic Use of Poly-L-Lactic acid: A Retrospective Study of 130 Patients. *Am. Soc. Dermatologic Surg.* 161–170. doi:10.1111/j.1524-4725.2009.01419.x
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25–33. doi:10.1016/S0960-8524(99)00161-3
- Panesar, P.S., Kaur, S., 2015. Review Bioutilisation of agro-industrial waste for lactic acid production. *Food Sci. Technol.* 2143–2151. doi:10.1111/ijfs.12886
- Pejin, J., Djuki, A., Mojovi, L., 2017. Lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate by *Lactobacillus rhamnosus* with yeast extract addition and pH control. *J. Inst. Brew. Distill.* 123, 98–104. doi:10.1002/jib.403
- Pejin, J., Radosavljević, M., Mojović, L., Kocić-Tanackov, S., Djukić-Vuković, A., 2015. The influence of calcium-carbonate and yeast extract addition on lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate. *Food Res. Int.* 73, 31–37. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.023
- Piassi, M., Fontes, L., Cristina, D., Contiero, J., 2016. L - (+) -Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. *Brazilian J. Microbiol.* 47, 640–646. doi:10.1016/j.bjm.2015.12.001
- Ping, L., Jin, B., Lant, P., Zhou, J., 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochem. Eng. J.* 23, 265–276. doi:10.1016/j.bej.2005.01.009

- Québec, É. science et innovation, n.d. Le marché des biotechnologies industrielles aux États-Unis (région Moyen-Atlantique) URL <https://www.economie.gouv.qc.ca/bibliotheques/etudes-analyses/marches/le-marche-des-biotechnologies-industrielles-aux-etats-unis-region-moyen-atlantique/#c60466> (accessed 4.26.17).
- Rafione, T., 2014. DÉVELOPPEMENT D ' UNE BIORAFFINERIE FORESTIÈRE INTÉGRÉE ET.
- Ren, J., 2010. Biodegradable Poly(Lactic Acid): Synthesis, Modification, Processing and Application, Tsinghua U. ed. Beijing. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Rojan, P.J., Nampoothiri, K.M., Nair, A.S., Pandey, A., 2005. L(+)-lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 27, 1685–1688. doi:10.1007/s10529-005-2731-8
- Sanna, V., Siddiqui, I.A., Sechi, M., Mukhtar, H., 2013. Resveratrol-Loaded Nanoparticles Based on Poly(epsilon- caprolactone) and Poly(. *Mol. Pharm.* 10, 3871–3881.
- Santos, A.L., Francisco, M.G., Marques, S., Roseiro, J.C., 2008. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochem. Eng. J.* 41, 210–216. doi:10.1016/j.bej.2008.04.018
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–58. doi:citeulike-article-id:7170825
- Ten, E., Vermerris, W., 2015. Recent developments in polymers derived from industrial lignin. *J. Appl. Polym. Sci.* 132, n/a-n/a. doi:10.1002/app.42069
- Tessier, L., 2007. Technologies des procédés industriels, Centre Col. ed. Montréal.
- Thorp, B., 2005. Biorefinery Offers Industry Leaders Business Model for Major Change.
- Wee, Y., Ryu, H., 2009. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp . RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. *Bioresour. Technol.* 100, 4262–4270. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.074
- Williams, K.R., Pierce, R.E., 1998. The Analysis of Orange Oil and the Aqueous Solubility of Two Complementary Gas Chromatography Experiments. *J. Chem. Educ.* 75, 223–226.

Xu, P., Gullotti, E., Tong, L., Higpey, C.B., Errabelli, D.R., Hasan, T., Cheng, J., Kohane, D.S., Yeo, Y., 2009. Intracellular Drug Delivery by Poly (lactic- co -glycolic acid) Nanoparticles , Revisited. *Mol. Pharm.* 6, 190–201.

ANNEXE A - ÉCHANTILLONNAGE

Tableau 6-1 Planification de l'échantillonnage en erlenmeyer et en bioréacteur

Erlenmeyer		Bioréacteur	
Temps (h)	Volume échantillonnage (mL)	Temps (h)	Volume échantillonnage (mL)
0	10	0	12
4	5	4	5
16	5	8	5
20	5	12	5
24	5	22	5
28	5	24	5
40	5	26	5
44	5	28	5
48	5	30	5
52	5	34	5
64	5	46	5
68	5	48	12
72	10		