

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 498 625

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 23176

(54) Nouvelle levure pour la dégradation des sucres et des alcools et son procédé de mise en œuvre.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 12 N 1/18.

(22) Date de dépôt 24 octobre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 30 du 30-7-1982.

(71) Déposant : Société anonyme dite : EXPLOITATIONS INDUSTRIELLES DE BETAIGNE, résidant
en France.

(72) Invention de : Claude Noël.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Bugnion Propriété Industrielle,
4, rue de Haguenau, 67000 Strasbourg.

La présente invention est relative à une nouvelle levure pour la dégradation des sucres et des alcools ainsi qu'à son procédé de mise en oeuvre.

Il existe actuellement dans l'industrie alimentaire de nombreux sous-produits de fabrication ou des rejets riches en sucres et en alcools qui constituent en eux-mêmes des effluents difficiles à purifier et qu'il faut éliminer en tenant compte qu'ils présentent un caractère polluant important.

On cherche actuellement dans la mesure du possible à transformer ces produits en nourriture pour les animaux et ceci naturellement en améliorant la teneur en protéines.

Il en est ainsi, par exemple, pour les drèches de brasserie qui sont un sous-produit de l'industrie brassicole et qui résultent des matières solides à l'origine du malt. Ce malt est concassé, mélangé à l'eau et brassé afin d'en extraire des substances solubles pour fabriquer la bière. Le moût est alors séparé de la partie insoluble qui constitue les drèches. Ces drèches contiennent en résidus de brasserie jusqu'à 80 % d'eau.

Une quantité importante de drèches est actuellement commercialisée sous forme de drèches fraîches pour être immédiatement consommées et servir de base à la nourriture animale. Pour pouvoir conserver ces drèches en sacs plastiques sous vide, il est d'abord nécessaire de les presser pour en extraire un jus de pressage qui constitue en soi un sous-produit riche en sucres et dont le caractère polluant mesuré en DBO₅ est important, puisque de l'ordre de 35 000 mg O₂/l.

L'utilisation des drèches pressées présentant au niveau de son application en tant qu'aliments pour animaux des avantages importants, il était nécessaire de prévoir un traitement du jus de pressage.

La présentation de drèches sèches permet une meilleure conservation du produit qui reste disponible à tous les moments de l'année et qui permet un meilleur stockage des sacs sous vide à ciel ouvert.

L'importance de ce jus de pressage en quantité doit être négligeable puisque l'on obtient 30 à 40 % de jus de pressage par rapport aux drèches fraîches. Ce jus de pressage est actuellement stocké dans de grandes citerne puis transporté éventuellement par camion citerne pour être épandu sur des terrains agricoles.

Les procédés actuels sont peu satisfaisants puisqu'ils sont naturellement très polluants, onéreux et générateurs d'odeurs désagréables.

- 2 -

La présente invention par la nouvelle levure qui a été isolée permet de dégrader les effluents, par exemple d'origine industrie alimentaire telles que sucreries, brasseries et distilleries pour dégrader les sucres et les alcools tout en diminuant très sensiblement le caractère polluant du sous-produit.

Un autre but de l'invention est d'augmenter la teneur en protéines afin de présenter une biomasse qui constitue une base intéressante d'alimentation animale.

L'invention a également mis au point un procédé pour l'application de cette levure à différents effluents et notamment au jus de pressage des drèches des brasseries en prévoyant les conditions opératoires optimales pour obtenir la meilleure dégradation possible des sucres, une diminution sensible du caractère polluant et une augmentation de la teneur en protéines. La température de fermentation sera située entre 30 et 40 degrés Celsius alors que le pH sera maintenu entre 3,5 et 4 et pourra éventuellement être régulé en cours de traitement.

La levure selon l'invention a été déposée en nature et décrite à la Collection Nationale de cultures de micro-organismes tenue par l'Institut PASTEUR sous le n° I-128.

L'invention s'applique notamment au jus de pressage de drèches mais d'une manière plus générale à tous les effluents gazeux ou non comprenant des sucres et des alcools plus particulièrement l'éthanol. On peut, par exemple, encore dans le domaine de la brasserie traiter des bières non commercialisables, par exemple, polluées par des machines, du matériel ou de la graisse.

La levure présente un spectre intéressant et capable d'assimiler un nombre de substrats importants tels que les sucres, l'éthanol ou l'acide lactique. Une quantité importante en poids de l'ordre de 80 à 90 % des substances solubles des jus de pressage est dégradée et se transforme en protéines avec un rendement en poids de l'ordre de 50 %. L'invention prévoit également que l'on ajoute à l'effluent une source d'azote qui peut être, par exemple, de l'urée.

La levure selon l'invention qui a été isolée présente des qualités permettant une mise en œuvre industrielle intéressante et une application des produits à base de protéines dans l'industrie d'alimentation animale. Cette levure présente une bonne spécificité vis-à-vis des substrats, un temps de doublement court (de l'ordre de 1 à 2 heures).

Selon la mise en œuvre du procédé, la récolte de séchage de la

biomasse est facile alors que la teneur en protéines est élevée. Cette levure ne présente pas de pouvoir pathogène et ne produit pas de bactériocines, ni ne dégage de flaveurs désagréables.

On décrira, ci-après, à titre indicatif, une application et une mise en oeuvre de la nouvelle levure selon l'invention à la dégradation du jus de pressage des drèches des brasseries. Il est entendu que cette levure pourra être appliquée à d'autres effluents contenant des sucres ou des alcools.

Le jus de pressage des drèches est constitué d'une phase soluble 10 composée essentiellement de sucres et d'une phase insoluble qui comprend les sucres, les protéines et les matières grasses.

Des analyses de jus de pressage ont permis de parvenir aux résultats suivants constituant une moyenne sur quatre mois :

	pH	:	3,85
15	jus complet matière sèche	:	31,6 g/l
	jus azote disponible	:	0,30 g/l
	phase soluble sucre	:	11,0 g/l
	phase insoluble azote	:	1,63 g/l
	phase insoluble protéines (N x 6,25)	:	10,19 g/l

20 La teneur $\text{DBO}_5\text{-DCO}$ qui traduit la fraction des matières biodégradables facilement attaquables par une levure par rapport à la totalité des matières oxydables est de 0,52 pour l'eau brute et 0,61 pour l'eau décantée deux heures. Cela montre que l'on a affaire à un effluent facilement traitable par voie biologique en milieu aérobie. L'on constate 25 aussi que la teneur en sucres dans la partie soluble est élevée et que la partie insoluble est riche en protéines. Compte tenu que la teneur en azote disponible est faible, il sera donc indispensable d'apporter une source d'azote pour obtenir un bon développement des micro-organismes.

30 La souche de levure a été isolée sur Gélose de Sabouraud + Chloramphenicol. Le jus brut provenant d'un jus naturellement contaminé par des bactéries, des levures et des champignons est stérilisé quinze minutes à 120 degrés Celsius avant d'êtreensemencé puis incubé pendant soixante douze heures sur un agitateur réglé à 200 tours/minute et à 25 degrés Celsius. Le pH évolue librement.

Les caractéristiques de la souche ont été étudiées par le Laboratoire de Mycologie et Microbiologie Industrielle de l'Institut PASTEUR de LYON. Les caractéristiques de cette souche sont les suivantes en ce qui

- 4 -

concerne l'assimilation :

Glucose + ; Galactose + ; Maltose + ; Saccharose + ; Ethanol + ;
Xylose + ; Théhalose + ; Cellobiose + ; Sorbose + ; Arabinose +.

L'influence de la température sur les différents paramètres a été
5 étudiée. Il s'agit des paramètres suivants et les résultats sont repor-
tés sur le tableau ci-après :

- Constante de la croissance ;
- Sucres ;
- DBO₅ ;
- 10 • Baisse de la DBO₅ ;
- Biomasse récupérée.

15

20

25

30

35

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

:	TEMPERATURE	(°C)	:	20	:	25	:	30	:	33	:	35	:	38	:	41	:
:	Durée du traitement	(heures)	:	18	:	12	:	10	:	9	:	9	:	9	:	9	:
:	Constantes	temp de génération (mn)	:	285	:	139	:	94	:	68	:	76	:	120	:	187	:
:	Taux de croissance de la croissance	(Nb de divisions par heure)	:	0,21	:	0,43	:	0,63	:	0,88	:	0,79	:	0,50	:	0,32	:
:	SUCRES g/l	Début fermentation	:	6,8	:	5,7	:	8,4	:	6,6	:	5,6	:	6,0	:	6,0	:
:		Fin fermentation	:	2,0	:	2,0	:	1,6	:	0,9	:	1,0	:	1,6	:	2,0	:
:	DBO ₅ (mg/l)	jus complet	:	35.200	:	32000	:	35.200	:	29.600	:	35.200	:	29.600	:	29.600	:
:		début fermentation	:	4.240	:	8600	:	10.800	:	9.000	:	9.800	:	9.000	:	9.000	:
:		jus centrifugé	:	2.800	:	3040	:	2.560	:	2.800	:	2.720	:	2.320	:	2.960	:
:	Baisse de la DBO ₅	par rapport au jus centrifugé	:	34	:	64,65	:	76,3	:	68,8	:	72,2	:	74,2	:	67,1	:
:		par rapport au jus complet	:	92	:	90,5	:	92,7	:	90,5	:	92,2	:	92,1	:	90,0	:
:	Matière sèche jus complet départ g/l		:	41,6	:	37,5	:	36,9	:	38,1	:	35,7	:	36,0	:	34,9	:
:		Biomasse récupérée (g/l)	:	29	:	28,6	:	29,2	:	24,9	:	22,7	:	25,2	:	24,8	:

- 6 -

Lors de la fermentation, *Candida purifis* dégrade d'abord l'acide lactique, puis les sucres qui n'ont pas été attaqués par les fermentes lactiques. Cette contamination naturelle ne perturbe pas la fermentation car les fermentes lactiques sont inhibés en milieu aérobie.

5 La figure 1 montre que la température optimale de mise en oeuvre se situe entre 32 et 35 degrés Celsius. Le taux de croissance est alors de 0,75 (temps de division = 1h 20').

On peut tirer des renseignements importants du tableau qui précède et l'on en donne ci-après quelques uns à titre indicatif :

10

1 - les levures sont capables de dégrader environ 70 % de la DBO₅ du surnageant (acide lactique + sucres solubles) ;

15

2 - le traitement complet (fermentation et centrifugation) permet de baisser la DBO₅ de 90 % environ ;

20

3 - la biomasse récupérée représente environ 70 % de la matière sèche départ. Cette biomasse est constituée du mélange : phase insoluble du jus de pressage - levures ;

4 - entre 30 et 40 degrés Celsius, la fermentation dure de huit à dix heures.

25

L'influence du pH sur les différents paramètres, durée du traitement, constante de la croissance, concentration en sucres, DBO₅ et biomasse a également été étudiée. Les résultats entre pH 2,5 et 4,5 ont été rassemblés dans le tableau ci-après :

30

35

INFLUENCE DU PH

:	pH	:	2,5	:	3,0	:	3,5	:	4,0	:	4,5	:
:	Durée du traitement (heures)	:	11	:	10	:	10	:	11	:	10	:
: Constantes	: temps de génération (mn)	:	108	:	75	:	69	:	68	:	84	:
: de la croissance	: taux de croissance (1/hr)	:	0,55	:	0,80	:	0,87	:	0,88	:	0,71	:
: SUCRES	: Début fermentation	:	10,5	:	6,30	:	9,0	:	6,6	:	9,7	:
: g/l	: Fin fermentation	:	2,1	:	1,8	:	1,8	:	0,9	:	2,2	:
:	: jus complet	:	32.000	:	22.000	:	32.000	:	29.600	:	37.600	:
:	: début fermentation	:		:		:		:		:		- 7 -
: DBO ₅	: jus centrifugé	:	10.800	:	6.200	:	10.800	:	9.000	:	13.600	:
: mgO ₂ /l	: début fermentation	:		:		:		:		:		:
:	: jus centrifugé	:	3.520	:	2.480	:	2.560	:	2.800	:	2.960	:
:	: fin fermentation	:		:		:		:		:		:
: Baisse	: par rapport au jus centrifugé	:	67,4	:	60,0	:	76,3	:	68,8	:	78,2	:
: de la	: par rapport au jus complet	:	89,0	:	88,7	:	92,0	:	90,5	:	92,1	:
: DBO ₅	: Matière sèche jus complet départ	:	39,0	:	28,0	:	31,5	:	44,2	:	33,5	:
: Biomasse récupérée g/l	:	27,7	:	16,1	:	21,2	:	27,7	:	23,0	:	

- 8 -

La figure 2 montre qu'il est possible de mettre en oeuvre la source de levure entre pH 3 et pH 4 avec un taux de croissance élevé : 0,80 (lh 15'). Il faut souligner que le pH naturel du jus de pressage est toujours compris entre ces valeurs.

5 Si l'on se réfère au dernier tableau ci-dessus, on peut faire les constatations suivantes :

1°) la baisse de la DBO₅ est en moyenne de 70 % par rapport au jus centrifugé et de 90-92 % par rapport au traitement global envisagé.

10 2°) la Biomasse récupérée représente environ 65 % de la matière sèche départ.

15 3°) la fermentation dure environ dix heures.

Des essais ont également été effectués en culture continue en tra-vaillant à un taux de dilution compris entre 0,10 et 0,25. La DBO₅ de l'effluent fermenté est voisine de 2000 à 2500 milligrammes par litre et la concentration de sucres non attaqués est comprise entre 1,4 et 2,0 g/l. Parmi les sucres non attaqués, ont été identifiés le glucose, l'arabinose et le Xylose. Ces sucres se trouvent probablement sous forme de "gommes" difficiles à attaquer.

20 L'analyse de la biomasse a permis de déterminer la composition suivante :

Humidité	6,3 %
Matières minérales	3,9 %
Matières azotées totales	58,2 %
Azote soluble	10,9 %
25 Cellulose	2,0 %
Chlorure (Na cl)	5,3 %
Calcium	3,7 %
Insoluble chlorydrique	0,4 %
Matières grasses	11,7 %
30 Sucres	traces

Il faut remarquer que :

- 1°) la biomasse produite est riche en matière azotée ;
 2°) la presque totalité des sucres de la phase insoluble a été dégradée (le taux de sucre de départ est voisin de 15 à 25 %) ;
 35 3°) la valeur énergétique n'est pas directement calculable car le coefficient de digestibilité n'est pas défini mais en première approximation on peut estimer sa valeur à 0,95 U.F.

Le traitement efficace du jus de pressage de drêches de brasserie

permet donc d'éliminer les substances insolubles et de biodégrader les sucres solubles. Ce traitement peut être appliqué en continu ou en dis-continu et l'on peut considérer qu'il est rapide puisque la culture dure huit à dix heures. La levure présente un taux de croissance élevé 5 voisin de 0,80 (temps de division de 1h 15').

L'on constate d'une manière générale que :

- la fermentation aérobie permet de faire baisser la DBO₅ de la phase soluble de 70 % ;
- 10 - le traitement complet (fermentation + centrifugation) fait baisser la DBO₅ de 90-92 % ;
- la DBO₅ de l'effluent fermenté est voisine de 2500 - 3000 (elle est inférieure à 2000 pour un traitement en culture continue à un taux de dilution voisin de 0,10) ;
- 15 - nous observons un taux résiduel de sucres voisin de 1,5 - 2 g/l (il s'agit essentiellement de Xylose et d'Arabinose qui se trouvent certainement sous forme de "gommes". Ces substances sont difficiles à attaquer).

Nous constatons également que la solution envisagée pour le traitement du jus de pressage des drêches présente plusieurs avantages :

- 20 - le traitement demande peu d'apport de substances indispensables à une croissance active de levures (urée comme source d'azote et acide sulfurique pour réguler le pH) ;
- le traitement s'effectue non stérilement ;
- 25 - on récupère une biomasse (20 - 22 g/l) qui est un mélange levures-phase insoluble des jus de pressage. Cette biomasse est riche en protéines.

Pour mettre en oeuvre la présente invention, on utilise une technologie particulière.

On utilise une cuve de fermentation, des moyens d'alimentation de 30 cette cuve en effluents à traiter, en sels nutritifs (urée par exemple), en air et des moyens de soutirage de cette cuve. L'agitation du milieu est assurée par l'introduction d'air à la partie inférieure du fermenteur et, éventuellement, au moyen d'un dispositif d'agitation mécanique supplémentaire. La mousse est brisée soit mécaniquement, soit à l'aide 35 d'un anti-mousse chimique. L'installation comprend des moyens de régulation du pH, de la température, ainsi que des moyens de séparation de la biomasse (centrifugeuse). La biomasse est thermolysée et peut être soit séchée, soit utilisée sous forme humide.

La fermentation aérobiose se déroule de façon non stérile. La cuve est ensemencée à l'aide d'une pré-culture elle-même effectuée sur le même effluent.

La culture peut être faite soit en discontinu, soit en continu.

5 La température optimale de mise en oeuvre se situe entre 32 et 36 degrés Celsius et le pH se situe entre 3 et 4 (il faut souligner que le pH naturel du jus de pressage des drèches est toujours compris entre ces valeurs).

Le contrôle de la température du pH, de l'aération et de la mousse 10 se est assuré pendant toute la durée de la culture.

En discontinu, le traitement dure environ dix heures. En continu, il est possible de travailler à un taux de dilution voisin de 0,25-0,30.

Le traitement en mélange améliore la cinétique de la réaction qui est plus rapide avec la bière plus le jus de pressage des drèches 15 qu'avec la bière seule.

Le mélange permet la dilution, le jus de pressage est un bon support de dilution qui apporte des éléments nutritifs et des substrats biodégradables très concentrés. Parmi les éléments nutritifs apportés par le jus de pressage, on peut citer les oligo-éléments, vitamines et 20 les acides gras.

On a constaté que, dans un mode d'exécution préféré de l'invention, le procédé de fermentation pouvait être mis en oeuvre en traitant les effluents mélangés entre le support étant par exemple constitué par le jus de pressage des drèches.

25 Ce traitement du mélange permet d'améliorer la cinétique de la fermentation lorsqu'on la compare à une fermentation sur du jus de pressage de drèches seul ou sur le produit à dégrader seul, telle que la bière. Ces résultats ressortent du tableau ci-après dans lequel l'on a effectué des essais sur les constantes de la croissance et la biomasse 30 sur des jus de pressage seul, des jus de pressage mélangés à de la bière, ou de la bière seule diluée dans l'eau.

Le traitement en mélange dans le mode d'exécution préféré est également intéressant car il permet une meilleure biodégradation des substances polluantes. Il ressort du tableau ci-après que le jus de 35 pressage seul a été biodégradé de 72 à 76 %, la bière diluée de 73 à 76 % alors que le mélange jus de pressage et bière a été dégradé entre 88 et 91 %. D'une manière générale, le jus de pressage des drèches est donc un bon support pour la biodégradation aérobiose d'effluents riches

- 11 -

en substances polluantes tels que sucres ou alcools.

Cette solution présente des avantages dont les principaux sont les suivants :

- le jus de pressage est un excellent support pour traiter des effluents
- 5 riches en substances polluantes ;
- la biodégradation de ces substances est plus élevée lorsque l'on mélange ces différents effluents ;
- le réacteur présente une plus grande fiabilité car la concentration en levures du réacteur est plus élevée ;
- 10 - il est possible de traiter plusieurs effluents à l'aide d'un même réacteur.

15	:		: jus de pres-	: bière :50 %:
	:	: pressage	: sage 66 % :	eau :50 %:
	:		: bière 34 % :	:
	:		:-----:	:
	:	: 1 : 2 : 1 : 2 : 1 : 2 :		
	:		:-----:	
20	:	: début : sucres	: 9,96: 10,50 :14,01 :14,41 :16,98:14,27 :	
	:	: ferment. : alcool	: :13,35 :12,39 :16,67:15,09 :	
	:	: g/l : total	: 9,96: 10,50 :27,36 :26,80 :33,65:29,36 :	
	:		:-----:	
	:	: fin : sucres	: 2,84: 2,50 : 3,08 : 2,25 : 7,96: 6,05 :	
	:	: ferment. : alcool	: :0,11 : 0,11 : 0,43: 1,81 :	
	:	: g/l : total	: 2,84: 2,50 : 3,19 : 2,36 : 8,39: 7,89 :	
	:	: substrat: biodégrade g/l	: 7,12: 8,00 :24,17 :24,44 :25,29:21,47 :	
	:		:-----:	
25	:	: % biodégradé	: 71,48: 76,19 :88,34 :91,19 :75,66:73,13 :	
	:		:-----:	
	:	: début fermentation:	27,6 :25,0 : 7,00 :10,00 : 0,80: 2,80 :	
	:	:biomasse : fin fermentation	: 32,8 29,50 19,00 :22,20 :10,00:13,50 :	
30	:	: g/l : produits	: 5 : 4,50 :12,00 :12,20 : 9,20:10,70 :	
	:		:-----:	
	:	: constantes: temps de généra-	: 70 :73 :75 :70 :84 :80 :	
	:	: de la		
35	:	: croissance: taux de crois-	: 0,86: 0,82 : 0,80 : 0,86 : 0,71: 0,75 :	
	:	: sance (1/h)		

- 12 -

Bien que l'invention ait été décrite à propos d'une forme de réalisation particulière, il est bien entendu qu'elle n'y est nullement limitée et qu'on peut y apporter diverses modifications de formes, de matériaux et de combinaisons de ces divers éléments sans pour cela s'éloigner du cadre et de l'esprit de l'invention.

Revendications

1. Nouvelle levure du genre *Candida* et de l'espèce *purifis* pour la dégradation des sucres et des alcools telle que déposée à la Collection Nationale des Cultures de micro-organismes tenue par l'Institut PASTEUR sous le n° I-128.
- 5 2. Nouvelle levure du genre *Candida* et de l'espèce *purifis* selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle est appliquée à la dégradation des sucres suivants : Glucose + ; Galactose + ; Maltose + ; Saccharose + ; Ethanol + ; Xylose + ; Théhalose + ; Cellobiose + ; Sorbose + ; Arabinose +.
- 10 3. Procédé pour l'application de la levure selon la revendication 1 aux effluents des brasseries et autres industries des boissons contenant des sucres et/ou des alcools et présentant un caractère polluant élevé, caractérisé par le fait que la température de fermentation est comprise entre 30 et 35 degrés Celsius.
- 15 4. Procédé pour l'application de la levure selon la revendication 1 aux effluents des brasseries et autres industries des boissons contenant des sucres et/ou des alcools et présentant un caractère polluant élevé, caractérisé par le fait que le pH auquel est menée la fermentation est compris entre 3 et 4.
- 20 5. Procédé pour l'application de la levure selon la revendication 1 aux effluents des brasseries et autres industries des boissons contenant des sucres et/ou des alcools et présentant un caractère polluant élevé, caractérisé par le fait que l'on ajoute à l'effluent une source d'azote telle que de l'urée.
- 25 6. Procédé pour l'application de la levure selon la revendication 1 aux effluents des brasseries et autres industries des boissons contenant des sucres et/ou des alcools et présentant un caractère polluant élevé, caractérisé par le fait que ces effluents sont traités soit séparés, soit mélangés entre eux, le support étant constitué par le jus de pressage des drêches.
- 30 7. Procédé pour l'application de la levure selon la revendication 1 aux effluents des brasseries et autres industries des boissons contenant des sucres et/ou des alcools et présentant un caractère polluant élevé, caractérisé par le fait que l'on utilise un procédé de fermentation aérobie, non stérile qui nécessite un appareillage simple et classique.

PL UNIQUE

2498625

FIG.1

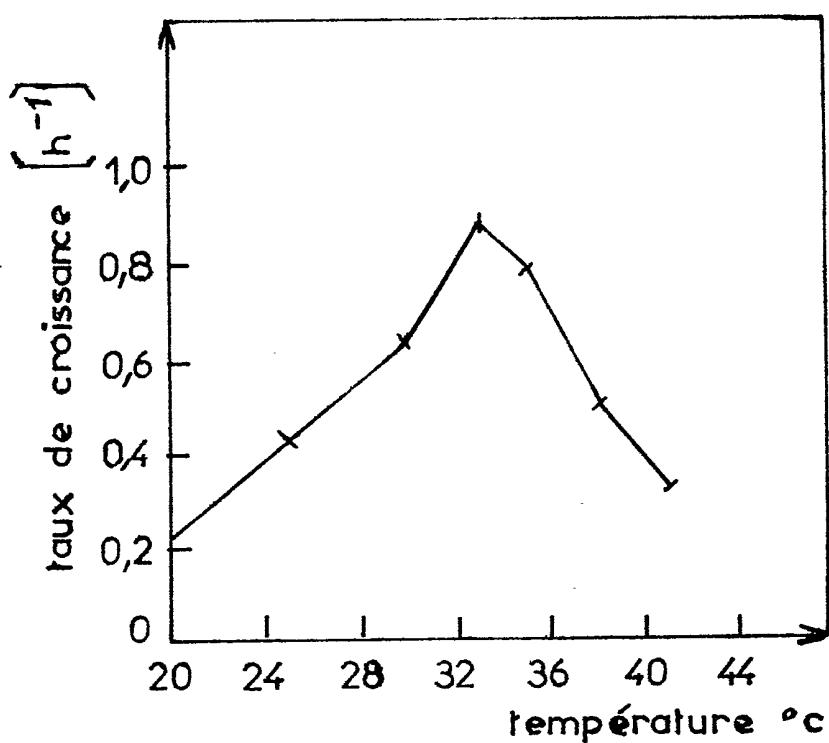


FIG.2

