
Caractéristiques chimiques et technologiques des vinasses de distilleries traitées par *Aspergillus niger*

Marie Watson^{1,2}, Laurent Corcodel³, Laurent Dufossé², Thomas Petit^{1,2}

¹ IUT de La Réunion
Département Génie Biologique
40 av de soweto BP 373 97455 Saint-Pierre Cedex
Contact : thomas.petit@univ-reunion.fr

² Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Sciences des Aliments
Faculté des Sciences et technologies
15 av René Cassin BP 7151 97715 Saint Denis Messag Cedex 9

³ CERF Process Sucrier BP 315 97494 Ste Clotilde Cedex

RESUME :

En raison de l'augmentation de l'activité industrielle, notre environnement se trouve fortement affecté par ses déchets, et plus particulièrement par les eaux usées. Sur l'île de La Réunion, les eaux usées des distilleries, aussi appelées « vinasses » posent de sérieux problèmes environnementaux. En effet, à cause de leurs fortes teneurs en cendre, de leurs pH faible, de leurs fortes densités optiques et de leurs fortes DCO et DBO, les vinasses sont très difficiles à dépolluer. La production d'un litre d'alcool implique la coproduction de 10 L de vinasse. Ce sont donc 230 000 tonnes de vinasse qu'il faut désormais traiter par an sur l'île de La Réunion.

L'objectif de ce travail est d'étudier un procédé de valorisation aérobie de la vinasse afin d'en optimiser le traitement et de la rentabiliser sous forme de Biomasse, de SCP ou d'Acides Organiques par exemple. Dans cette étude, nous avons choisi de travailler avec une souche modèle de champignon filamenteux, *Aspergillus niger*, très utilisée en industrie et que nous avons cultivée sur un milieu de culture à base de vinasse. Cette dernière estensemencée sans ajouts de nutriments. Une production de 50 g.L⁻¹ est obtenue au bout de 9 jours de fermentation et une réduction de 64 % de la DCO a été atteinte. D'autres analyses sont menées notamment sur les acides organiques pour trouver d'autres pistes de valorisation.

MOTS CLES : vinasse, *Aspergillus niger*, Bioremédiation, Bioproduction, DCO

1. Introduction

A La Réunion, 3 distilleries se partagent la mélasse de canne à sucre pour produire du rhum. Après distillation une grande quantité d'effluent est produite. La production de vinasse annuelle est de l'ordre de 200 000 Tonnes par an. Pour 1 litre d'alcool produit, 10 litres de vinasse sont générés. Traditionnellement, ces effluents sont utilisés pour faire de l'épandage. En effet, la législation ne permet plus la dissémination de tels effluents dans l'environnement, car malgré sont fort potentiel de fertilisation, cet effluent représente une forte charge polluante pour les sous sols et les eaux des nappes phréatiques. En raison notamment de sa forte opacité bloquant les rayons lumineux et ne permettant plus la photosynthèse, cet effluent entraîne par la même occasion une eutrophisation des cours d'eau. Cette couleur est liée à la présence de mélanoidines en forte concentration dans l'effluent. La pollution repose également sur sa forte Demande Chimique en Oxygène (DCO). Au niveau des sols, l'acidité de la vinasse (pH 4,6 en moyenne) déséquilibre l'alcalinité favorable aux cultures. Cependant c'est un déchet difficile à traiter. Actuellement il est la plupart du temps stocké dans des lagunes mais cela entraîne des problèmes liés à sa stagnation comme l'augmentation d'insectes. Par ailleurs, ce stockage ne règle pas le problème de la forte coloration et haute densité optique de l'effluent.

Un certain nombre de travaux ont montré que certains effluents étaient une matière première potentielle pour des utilisations industrielles telles que la production de bioéthanol (Wilkie *et coll.* 2000), la production de

Single Cell Proteins (SCP) (Coulibaly *et coll.* 2003), ou la production de métabolites (Acides organiques). Les travaux présentés dans cet article avaient pour objectifs dans un premier temps d'établir un comparatif des caractéristiques physico-chimiques de la vinasse de La Réunion avec les valeurs de la littérature. Dans un deuxième temps, les caractéristiques physiologiques de la croissance du champignon *Aspergillus niger* en aérobie sur un milieu contenant de la vinasse ont été mesurées et les cinétiques de consommation et de production des sucres contenus dans le milieu, mais également de certains acides organiques sont présentés.

2. Matériels et méthodes

2.1. Souches fongiques et milieux de culture utilisés

Les souches utilisées lors de cette étude sont *Aspergillus niger* MUCL 28820. Elles sont propagées deux fois avant chaque utilisation sur gélose PDA (Potatoes Dextrose Agar, BD). L'incubation est réalisée pendant 72 h à 27 °C. Les milieux de culture utilisés est le milieu PDA pour la culture des champignons en milieu gélosé. Pour les cultures en milieu liquide, un bouillon Malt est utilisé (3 % d'extrait de Malt, Merck, 2% de BactoPeptone (BD), et 1% d'extrait autolytique de levure (Biokar diagnostique). La vinasse est issue de l'une des distilleries de La Réunion. Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 15 min.

2.2. Fermentation

20 mL de vinasse sontensemencés dans des Erlenmeyers de 100 mL avec une suspension fongique d'*Aspergillus niger* à la concentration de 10^5 spores.mL⁻¹. Les Erlens sont agité à 95 tr.min⁻¹. Chaque jour un erlenmeyer est récolté et la vinasse fermentée est ensuite filtrée une première fois sur Büchner avec une pompe Sartorius 16612 sur un filtre Whatman n°1 (porosité de 11 µm de diamètre). Trois aliquotes de 1,5 mL du filtrat obtenu sont échantillonnées et conservés à -20 °C en attendant d'être analysés par HPLC, HPIC ou pour des analyses physico-chimiques. Le reste du filtrat est de nouveau filtré sur 2 filtres Whatman n°1. Ces deux filtres sont placés à l'étuve à 100°C pendant 24 h. Tous les filtres sont préalablement mis à l'étuve à 100 °C pendant 3 h, puis placés pendant 1 h dans un dessiccateur avant d'être pesés.

2.3. Analyse HPIC

Les échantillons de vinasses sont dilués avant analyses. Des solutions de 5 g.L⁻¹ de vinasse sont préparées pour doser les acides organiques, et de 0,1 g.L⁻¹ pour doser les sucres et les alcools. L'analyse des acides organiques est réalisée par un conductimètre et une colonne IonPack AS11HC, et les sucres sont analysés par ampérométrie pulsée et une colonne CarboPack PA1 avec une HPIC de Dionex.

2.4. Analyse physico-chimique

DCO : Analyse réalisée sur spectrophotomètre Hach Lange DR 2800 avec des kits adaptés (Lamo and Menezes 1978).

Analyse élémentaire : Analyse effectuée par le service d'analyse du CNRS pour le Phosphore, l'Azote, le Carbone, l'Hydrogène et le Soufre.

Protéines : Préparation des extraits de protéines par broyage après congélation. Extraction des protéines par centrifugation dans un tampon Tris et dosage par la méthode de Bradford.

Cendres : Mesure des cendres par incinération de 5 g de vinasse à 530 °C pendant 3 heures.

Solides totaux : Analyse réalisée par évaporation pendant 24h de 5g de vinasse dans une étuve à 100 °C.

Solides en suspension : Obtenue par filtration de 50 mL de vinasse sur filtre Whatman n°1 séché à l'étuve pendant 24h à 100 °C.

Matière organique : Correspond aux solides totaux moins les cendres.

3. Résultats

La première étape du travail a consisté à mesurer les paramètres physicochimiques de la vinasse afin de déterminer sa charge polluante. Les analyses ont également été réalisées avant fermentation et après 9 jours de fermentation par le champignon *Aspergillus niger* afin de déterminer l'efficacité de dépollution du champignon. Des valeurs trouvées dans la littérature sur les vinasses de cannes à sucres sont également présentés à titre de comparaison. Les résultats sont présentés dans le tableau 1. Nos résultats montrent que la fermentation par *A. niger* provoque une diminution de 64 % de la DCO et une diminution de 54,5 % de DO à 270 nm de la vinasse. Le ratio carbone sur azote reste inchangé indiquant que le potentiel fertilisant de la vinasse varie peu malgré la fermentation.

Tableau 1. Analyse physico-chimique de vinasses de distillerie.

échantillon	Littérature	Vinasse de La Réunion		Vinasse 1 fermentée	Références bibliographiques
		Vinasse 1	Vinasse 2		
pH	4,2 - 5,9	4,6	4,7	5,4	(Rosalem et al. 1985)
DCO (g O ₂ .L ⁻¹)	32 – 90	146,5	62,3	53,2	(De Lamo & De Menzes 1998)
Solides totaux (g.L ⁻¹)	4,4 – 106	188	-	201	(Azzam et Heikel 1989; Cabib et al. 1983)
Solides solubles (g.L ⁻¹)	39 - 56,9	-	-	-	
Solides en suspensions (g.L ⁻¹)	1,1 - 10,8	12,9	1,0	14,9	(De Lamo & De Menzes 1998)
Carbone/Azote (C/N)	7,9	11,8	-	11,3	(Parnaudeau et al. 2007)
Cendres (g.L ⁻¹)	10,7 - 28,9	41,4	24,3	43,2	(Sheehan G.J. & Greenfield P.F. 1979)
DO _{270 nm}	-	310	-	145	

Les cellules ensemencées dans un milieu à base de vinasse sont capables de se développer sans ajout de nutriments supplémentaires (Fig. 1). La croissance obtenue est très proche de celle obtenue sur milieu malt dans les mêmes conditions. Une production importante de biomasse (jusqu'à 75 g.L⁻¹) a été observée après une phase de latence de 50 h. La phase exponentielle de croissance dure 96 heures pour commencer avant d'entrer en phase stationnaire. La croissance est caractérisée par un temps de génération de l'ordre de 27 h et une vitesse spécifique de croissance de l'ordre de 0,026 h⁻¹ comparée aux 17 h de temps de génération et à une vitesse spécifique de croissance de 0,017 h⁻¹ obtenues sur le témoin Malt.

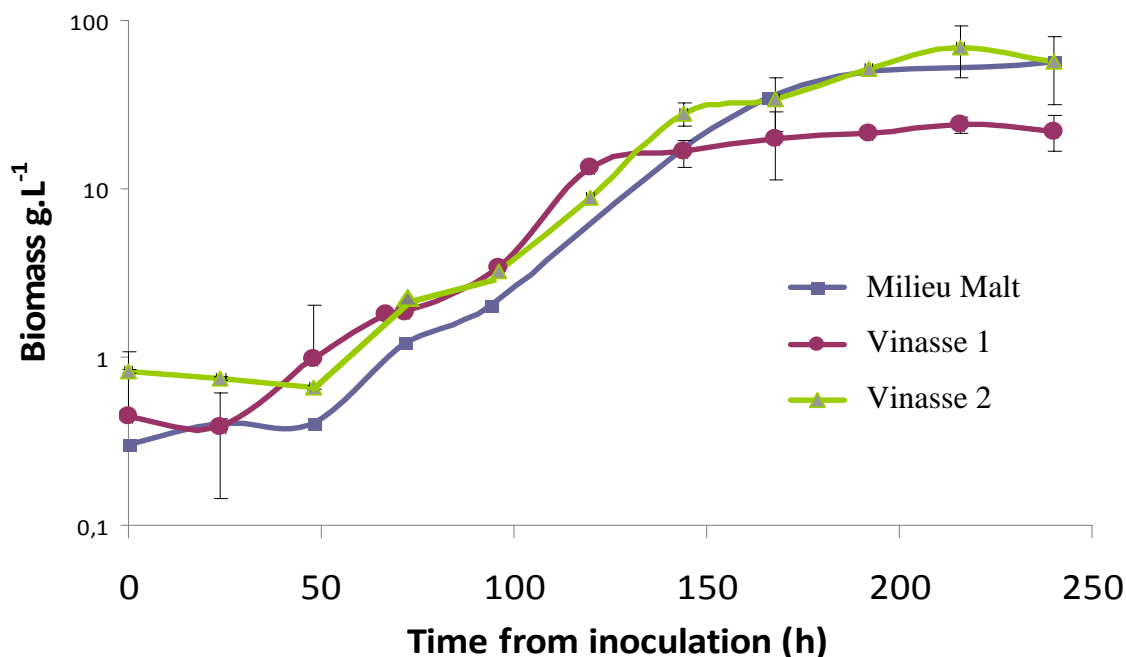


Figure 1. Cinétique de croissance d'*Aspergillus niger* sur des milieux à base de vinasses de différentes origines (vinasse 1 et 2) et sur milieu Malt pendant 9 jours.

Les analyses chromatographiques montrent que le champignon utilise les sucres restant dans la vinasse, à savoir le glucose, le fructose et le saccharose ainsi que certains polyols tels que le mannitol (Fig. 2). Ces analyses montrent également qu'*Aspergillus niger* produit un certain nombre de composés comme des acides organiques, notamment le citrate (résultats non présentés).

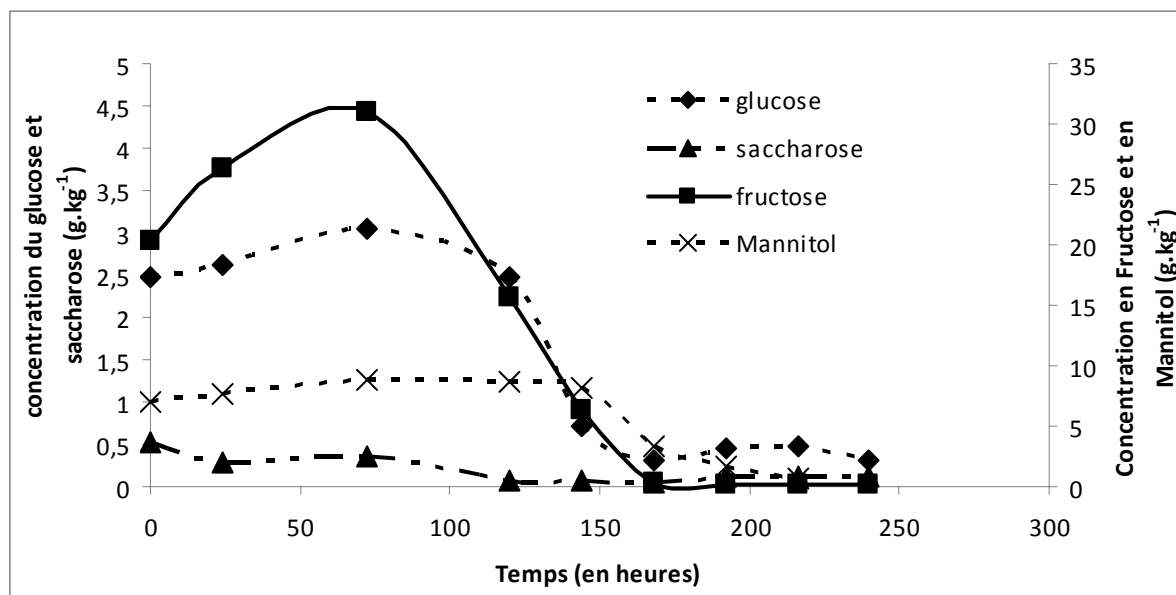


Figure 2 : Cinétique de consommation des sucres et polyols au cours de la croissance d'*A. niger* sur vinasse pendant 9 jours. (▲) Saccharose, (◆) Glucose, (■) Fructose, (X) Mannitol.

4. Conclusions

L'analyse des effluents de distilleries de La Réunion a montré que la vinasse avait un fort pouvoir polluant. L'analyse des paramètres tels que la demande chimique en oxygène ou des matières en suspension de ces vinasses confirme les valeurs présentées dans la littérature. Cette étude a montré également que la vinasse pouvaient être un milieu de croissance efficace pour *Aspergillus niger*. La croissance est liée à la forte teneur en sucres et ressources azotées des vinasses, suffisant pour obtenir une production de biomasse de l'ordre de 75 g.L⁻¹ dans le meilleur des cas. L'utilisation d'*Aspergillus niger* sur les vinasses offre un potentiel de bioremédiation non négligeable avec des diminutions pouvant aller jusqu'à 54 % de la DCO et une diminution de l'ordre de 60 % de l'absorbance. Les vinasses présentent également un potentiel intéressant pour la bio-production de biomasse et de ses dérivés (Acides organiques, Protéines cellulaires, etc...). Un certain nombre de molécules partiellement caractérisées ont également été détectées telles que des acides organiques.

Le procédé biotechnologique de production de biomasse décrit dans cette étude reste encore à optimiser, mais il offre un certain nombre de perspectives. L'adaptation de ces manipulations à de nouvelles souches semble prometteuse, avec la possibilité de réaliser des cultures mixtes pour optimiser l'effet dépolluant et de bio-production.

5. Références bibliographiques

- Araújo, N. Q., A. S. Visconti, et al. (1976). "MS Produção de Biomassa Fúngica de Vinhoto." Brasil Açucareiro **88**(6).
- Azzam, A. M. and Y. A. Heikel (1989). "Aerobic treatment of molasses distillery waste water and biomass production." Journal of Environmental Science and Health, Part A: Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control **24**(8): 967-978.
- Beltran, F. J., J. F. Garcia-Araya, et al. (1999). "Wine distillery wastewater degradation. 2. Improvement of aerobic biodegradation by means of an integrated chemical (Ozone)-biological treatment." J Agric Food Chem **47**(9): 3919-24.
- Cabib, G., H. J. Silva, et al. (1983). "The use of sugar cane stillage for single cell protein production." Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology **33**(1).
- Coulibaly, L., G. Gourene, et al. (2003). "Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters." African Journal of Biotechnology **2**: 12.
- De Gonzalez, I. M. and N. F. De Murphy (1979). "Potential use of rum distillery slops as animal feed supplement. II." Nitrogen content of mycelial growth in slops. J Agric Univ PR **63**: 330-335.
- F. J. Fitzgibbon, P. N. D. S. R. M. (1995). "Biological treatment of distillery waste for pollution-remediation." Journal of Basic Microbiology **35**(5): 293-301.
- FitzGibbon, F., D. Singh, et al. (1998). "The effect of phenolic acids and molasses spent wash concentration on distillery wastewater remediation by fungi." Process Biochemistry **33**(8): 799-803.
- Lamo, P. R. and T. J. B. Menezes (1978). "Bioconversao da vinhaca para a producao de biomassa fungica." Coletanea do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Brasil)..(1978). **9**.
- Mohana, S., B. K. Acharya, et al. (2009). "Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications." Journal of Hazardous Materials **163**(1): 12-25.
- Nudel, B. C., R. S. Waehner, et al. (1987). "The use of single and mixed cultures for aerobic treatment of cane sugar stillage and SCP production." Biological wastes **22**(1): 67-73.
- Pant, D. and A. Adholeya (2007). "Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review." Bioresour Technol **98**(12): 2321-34.
- Rolz, C., S. De Cabrera, et al. (1975). "The growth of filamentous fungi on rum distilling slops." Ann Technol Agric **24**(3/4): 445-51.
- Rosalem, P. L., S. M. Tauk, et al. (1985). "Efeito da temperatura, pH, tempo de cultivo e nutrientes no crescimento de fungos imperfeitos em vinhaca." Rev Microbiol Sao Paulo **16**: 299-304.
- Sheehan, G. J. and P. F. Greenfield (1980). "Utilisation, Treatment and Disposal of Distillery Wastewater." Water Research **14**(3).
- Shojaosadati, S. A., R. Khalilzadch, et al. (1999). "Bioconversion of molasses stillage to protein as an economic treatment of this effluent." Resources, conservation and recycling **27**(1-2): 125-138.
- Wilkie, A., K. Riedesel, et al. (2000). "Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks." Biomass and Bioenergy **19**: 63-102.
- Yürekli, F., O. Yesilada, et al. (1999). "Plant growth hormone production from olive oil mill and alcohol factory wastewaters by white rot fungi." World Journal of Microbiology and Biotechnology **15**(4): 503-505.