

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**Adaptation et évaluation d'un processus de design appliqué aux
bioprocédés**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en ingénierie

en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès science appliquées

PAR

© **ALEXANDRE BOUDREAU**

Juillet 2017

Composition du jury :

Jean Brousseau, président du jury, Université du Québec à Rimouski

Jean-Sébastien Deschênes, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski

Réjean Tremblay, évaluateur interne, Université du Québec à Rimouski

Ismail Fliss, évaluateur externe, Université Laval

Dépôt initial le 13 septembre 2016

Dépôt final le [date mois année]

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

À mon grand-père, sans ses efforts, tous ces travaux n'auraient pu être possibles.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier dans un premier temps mon directeur Jean-Sébastien Deschênes pour son temps et son dévouement à la réalisation de ce projet. Son expertise et sa passion à transmettre son savoir ont tracé les grandes orientations de ces travaux. Je voudrais également remercier Madame Michèle Tessier pour son apport et sa grande disponibilité dans la réalisation de ses travaux.

Je ne pourrais passer sous silence les contributions financières du CRSNG, du MAPAQ et du RAQ qui ont rendu la réalisation de ce projet possible.

Enfin, un merci à tout spécial à Catherine et Mathias pour votre compréhension.

RÉSUMÉ

Ces travaux présentent une nouvelle approche de design adaptée à la conception de systèmes reliés aux bioprocédés ou l'emphase est mise sur les technologies disponibles. Cette approche a été évaluée sur deux projets de conception réalisés dans ces travaux. Le premier avait pour objectif de concevoir une aire de production permettant la culture de microalgues en mixotrophie en conditions industrielles. L'approche de design a permis d'obtenir une aire de production adaptée à la mixotrophie et un protocole de culture permettant de minimiser la contamination bactérienne.

Le deuxième projet permet consistait à concevoir un système capable d'appliquer un bio-ingrédient sur une chaîne de production de saumon fumé afin d'augmenter le temps de conservation de cet aliment. La méthode de design a permis de fournir un prototype d'aspersion adapté au besoin du client qui permet d'asperger différents volumes de bio-ingrédient à diverses concentrations assurant une meilleure conservation du saumon fumé.

Les deux projets ont donc permis de démontrer que l'approche de design est parfaitement adaptée aux projets de conception reliés aux applications biologiques

Mots clés : Bioprocédé, microalgues, approche de design, contrôle bactérien.

ABSTRACT

This work presents a new design method for bioprocess systems where the available technologies play a major role. This new method will be evaluated on two bioprocess designs projects. The first one has for principal objective to design a production area for microalgae in mixotrophic mode in industrial conditions. This new design method has resulted in a production area adapted to mixotrophic and a way to grow microalgae with a low bacterial contamination.

The second project applies the new design method to develop a spraying system which will be able to distribute a bioingredient on a smoked salmon production line. This design method has delivered a prototype well adapted to the client's needs.

These two projects have been successfully realized and the variation of this new design method have been demonstrated.

Keywords : Bioprocess, microalgae, design method, bacterial control.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	IX
RÉSUMÉ.....	XI
ABSTRACT	XIII
TABLE DES MATIÈRES	XV
Liste des tableaux	XIX
Liste des figures.....	XX
Liste des abréviations, des sigles et des acronymes	XXI
Liste des symboles	XXIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 OBJECTIF ET STRUCTURE DE LA THESE	4
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	7
2.1 PROCESSUS DE CONCEPTION DE SYSTEMES	7
2.1.1 PRESENTATION DE LA METHODE DE BASE	7
2.1.2 PRODUCTION A UN SEUL EXEMPLAIRE.....	9
2.1.3 DISPONIBILITE DES TECHNOLOGIES, UN ENJEU MAJEUR DU CHOIX DE CONCEPT POUR LES BIOPROCEDES.....	9
2.1.4 RETOUR SUR LES BESOINS ET NON LES SPECIFICATIONS.....	12
2.1.5 ADAPTATION DU PROCESSUS DE DESIGN.....	14
2.1.6 APPLICATION DU PROCESSUS DE DESIGN MODIFIE.....	16
2.2 SITUATION INITIALE DE LA CULTURE DE MICROALGUES	17
2.2.1 CARACTERISTIQUES DU BIOPROCEDE	17
2.2.2 NIVEAU D'AVANCEMENT DES SYSTEMES DE PRODUCTION.....	19

2.3	PROBLEMATIQUE PRINCIPALE DE LA MISE A L'ECHELLE DES SYSTEMES DE PRODUCTION DE MICROALGUES.....	21
2.4	HYPOTHESES	22
2.4.1	REJET DE L'HETEROTROPHIE	22
2.4.2	LA MIXOTROPHIE PRECONISEE.....	23
2.4.3	SELECTION DE L'ESPECE.....	23
2.4.4	DEFINITION DU MILIEU DE CULTURE	24
2.4.5	SYSTEME DE PRODUCTION ET PRETRAITEMENT DE L'EAU UTILISE.....	24
2.5	METHODOLOGIE ET OBJECTIFS INTERMEDIAIRES.....	24
CHAPITRE 3 LA MIXOTROPHIE EN CONDITIONS INDUSTRIELLES.....		26
3.1	POINTS DE DEPART	26
3.2	DISTRIBUTION HYDRAULIQUE ET METHODE DE NETTOYAGE	28
3.3	OXYDATION DU MILIEU ET NEUTRALISATION	30
3.4	INSTRUMENTATION CENTRALISEE ET STANDARDISATION	32
3.5	PROTOCOLES DE MISE EN CULTURE ET RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	34
3.6	RETOUR SUR LES SPECIFICATIONS CIBLES	35
3.6.1	NETTOYAGE DU SYSTEME EN MODE AUTOMATIQUE	35
3.6.2	CONNEXION PERMANENTE DES SYSTEMES DE PRODUCTION.....	35
3.6.3	TEMPS DE NETTOYAGE RELATIVEMENT COURT.....	36
3.6.4	PRECISION DU SYSTEME DE DISTRIBUTION DE NUTRIMENTS ET D'ENSEMENCEMENT	36
3.6.5	NETTOYAGE FACILE DU SYSTEME DE DISTRIBUTION DE NUTRIMENTS ET D'ENSEMENCEMENT	36
3.6.6	RAPIDITE DU PROTOCOLE D'ENSEMENCEMENT	36
3.6.7	ÉCHANTILLONNAGE DES SYSTEMES DE PRODUCTION.....	36
3.6.8	CONTROLE DES BIOPROCEDES	37
3.7	RETOUR SUR LES BESOINS DU LABORATOIRE.....	37

**CHAPITRE 4 CONCEPTION D'UN SYSTÈME D'APPLICATION DE BIO-
INGRÉDIENT EN MILIEU INDUSTRIEL39**

4.1 CONTEXTE DE REALISATION39

4.2 DEFINITION DU MANDAT POUR CE TRAVAIL DE RECHERCHE.....41

4.3 DEFINITION DES BESOINS ET DES SPECIFICATIONS.....41

4.4 CHOIX D'UNE TECHNOLOGIE, CONCEPTION ET ESSAIS DE RAFFINEMENT..43

4.4.1 HAUTEUR OPTIMALE DE LA BUSE44

4.4.2 CONCENTRATION DU BIO-INGREDIENT VERSUS CARACTERISTIQUES

D'ASPERSION 45

4.4.3 MODE DE FONCTIONNEMENT PAR INTERMITTENCE46

4.4.4 CARACTERISTIQUES D'ASPERSION EN MODE CONTINU.....49

4.4.5 ÉVALUER LES DERNIERES MESURES DE CONCEPTION51

4.4.6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS SUITE AUX ESSAIS.....52

4.5 CONCEPT FINAL.....53

4.6 ESSAIS DE VALIDATION54

4.7 RETOUR SUR LES SPECIFICATIONS.....56

4.8 VALIDATION DES BESOINS ET SUITES AU PROJET57

**CHAPITRE 5 PROTOCOLE DE MISE EN CULTURE EN MIXOTROPHIE
ET DISPONIBILITE DES NUTRIMENTS DANS LE MILIEU
EXTRACELLULAIRE POUR CONTROLER LA CROISSANCE BACTERIENNE**

.....59

5.1 PRESENTATION DE L'ARTICLE59

1 INTRODUCTION60

2 MATERIALS AND METHODS63

2.1 CULTURE MAINTENANCE AND INOCULUM PREPARATION63

2.2 PILOT-SCALE PHOTOBIOREACTOR SYSTEM.....63

2.3 BACTERIAL COUNTS AND QUANTIFICATION64

2.4	CHEMICAL STERILIZATION USING HYDROGEN PEROXIDE	64
2.5	HYDROGEN PEROXIDE NEUTRALIZATION.....	65
2.6	AUTOTROPHIC EXPERIMENT.....	65
2.7	MIXOTROPHIC EXPERIMENTS.....	66
3	RESULTS AND DISCUSSION	66
3.1	STERILIZATION USING HYDROGEN PEROXIDE	66
3.2	HYDROGEN PEROXIDE NEUTRALIZATION AND PHOTOBIOREACTOR PREPARATION	67
3.3	AUTOTROPHIC EXPERIMENT.....	67
3.4	MIXOTROPHIC EXPERIMENT # 1	69
3.5	MIXOTROPHIC EXPERIMENT # 2	71
3.6	ION AND GLUCOSE MEASUREMENTS IN MIXOTROPHIC EXPERIMENTS	72
4	CONCLUSIONS	74
5	ACKNOWLEDGEMENTS	75
6	REFERENCES (MAX. 35 FOR ORIGINAL PAPER).....	75
5.2	CONCLUSION DES RESULTATS EN LIEN AVEC LA REINGENIERIE DU LABORATOIRE.....	78
	CHAPITRE 6 CONCLUSION GÉNÉRALE	79
	ANNEXE I.....	83
	ANNEXE II.....	113
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	122

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des besoins pour la culture de microalgues	26
Tableau 2 : Liste des spécifications pour la culture de microalgues	27
Tableau 3 : Liste des besoins pour l'équipement d'aspersion	41
Tableau 4 : Liste des spécifications pour l'aspersion	42
Tableau 5 : Quantité aspergée (mL) en fonction de la concentration du liquide (g/L).....	46
Tableau 6 : Moyenne (μ) et écart-type (σ) des échantillons recueillis (mL / tranche).....	48
Tableau 7 : Moyenne (μ) du volume recueilli (mL) et leur écart-type (σ).....	50
Tableau 8 : Évaluation des besoins pour l'équipement d'aspersion.....	58

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Extrait de la phase de développement de concepts	10
Figure 2 : Processus de design modifié	11
Figure 3 : Évaluation du design selon Ulrich	13
Figure 4 : Processus de développement de produit adapté à ce travail de recherche	15
Figure 5 : Schématisation du système d'alimentation et de récolte.....	29
Figure 6 : Système de production en opération	32
Figure 7 : Système d'instrumentation et de contrôle	33
Figure 8 : Unités de production instrumentées	34
Figure 9 : Schéma d'aspersion par intermittence.....	46
Figure 10 : Système d'aspersion lors des essais de validation	53
Figure 11 : Croissance de <i>L monocytogenes</i> LSD530 en présence (rouge) ou en absence (bleu) du bio-ingrédient à base de <i>C divergence</i> M35 dans les lots de saumon stockés pendant 21 jours à 4 °C.....	55
Figure 12 : Croissance de <i>L monocytogenes</i> LSD530 en présence (rouge) ou en absence (bleu) du bio-ingrédient à base de <i>C divergence</i> M35 dans les lots de saumon stockés pendant 7 jours à -20 °C puis 14 jours 4 °C	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

CNESST	Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail
CRSNG	Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada
FDA	Food and Drug Administration
MAPAQ	Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation du Québec
PMPAC	Les produits marins prêts à consommer
RAQ	Réseau Aquaculture Québec

LISTE DES SYMBOLES

g	Gramme
kDa	Kilodalton
L	Litre
mL	Millilitre

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les changements climatiques sont au cœur de nombreux débats tant environnementaux qu'économiques. Pendant qu'il est possible d'observer des hausses de température moyenne sur plusieurs régions du globe, un nombre grandissant de tempêtes tropicales et d'ouragans touchent les zones côtières. Le Midwest américain a connu à l'été 2012 des vagues de chaleur record qui ont fait chuter les récoltes du maïs augmentant ainsi son prix à la bourse de 25% (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ECONOMIC RESEARCH SERVICE, 2012).

Plusieurs facteurs peuvent être pointés du doigt pour expliquer ces changements climatiques. L'un des principaux est sans l'ombre d'un doute la consommation massive d'énergie fossile. À l'heure actuelle, cette source d'énergie répond à près de 80% de la demande mondiale d'énergie (CHEN, et al., 2010) et cette demande est loin de se stabiliser. Selon le United States Energy Information Administration la demande mondiale d'énergie devrait augmenter de plus de 30% d'ici 2030 principalement à cause de l'émergence de certains pays comme la Chine et l'Inde (U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION, 2012).

C'est devant l'ampleur de ces problèmes et avec l'urgence d'agir que de nombreuses sociétés avec l'aide de plusieurs pays industrialisés ont entamé des recherches pour trouver une alternative à cette impasse. L'une des solutions mises de l'avant a été de produire un biocarburant à partir de fibre végétale pour obtenir un combustible avec un cycle de carbone neutre.

Les biocarburants de première génération, principalement produits à partir des huiles de colza, de soya, de palmier et de tournesol, possèdent plusieurs propriétés intéressantes :

performance énergétique très intéressante, biodégradable, cycle de carbone théoriquement fermé, etc. (AHMAD, et al., 2010).

Cependant, étant donné que ce carburant est produit à partir d'huiles comestibles, une production à grande échelle affecterait le marché alimentaire mondial. Ainsi le prix de ses produits de consommation deviendrait inaccessible pour certaines régions du monde moins développées, pouvant ainsi créer une crise alimentaire. De plus, pour subvenir aux besoins énergétiques du Royaume-Uni, correspondant à près de 2 500 milliards de litres de biodiésel par année, 17,5 Mha de culture de colza seraient nécessaires ; ce qui représente en superficie de culture près de la moitié du territoire britannique (AMARO, et al., 2010).

Afin de diminuer l'impact sur le marché alimentaire mondial, un biocarburant de deuxième génération a été créé à partir de fibre végétale non comestible. Les principales sources de production pour ce biocarburant sont le jatropha, la mahua, l'huile de jojoba et de saumon, des graines de tabac et des mangues de mer. En plus de ne pas affecter les marchés alimentaires, ces nouvelles sources de carburants ont besoin en moyenne de moins de terres agricoles et peuvent être cultivées sur des terres en friche. Le rendement à l'hectare de cette source d'énergie n'est cependant pas plus efficace que son prédécesseur pour assurer une relève aux énergies fossiles (AHMAD, et al., 2010).

Une troisième génération de biocarburants, produits cette fois-ci à partir de microalgues, semble pouvoir remédier à ce problème de productivité. Certaines espèces de microalgues ont la possibilité d'accumuler un contenu lipidique pouvant aller jusqu'à 70% de leur poids sec tout en présentant un taux de croissance jusqu'à vingt-cinq fois plus élevé que les plantes terrestres. En termes de kilogrammes de biodiésel produits à l'hectare par année, le biocarburant microalgal peut offrir une productivité jusqu'à 100 fois supérieure à certaines cultures comme le canola ou le tournesol (MATA, et al., 2010). Bien entendu, cette productivité ne peut être observée que dans des conditions optimales de culture et nécessite la conception de systèmes à très large échelle hautement spécialisés.

C'est ainsi que plusieurs recherches ont été lancées pour optimiser la production de microalgues. Une des premières tentatives a été de créer des étangs artificiels où la culture pouvait s'opérer à l'extérieur utilisant la lumière du soleil et l'air ambiant pour fournir les éléments de base au développement des algues. Bien que facile à construire et à opérer, cette technique de production possède plusieurs désavantages. Premièrement, le fait que ce système soit ouvert à son environnement facilite la contamination du milieu de culture par des agents pathogènes. Certes, certaines techniques peuvent être utilisées pour diminuer cet effet comme maintenir un pH relativement élevé ou maintenir une salinité très forte, mais ces conditions de culture ne sont pas favorables à toutes les espèces de microalgues. Deuxièmement, étant donné la très grande superficie utilisée en étang ouvert, il est assez difficile d'obtenir des conditions de culture uniformes. Bien entendu, un brassage mécanique peut diminuer ce phénomène, mais certaines conditions, notamment la température, restent très difficiles à réguler. Enfin, l'un des plus gros désavantages d'une technique de production microalgale en étang ouvert est que la lumière du soleil ne peut pénétrer plus de quelques centimètres à l'intérieur d'une culture relativement dense. L'ensemble de la culture ne peut donc jouir d'un apport énergétique suffisant pour assurer une croissance optimale (SCOTT, et al., 2010).

Tous les désavantages énumérés ci-haut ont une influence sur la productivité totale des unités de production de microalgues. Ainsi, le facteur clé dans l'élaboration d'un biocarburant à partir de ce type de culture, soit le haut rendement de biodiésel produit à l'hectare promis par les premiers essais pilotes, n'est pas optimisé avec une technique de culture en étang ouvert (SCOTT, et al., 2010).

L'alternative pourrait être de créer un environnement de culture artificiel où l'on retrouve les mêmes conditions de cultures que les essais en laboratoire, mais à plus grande échelle. C'est ainsi que des photobioréacteurs ont été adaptés à ces types de cultures. Plusieurs systèmes ont été conçus afin de reproduire les conditions d'éclairage, les échanges gazeux et les apports en nutriments optimaux pour favoriser une production optimale de microalgues.

L'objectif convoité était de passer de quelques centaines de mL de culture à quelques litres, voir quelques centaines de litres. Plusieurs études ont démontré la faisabilité technique d'une telle mise à l'échelle (RAWAT, et al., 2012).

Le problème avec ces systèmes est que lorsqu'une phase préliminaire d'exploitation à grand volume est envisagée, et que ces systèmes doivent être mis à l'échelle d'un facteur 100 voire 1000, plusieurs concepts ne sont plus économiquement viables pour la production de biodiésel. Soit le coût de fabrication et d'implantation est trop dispendieux ou encore le coût d'opération est trop élevé pour assurer une rentabilité du procédé.

Ainsi les industriels font face à un problème de taille : les méthodes et les systèmes de production ne sont pas adaptés aux besoins et aux contraintes du marché.

Ce phénomène n'est pas unique à la production de biodiésel, plusieurs systèmes de production de bioproduits ou d'utilisation de molécules à valeur ajoutée extraites de bioprocédés ne sont pas adaptés à une réalité industrielle. De plus en plus de recherches démontrent des applications commercialement intéressantes à partir de ces molécules, mais leur transfert d'une échelle laboratoire à une échelle industrielle n'est pas toujours simple.

1.1 OBJECTIF ET STRUCTURE DU MEMOIRE

L'objectif principal de ce présent travail est de débiter des travaux de recherche pour répondre à quelques problématiques entourant ces mises à l'échelle. Pour ce faire, un processus de design a été adapté pour tenir compte des enjeux et du contexte d'évolution des bioproduits dans les phases de conception des systèmes. Ce nouveau processus sera appliqué sur la conception et la réalisation d'un système permettant la production en milieu industriel de microalgues en vue d'une production de biodiésel ou autres produits à valeurs ajoutées nécessitant un haut rendement de productivité. Afin de valider la robustesse de ce processus de design, ce dernier sera également appliqué sur la conception d'un système pour un

deuxième bioprocédé consistant à appliquer un bio-ingrédient sur une chaîne de production de saumon fumé afin d'augmenter sa conservation.

La subdivision des chapitres est réalisée de la façon suivante. Le chapitre II – Revue littérature présente les résultats des recherches littéraires réalisées et définit l'adaptation du processus de design développé pour répondre aux problématiques de conception propres aux bioprocédés. Suivront ensuite les différents objectifs secondaires du projet. Cette section présente également les hypothèses générales au projet ainsi que la méthode expérimentale suggérée pour résoudre la problématique.

Le chapitre III – Mise en place de l'aire de production utilisant l'adaptation du processus de design afin de développer des méthodes de mise en culture efficaces de systèmes de production de microalgues. Il dresse la liste des contraintes opérationnelles et présente les solutions retenues. L'évaluation du processus de design pour ce projet est également présentée.

Le chapitre IV – Conception d'un système d'application de bio-ingrédient évalue le processus de design adapté aux bioprocédés élaboré au chapitre II sur un projet de conception en partenariat avec l'entreprise Fumoir Grizzly. Cette entreprise désire appliquer un bio-ingrédient sur leurs tranches de saumon fumé afin de contrôler l'activité bactérienne lors de la conservation de cet aliment. Le projet consiste à concevoir le système capable d'appliquer ce bio-ingrédient. Ce chapitre définit dans un premier temps la problématique du projet avant de présenter les besoins de l'entreprise. Par la suite, les spécifications du système de production sont identifiées pour définir les premiers critères de conception. La conception du prototype est par la suite présentée au travers de plusieurs phases de tests et de raffinement et des essais de validation sont réalisés pour démontrer l'atteinte des objectifs du système. Enfin, un retour sur le processus de design utilisé est réalisé.

Le chapitre V – présente un article publié dans la revue *Algal Research* en avril 2015 (DESCHENES, et al., 2015) qui présente le résultat des recherches sur la mise en place de protocole de culture en mixotrophie. Il définit également une méthode de production afin de

limiter l'activité bactérienne en créant des carences alternées de nitrates et de carbone organique.

CHAPITRE 2

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 PROCESSUS DE CONCEPTION DE SYSTEMES

2.1.1 Présentation de la méthode de base

Plusieurs méthodes définissent les différentes étapes à franchir pour réaliser un projet de conception. Que ce soit par les méthodes de la maison de la qualité ou les nombreuses approches de « conception pour optimiser » la production, l'assemblage ou minimiser les pertes (DEKKERS, et al., 2013), toutes ces méthodes se basent sur une analyse rigoureuse des besoins du marché pour orienter le développement de produits.

Le processus de design utilisé dans ces travaux se base en grande partie sur l'approche proposée par Ulrich and Eppinger (ULRICH & EPPINGER, 2016) qui décompose en six phases distinctes les différentes étapes de réalisation.

Phase 0 : Avant-projet

La phase d'avant-projet est habituellement référencée à la phase 0, car elle précède la décision de réaliser le projet. Cette phase débute par une opportunité de marché en lien avec les orientations et le positionnement d'une entreprise et se termine avec une description de projet qui définit les contraintes, le marché visé et les éléments clés de réussite.

Phase 1 : Développement de concepts

Dans cette phase, le contexte de réalisation du projet est défini et les besoins du marché sont identifiés. Ces besoins seront par la suite traduits en spécifications cibles que devra avoir le produit afin de répondre aux exigences du marché. Une fois ces données techniques

en main, la génération de concept pourra débuter. Plusieurs recherches seront nécessaires afin d'évaluer différentes options. Cette phase se termine par la sélection d'un ou de plusieurs concepts les plus prometteurs.

Phase 2 : Conception préliminaire

La conception préliminaire définit l'architecture du produit en subdivisant le produit en sous-systèmes et composants. Les ressources internes et externes nécessaires pour réaliser le projet sont identifiées ainsi que les méthodes de production et le processus d'assemblage.

Phase 3 : Conception détaillée

La conception détaillée comprend la définition de la géométrie finale du produit, le choix des matériaux et des technologies utilisés, la définition des tolérances ainsi que l'ensemble des pièces standards achetées chez des distributeurs. À la fin de cette phase, en plus des plans de fabrication du produit, un estimé très détaillé des coûts de production peut être livré.

Phase 4 : Essais et raffinements

La phase d'essais et de raffinements implique la construction et le raffinement de plusieurs versions du produit. Ces versions ne sont pas nécessairement produites avec les mêmes procédés que le système final. L'objectif de cette phase est de valider les choix de design et l'atteinte ou non des spécifications cibles par le produit.

Phase 5 : Mise en production

Enfin, la dernière phase du processus de conception est l'élaboration des méthodes de production qui permettront la réalisation du produit. Cette phase se veut une étape de formation et d'ajustement pour tout le personnel de production.

Ce processus de développement de projet, bien qu'extrêmement répandu, doit être adapté aux conceptions de systèmes présentés dans ces travaux. Les modifications apportées sont présentées dans les sous-sections suivantes.

2.1.2 Production à un seul exemplaire

L'approche proposée par Ulrich est une méthode pour développer un produit destiné à une consommation de masse. Certaines phases du développement doivent donc être modifiées, car les deux systèmes réalisés dans ces travaux de recherche ne sont produits qu'à un seul exemplaire. Ainsi, la phase 5, qui définit les méthodes de production ne sera pas nécessaire, car l'objectif est de concevoir un prototype unique qui sera amélioré et raffiné en fonction des résultats des différents essais de validation.

Il est important de préciser également que la phase 0 ne sera pas présentée, car il s'agit des travaux préparatoires qui ont mené à la réalisation de ce travail de recherche.

2.1.3 Disponibilité des technologies, un enjeu majeur du choix de concept pour les bioprocédés

L'approche présentée par Ulrich pour sélectionner la technologie utilisée dans le produit final (figure 1) ne convient pas au type de projets développés dans ce travail. Ulrich propose qu'à partir de la définition des spécifications, une génération et une sélection de concepts soient réalisées pour être en mesure de définir l'architecture du produit (sous division du système en modules ou en fonctions). Une fois ces étapes franchies, les technologies et les matériaux pouvant permettre la réalisation des concepts sont sélectionnés, le prototype est fabriqué et des essais et raffinements sont réalisés.

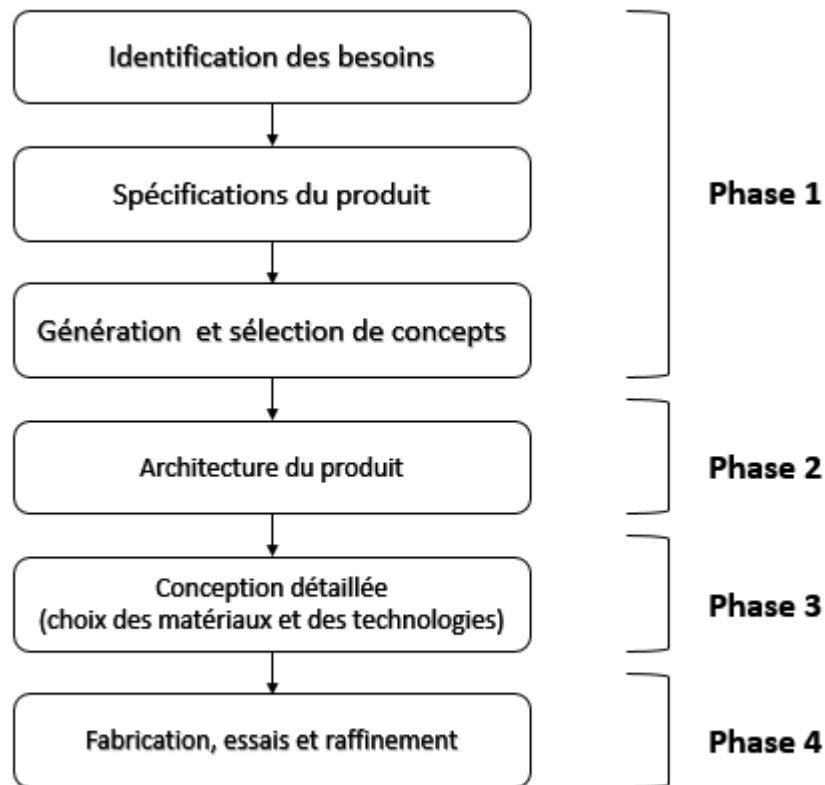


Figure 1 : Extrait de la phase de développement de concepts

Dans les projets de conception présentés dans ce travail, le choix des technologies utilisées sur les éléments principaux des systèmes doit se faire avant la génération et la sélection de concepts. Deux raisons principales poussent l'application de cette chronologie. La première vient du fait que les technologies disponibles pouvant être appliquées à ces domaines d'utilisation sont restreintes et souvent très sophistiquées. Elles deviennent rapidement difficiles à maîtriser pour une future adaptation à certaines contraintes du projet et demeurent souvent très dispendieuses. Les facteurs de sélection deviennent d'ordre économique et les technologies retenues entraînent d'autres contraintes sur le reste du design qui devront être considérées lors de la génération des concepts.

La deuxième raison est par la nature des procédés qui font interagir du matériel vivant dans leur processus. Or, le comportement de ces agents biologiques n'est pas toujours simple à prévoir lorsqu'ils sont utilisés dans différents contextes. Introduire des tests de validation tôt dans le processus de design peut donc réorienter la conception selon un comportement non pressenti et ainsi diminuer les coûts de développement et les risques d'une mauvaise conception.

Ainsi, les phases de développement ne seront plus linéaires. Le choix des technologies (phase 3) alimentera la génération de concepts (phase 1) sur certains éléments du système qui pourront être validés lors de tests de validation (phase 4) avant de clarifier l'architecture du produit (phase 2) et de reprendre le reste du design pour une deuxième itération (phases 3, 1, 4 et 2). Ce processus est illustré à la figure 2.

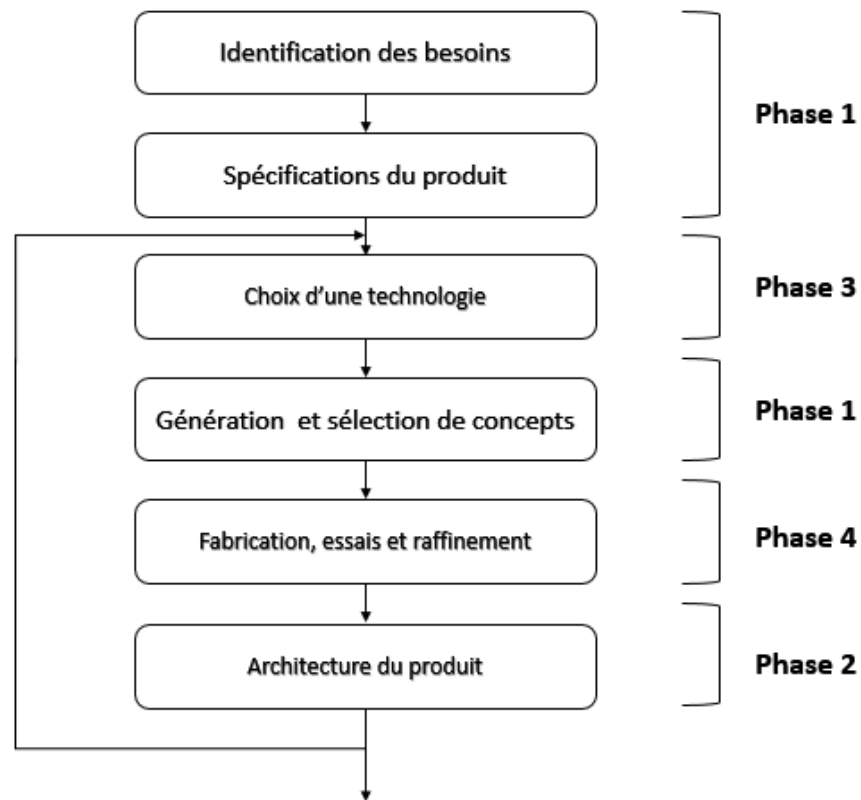


Figure 2 : Processus de design modifié

Le processus devient itératif, car l'orientation propose de valider technologie par technologie afin de raffiner l'architecture du produit en évaluant les résultats sur le matériel biologique.

Lors de la conception, une attention particulière doit être apportée pour garder le prototype flexible et facilement adaptable en fonction des résultats des essais. Ce choix de processus a été adopté afin de limiter les coûts de développement.

Cette modification apportée au processus de développement de produit concorde avec les résultats de Dekkers (DEKKERS, et al., 2013). Cette étude intègre les résultats de 49 articles tirés de la littérature scientifique traitant de la conception de produit et regroupe les divers sujets abordés en six catégories. L'une de ces catégories traite du choix des fournisseurs et de la façon de contribuer à leur développement.

L'auteur précise que le choix des technologies et des fournisseurs fait lors de la conception a un immense impact sur les performances du processus de design et de la mise en production du système et est clairement sous-estimé par les processus de design actuels. Il relate plusieurs exemples où l'implication et le choix des fournisseurs dans le processus s'est fait d'une façon trop superficielle et sans importance entraînant d'importantes erreurs de conception et retards de fabrication.

Le nouveau modèle proposé dans l'approche modifiée met de l'avant les capacités des fournisseurs dès les premières phases de design et pourra certainement contribuer à rehausser le processus de développement de produit.

2.1.4 Retour sur les besoins et non les spécifications

L'une des dernières étapes des phases de développement est de définir les spécifications finales du produit et de les comparer aux spécifications initiales tirées de l'analyse des besoins. Ulrich propose qu'avec cette méthode, les concepteurs seront en mesure de déterminer si le produit répond aux demandes du marché (voir figure 3).

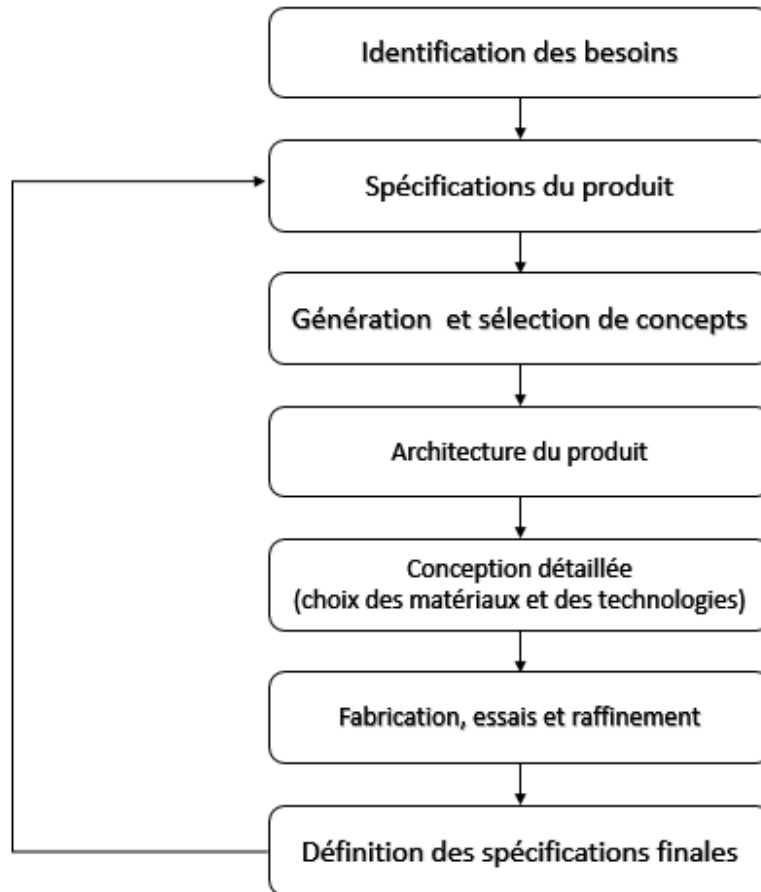


Figure 3 : Évaluation du design selon Ulrich

Or, Andreas Herrmann (HERMANN, et al., 1999) propose une approche différente. Il prétend que la comparaison des résultats du design obtenu devrait se faire avec les besoins du marché au lieu des spécifications cibles.

Il précise que le processus de développement doit tenter de traduire l'esprit du consommateur en un langage d'ingénierie. Les besoins du client doivent donc être traduits en spécifications mesurables et quantifiables. Cependant, ce n'est pas uniquement les données techniques du produit qui vont déterminer si le consommateur lui attribuera un gage

de qualité. D'autres éléments comme le prestige convoité, un sentiment de sécurité et une expérience apaisante ne peuvent pas être mesurés par des spécifications techniques.

Quand une compagnie conçoit un produit, elle est uniquement capable de définir les valeurs cibles des spécifications du produit final. Un consommateur basera son achat sur sa perception de l'utilité du produit dérivée des spécifications qu'il saura reconnaître. Ainsi quand un consommateur achète une automobile, il ne base pas uniquement son choix sur une liste de spécifications comme la consommation d'essence, la qualité des pneus, la force du moteur, etc., mais aussi sur l'intégration complexe que l'utilité des composants peut lui apporter.

C'est pour ces raisons qu'il est préférable, une fois le processus de design terminé, d'évaluer le résultat du processus selon la satisfaction du client envers la qualité du produit et les valeurs perçues. C'est pourquoi, dans ces travaux de recherche, les prototypes finaux seront évalués en fonction des spécifications cibles du produit et des besoins identifiés.

2.1.5 Adaptation du processus de design

À la lumière des modifications proposées, le processus de développement de produit pour les deux systèmes présentés dans ces travaux sera celui de la figure 4.

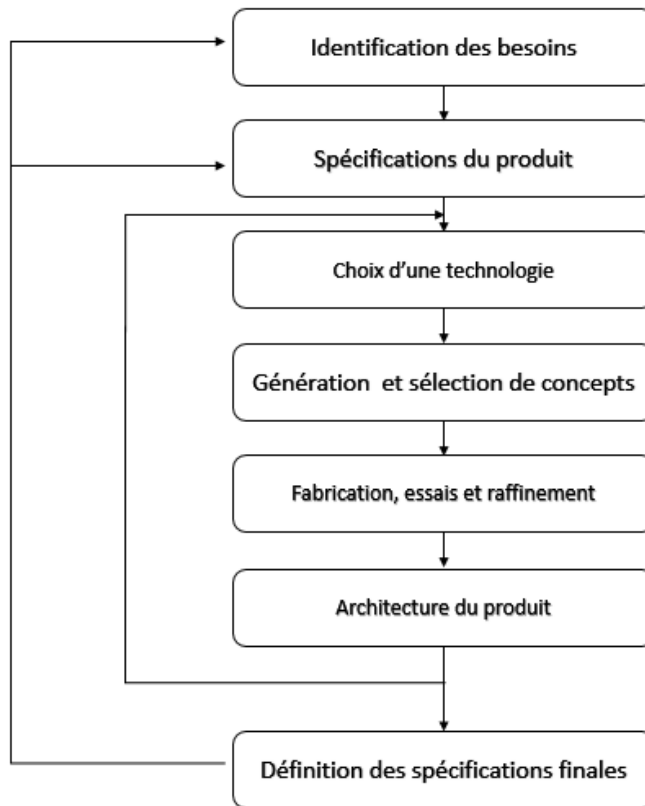


Figure 4 : Processus de développement de produit adapté à ce travail de recherche

Ainsi, le processus se base toujours sur l'identification des besoins du marché ou du client pour débiter le processus de développement. Ces besoins seront par la suite traduits en spécifications mesurables et quantifiables qui serviront de point de départ pour l'équipe de développement. Par la suite, une recherche des technologies disponibles et transférables aux contraintes et contextes du projet sera réalisée afin de guider l'étape de génération de concepts. Une fabrication rapide permettra d'évaluer le comportement du concept sélectionné et identifiera les autres variables de conception qui permettront de clarifier une partie de l'architecture de produit avant de reprendre le processus de design. Plusieurs itérations pourront être réalisées en fonction de la complexité du système et du nombre de technologies nécessaires à sa réalisation.

Une fois le développement du système terminé, les spécifications obtenues seront comparées aux spécifications cibles et aux besoins du client identifiés par l'équipe de développement en début de processus afin d'évaluer le résultat obtenu et apporter des correctifs au besoin.

2.1.6 Application du processus de design modifié

Cette adaptation du processus de design sera appliquée dans le cadre de ces travaux, à deux bioprocédés différents. Le premier a pour objectif principal d'implanter une culture de microalgues en mixotrophie dans des conditions industrielles ou similaires. Pour ce faire, une conception de l'aire de production doit être faite pour limiter les contaminations bactériennes et permettre aux cultures d'atteindre leur plein développement.

Afin de bien comprendre les enjeux et le contexte de réalisation, les sections qui suivent caractérisent tous les aspects relatifs à ce bioprocédé et les approches proposées pour arriver à ces fins.

Le deuxième bioprocédé consiste à produire un bio-ingrédient à base de *divergicine M35* afin d'inhiber la croissance d'agents pathogènes sur des tranches de saumon fumé et d'implanter un système d'application de ce bio-ingrédient sur une chaîne de production industrielle.

Ce projet a été réalisé par un consortium de recherche impliquant le MAPAQ, l'Université Laval, l'Université du Québec à Rimouski et l'entreprise Fumoir Grizzly. Le mandat confié à l'Université du Québec à Rimouski était de concevoir le système pour l'application du bio-ingrédient et de l'intégrer à leur ligne de production afin de pouvoir valider l'effet du bio-ingrédient en contexte industriel.

Étant donné qu'aucun travail n'a été réalisé sur la production du bio-ingrédient, aucune recherche supplémentaire sur ce bioprocédé n'a été réalisée. Le travail consiste à appliquer l'adaptation du processus de design sur la conception du système et d'évaluer ses

performances. Le contexte de réalisation et la situation initiale du projet seront présentés au chapitre IV.

2.2 SITUATION INITIALE DE LA CULTURE DE MICROALGUES

2.2.1 Caractéristiques du bioprocédé

De plus en plus de scientifiques convergent dans la même direction : produire du biodiésel à partir de cultures de microalgues pourrait être une solution très intéressante à la demande d'énergie constante des sociétés actuelles (MOELLERING & BENNING, 2009). Les cultures de microalgues présentent plusieurs avantages dans l'élaboration d'un biocarburant : elles ont un taux de croissance plusieurs fois supérieur à la majorité des plantes terrestres (les divisions cellulaires peuvent s'opérer aussi rapidement que toutes les 3,5 heures), plusieurs espèces peuvent accumuler de 20 à 50% de leur poids sec en triacylglycérols (groupe de lipides à la base de la production de biodiésel) et elles n'utilisent aucune terre arable ce qui diminue les conséquences sur le marché alimentaire mondial (SINGH & GU, 2010).

Pour se développer, les microalgues ont besoin principalement d'une source de carbone, de vitamines et de sels minéraux en suspension dans leur milieu de culture. Pour augmenter la productivité, les concentrations de ces nutriments doivent être contrôlées tout en régulant le pH, la température, le taux de dioxygène dissout et l'intensité lumineuse envoyée à la culture (WILLIAMS, 2002), puisque chaque espèce de microalgues possède un optimum pour ces paramètres.

Selon l'espèce, trois types de métabolismes cellulaires peuvent être utilisés chez les microalgues. Le premier, l'autotrophie, permet de fixer le carbone inorganique (CO₂ par exemple) par photosynthèse. Les microalgues produisent ainsi de l'énergie intracellulaire et libèrent de l'oxygène. Ce type de réaction est très intéressant, surtout dans une politique de

course du carbone où la captation de CO₂ devient un enjeu économique. Le problème avec ce type de culture est que lorsque la biomasse atteint une certaine densité, la lumière peine à pénétrer à l'intérieur de la culture : créant une limitation lumineuse diminuant ainsi le taux de croissance de la culture, donc la productivité du système. Ce phénomène est appelé photoinhibition.

La deuxième voie métabolique que peuvent parfois utiliser les microalgues est celle de l'hétérotrophie. Ce type de culture n'a pas besoin de lumière pour croître : les cellules se nourrissent de carbone organique (glucose, glycérol, acétate, sucrose, fructose, etc.) qu'elles transforment, à l'aide des autres nutriments disponibles dans le milieu, en énergie intracellulaire et en gaz carbonique. Les résultats obtenus avec cette voie métabolique sont très intéressants : étant donné que la croissance n'est pas inhibée par photoinhibition comme dans le cas de l'autotrophie. Ainsi, une meilleure productivité et une plus haute densité de biomasse sont généralement observées (HUANG, et al., 2010).

Cependant, comme mentionnée plus haut, cette voie métabolique a pour désavantage de produire du gaz carbonique lors de la consommation du carbone organique par les cellules. Obtenir un cycle de carbone fermé avec cette méthode pour une production à grande échelle de biodiésel serait donc plus difficile.

Enfin, la dernière voie métabolique est celle de la mixotrophie. Pour simplification, le terme « mixotrophie » désignera dans ce document toute combinaison des deux voies métaboliques décrites précédemment et nécessitant des types de culture différents. La mixotrophie s'opère avec un apport de lumière extérieur, une source de carbone inorganique et une source de carbone organique à l'intérieur du milieu de culture. Les cellules utilisent donc les deux voies métaboliques à l'intérieur du même procédé. Ce type de culture est très intéressant, car il permet un gain de productivité pouvant aller parfois même au-delà de la somme des productivités maximales obtenues séparément en autotrophie et en hétérotrophie. Ces résultats varient bien entendu d'une espèce à l'autre (GIRARD, et al., 2014).

Malgré ses avantages, la présence de carbone organique dans le milieu de culture peut entraîner un risque plus élevé de contamination bactérienne comparativement à l'autotrophie conventionnelle. Des méthodes de production particulières et des choix de matériaux judicieux doivent permettre une stérilisation du milieu de culture avant l'ensemencement pour inhiber toutes activités bactériennes.

Présentement, plusieurs travaux de recherche visent à établir les meilleures conditions de culture pour augmenter la productivité et favoriser l'accumulation en lipides des microalgues. Bien entendu, les résultats varient de façon significative selon l'espèce cultivée et les conditions de culture auxquelles elles sont soumises. Néanmoins, l'approche de prévoir une carence en azote vers la fin de la phase de croissance semble être une avenue assez universelle pour favoriser une accumulation en lipides.

Une fois les algues cultivées, différentes techniques de récolte et de transformation peuvent être appliquées sur la biomasse produite pour en faire du biodiésel. Beaucoup de recherches s'effectuent également dans ce secteur pour augmenter la rentabilité des opérations (AHMAD, et al., 2010). Dans les travaux de recherche présentés ici, aucun travail ne sera réalisé pour améliorer l'enrichissement en lipides ou la récolte des cultures. L'emphase étant davantage mise sur la mise à l'échelle des systèmes dans un environnement de culture industriel.

2.2.2 Niveau d'avancement des systèmes de production

Plusieurs types de photobioréacteurs ont été testés durant les dernières années. L'ensemble des systèmes peut être regroupé selon trois grandes catégories : les photobioréacteurs tubulaires, les panneaux plats et les colonnes verticales.

La première catégorie, les photobioréacteurs tubulaires, sont constitués d'un réseau de tuyaux de plastique ou de verre dont le diamètre est très souvent inférieur à 0,1 mètre. Ce petit diamètre est utilisé pour assurer une pénétration suffisante de la lumière dans une culture dense (RAWAT, et al., 2012). Ces tuyaux sont tous interreliés entre eux et peuvent être

orientés face à la lumière d'une façon horizontale, verticale, oblique ou hélicoïdale. La culture est la plupart du temps recirculée à l'aide d'une pompe qui assure un écoulement turbulent dans le circuit pour favoriser un brassage adéquat. À la sortie ou l'entrée de la pompe, le fluide passe dans un système d'échange gazeux permettant d'enlever l'excès d'oxygène.

L'une des façons de mettre ce système à l'échelle est d'augmenter le diamètre du réseau tubulaire. Malheureusement, la surface d'illumination diminue alors considérablement et la croissance de la culture s'en trouve grandement affectée. L'autre méthode est de conserver le même diamètre de tuyau, mais de multiplier le réseau tubulaire. Cette méthode peut fonctionner pour de petites productions, mais elle occuperait une surface de production beaucoup trop grande pour une production à grande échelle (UGWU, et al., 2007).

Il est à noter que ce type de système opère avec un haut taux de dioxygène dissout : étant donné que la culture est dégazée uniquement à un endroit dans le système, l'oxygène dissout s'accumule plus facilement ce qui a pour conséquence d'inhiber la croissance de la culture.

Un autre désavantage de ce type de photobioréacteur provient du fait que la culture est constamment pompée en régime turbulent. Ceci a pour conséquence d'augmenter considérablement les coûts de production reliés à l'énergie consommée et au coût de maintenance de ces systèmes (NORSKER, et al., 2011).

Ce type de réacteur est présentement utilisé pour la culture de microalgues destinées à la production d'astaxanthine, un antioxydant particulièrement puissant (NORSKER, et al., 2011).

Le deuxième type de réacteur, les panneaux plats, possède aussi une très grande surface d'illumination ce qui permet une grande efficacité photosynthétique (HU, et al., 1996). Contrairement aux photobioréacteurs tubulaires, celui-ci utilise un bullage constant d'air ou d'azote pour assurer le dégazage du milieu. Le taux d'oxygène dissout s'en retrouve donc grandement diminué.

Le désavantage avec ce type de photobioréacteur est le coût d'implantation et d'utilisation pour une culture à grande échelle. En effet, ce genre de système nécessite beaucoup de supports métalliques pour tenir à la verticale les panneaux transparents du photobioréacteur. De plus, l'apport en air ou en azote constant pour assurer le dégazage de la culture augmente considérablement les coûts d'utilisation de ce genre de système (BRENNAN & OWENDE, 2010).

Enfin, le dernier type de photobioréacteur, celui à colonnes verticales, se retrouve en plusieurs variantes (CHOI, et al., 2003). Ce type de photobioréacteur est compact, peut être produit à faible coût et requiert moins d'énergie lors de son utilisation que les modèles à panneaux plats (UGWU, et al., 2007).

Il utilise cependant des matériaux sophistiqués (cylindre de plastique ou de verre ayant un diamètre pouvant aller jusqu'à 0,19 mètre (SANCHEZ MIRON, et al., 2002) et rencontre le même problème que les autres systèmes, lorsque mis à l'échelle, si l'on augmente le diamètre du cylindre, la surface d'illumination diminue considérablement.

2.3 PROBLEMATIQUE PRINCIPALE DE LA MISE A L'ECHELLE DES SYSTEMES DE PRODUCTION DE MICROALGUES

Mettre à l'échelle un système de production de microalgues n'est pas une chose facile. Dans certains cas, les coûts d'implantation deviennent si importants qu'une future rentabilité du procédé devient pratiquement impossible. Dans d'autres cas, les performances espérées avec les premiers essais expérimentaux ne sont tout simplement pas au rendez-vous.

De plus, bien qu'il ne soit pas possible d'avoir accès à tous les résultats des recherches industrielles privées, peu d'entreprises ne semblent, pour l'instant, être en mesure de proposer un système efficace de culture de microalgues à grande échelle destiné à la production de biodiésel.

L'objectif premier de ce projet est de tenter de mettre en place un système de production de microalgues en utilisant des méthodes pouvant être transférées à une échelle de production commerciale. Pour ce faire, deux aspects devront être traités simultanément : minimiser les coûts d'implantation et d'opération du système tout en maximisant la productivité du procédé.

Il est important de rappeler que l'objectif de ces travaux n'est pas d'appliquer ces méthodes uniquement à la production de biodiésel, mais bien de transférer des méthodes et des concepts éprouvés en laboratoire à une production à grande échelle. C'est pourquoi aucun travail d'enrichissement des cultures sur certains types de biomolécules en favorisant différentes voies métaboliques ne sera réalisé.

2.4 HYPOTHESES

Pour réaliser ce projet de recherche, différentes hypothèses sont posées afin de diriger le déroulement de ce dernier de façon plus efficace envers l'atteinte de l'objectif principal.

2.4.1 Rejet de l'hétérotrophie

Comme mentionné à la section *1.1.1 Caractéristiques du bioprocédé*, l'hétérotrophie est une voie métabolique cellulaire qui permet à une microalgue de produire de l'énergie strictement par l'assimilation de sources de carbone organique. Cette avenue entraîne une production de CO₂, ce qui n'est pas intéressant, car le but premier de l'utilisation des microalgues est généralement d'en capturer. La mise en place d'une production à grande échelle basée sur cette voie métabolique rend une production avec un cycle de carbone fermé plus complexe.

L'hétérotrophie ne sera donc pas retenue dans les méthodes de culture.

2.4.2 La mixotrophie préconisée

Plusieurs recherches ont été réalisées récemment sur la mixotrophie et ont permis de démontrer que cette méthode de production pouvait avoir un net gain de productivité par rapport à des productions en autotrophie (WANG & H. YANG, 2014) (CHANDRA, et al., 2014) (PEGALLAPATI, et al., 2012). Cette méthode sera préconisée dans ce travail de recherche afin de viser les meilleures productivités possibles.

Tel que mentionné plus tôt, étant donné que cette voie métabolique nécessite du carbone organique, le milieu de culture utilisé devient alors plus favorable à la prolifération des bactéries. Réussir à implanter cette méthode de production à l'échelle industrielle en éliminant les méthodes de stérilisation à l'autoclave ou à la vapeur pour des raisons économiques ne sera pas une chose facile. Différentes approches de nettoyage et plusieurs protocoles expérimentaux seront ainsi évalués dans le cadre de ce mémoire afin de tester l'hypothèse que l'implantation de la mixotrophie à l'échelle industrielle est potentiellement réalisable.

2.4.3 Sélection de l'espèce

L'espèce sélectionnée pour ces travaux est *Scenedesmus obliquus* et provient du centre de culture en phycologie de Waterloo en Ontario. Cette espèce a été sélectionnée pour ses grandes capacités à croître en mixotrophie, et ce, avec plusieurs sources de carbone organique dissout (GIRARD, et al., 2014). Elle permettra de déterminer les premiers comportements des systèmes de production.

2.4.4 Définition du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est du BBM (Bold's Basal Medium) tamponné à un pH de 6,8 enrichi en glucose pour les croissances en mixotrophie (DESCHENES, et al., 2015). Le glucose a été utilisé comme source de carbone organique en raison de sa grande disponibilité et des nombreuses méthodes d'analyse connues pour sa détection. Il est certain que dans un contexte industriel, une autre source de carbone organique moins dispendieuse devra être utilisée.

2.4.5 Système de production et prétraitement de l'eau utilisé

Les systèmes de production utilisés pour ces travaux sont des photobioréacteurs de type colonne de 27 litres, développés au fil des années par les laboratoires de recherche en aquaculture et le département de mathématiques, informatique et de génie de l'Université du Québec à Rimouski (DESCHENES, et al., 2012).

Le prétraitement de l'eau consiste à filtrer (avec des filtres à sac) à 10 µm puis 1 µm toute l'eau utilisée avant de l'ultrafiltrer à 50 kDa. Cette méthode a également été développée au cours des années par le même laboratoire.

2.5 METHODOLOGIE ET OBJECTIFS INTERMEDIAIRES

La réalisation de ce volet du projet de recherche peut être divisée en deux phases distinctes : la mise en place d'une aire de production et la définition d'une stratégie de culture.

La mise en place de l'aire de production consiste à définir les méthodes et le matériel nécessaire pour acheminer tous les intrants au système de production. Dans cette phase seront définies les méthodes d'aseptisation des unités de production et du milieu de culture, la façon de transporter ce milieu de culture jusqu'aux unités de production en limitant les risques de contamination et les méthodes d'ensemencement et d'apport en nutriments. Il

faudra également configurer les photobioréacteurs pour permettre une régulation adéquate du procédé. Les travaux relatifs à cette phase sont présentés au chapitre III.

La deuxième phase de ce volet du projet consiste à définir une stratégie de culture en mixotrophie pour augmenter les rendements des systèmes tout en limitant la contamination bactérienne. Pour ce faire, une caractérisation du bioprocédé en autotrophie et en mixotrophie au niveau de la croissance et de la disponibilité des nutriments dans le milieu de culture sera d'abord réalisée afin de valider les concepts implantés à la phase précédente. Par la suite, une stratégie de culture permettant de minimiser la contamination bactérienne sera implantée. Les résultats de cette phase sont présentés au chapitre V.

CHAPITRE 3

LA MIXOTROPHIE EN CONDITIONS INDUSTRIELLES

3.1 POINTS DE DEPART

Afin d'implanter une culture en mixotrophie dans des conditions industrielles, les méthodes de nettoyage et d'ensemencement des systèmes de production ont été revues. La liste des besoins relatifs à cette implantation peut être résumée dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Liste des besoins pour la culture de microalgues

No	Besoins
1	Convivialité du nettoyage du système.
2	La distribution du milieu de culture et l'ensemencement sont faits d'une façon rapide et efficace.
3	Les méthodes de production développées permettent de cultiver des microalgues en mixotrophie avec une productivité supérieure à l'autotrophie.
4	Être en mesure de caractériser efficacement la croissance des cultures.

L'ensemble des besoins identifiés a par la suite été traduit en spécifications afin d'obtenir les paramètres de conception initiaux. Ces spécifications sont présentées dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Liste des spécifications pour la culture de microalgues

No	Spécification	Valeurs
1.1	Le nettoyage du système peut se faire en mode automatique	[0,1]
1.2	Les systèmes de production sont connectés de façon permanente au système de nettoyage	[0,1]
1.3	Le temps de nettoyage est relativement court	< 0,5 jour
2.1	L'erreur sur le volume d'ensemencement ou sur la concentration des nutriments distribuée à chaque système est minimisée	Minimiser l'erreur
2.2	La façon dont le milieu de culture et l'ensemencement sont réalisés facilite le nettoyage des systèmes	[0,1]
2.3	La distribution du milieu de culture et de l'ensemencement est rapide	< 25 min/système
3.1	Les unités de production doivent être suffisamment aseptisées pour permettre à une culture de microalgues de croître de façon efficace en mixotrophie (productivité supérieure à l'autotrophie)	[0,1]
3.2	La présence de bactéries doit être diminuée au minimum	Plus faible possible
4.1	Les systèmes doivent être conçus de façon à permettre un échantillonnage quotidien des systèmes de production sans les exposer à un risque de contamination	[0,1]
4.2	Le pH des cultures doit pouvoir être enregistré et contrôlé avec différentes boucles de régulation.	Au moins deux boucles de régulation de pH dans chaque système

Une fois la liste des spécifications cibles identifiées, un choix de technologie pour chacun des aspects a pu être réalisé avant de débiter la phase de conception. Il est à noter que, quelques fois, plusieurs essais et raffinements ont été nécessaires avant d'arriver à une

approche fonctionnelle et finale. Les sections qui suivent présentent uniquement les résultats concluants des différentes phases de conception et non les approches non fructueuses.

Pour compléter cette démarche, une revue du design des photobioréacteurs utilisés aurait aussi pu être réalisée. Cependant, ce travail n'était pas prévu dans ces travaux de recherche et pourra être inscrit dans une prochaine phase de développement du laboratoire.

3.2 DISTRIBUTION HYDRAULIQUE ET METHODE DE NETTOYAGE

Après plusieurs recherches et essais, les choix des technologies pour cette section se sont arrêtés sur les éléments suivants : une cartouche d'ultrafiltration pour préparer l'eau nécessaire aux cultures, un filtre UV comme post traitement et un savon antibactérien au peroxyde d'hydrogène comme agent nettoyant. Après plusieurs générations de concepts et essais de validation, voici la séquence des opérations avec les détails des choix de concepts retenus.

L'eau utilisée pour les systèmes de production est premièrement filtrée à 10 μm puis 1 μm (avec des filtres à sac) avant d'être ultrafiltrée à 50 kDa puis entreposée dans un réservoir tampon. Cette eau sert d'élément de base à la solution de nettoyage et peut aussi être utilisée pour mettre en suspension les cultures de microalgues.

Puisque les bassins tampons ne sont pas stérilisés avec les équipements actuels, des filtres ultraviolets ont été ajoutés sur les lignes d'alimentation des photobioréacteurs pour enrayer toute activité biologique et seront utilisés lors de l'ensemencement.

Afin de diminuer les risques de contaminations bactériennes, une attention particulière devait être apportée à la conception du système d'alimentation des unités de production. Chaque photobioréacteur possède désormais deux lignes d'alimentation, soit une ligne principale permettant d'y acheminer l'eau traitée et une ligne secondaire pour l'ensemencement (inoculum) et l'injection des nutriments et des sels nutritifs concentrés. Ainsi, la ligne principale n'a plus besoin de transporter les nutriments d'un réservoir aux

unités de production facilitant grandement son nettoyage et minimisant les risques de contamination par des bactéries et protozoaires.

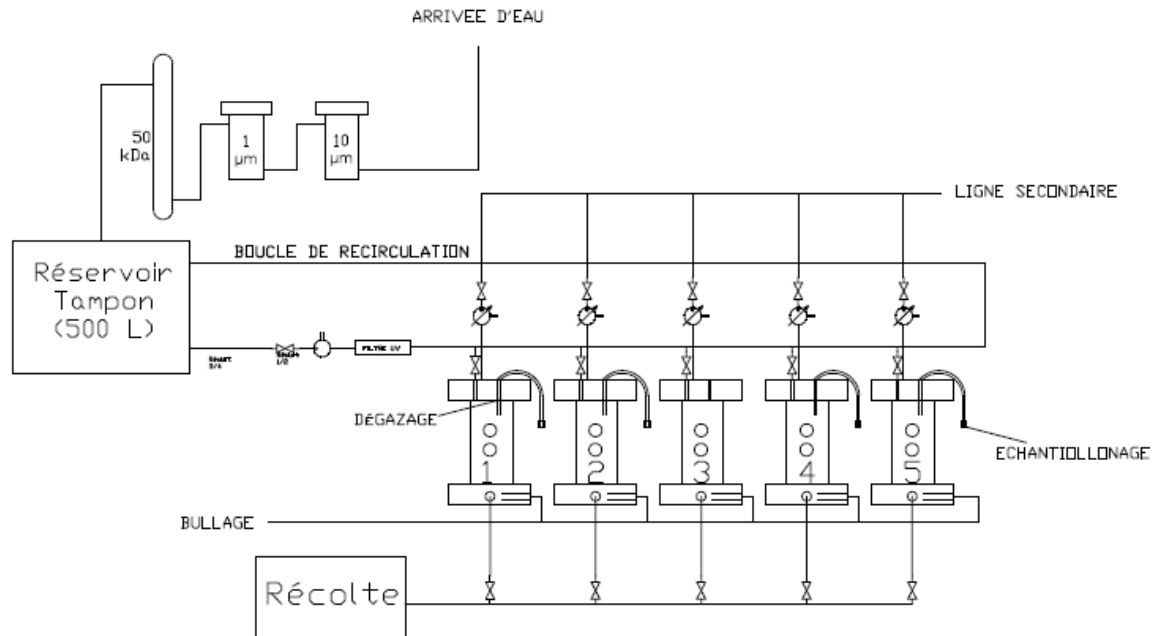


Figure 5 : Schématisation du système d'alimentation et de récolte

La ligne principale est fixée de façon permanente pour toute la durée des expériences afin de diminuer le risque de contamination bactérienne en branchant et débranchant des composantes et ainsi ouvrir le système à l'air ambiant. Une fois les systèmes raccordés, une solution de nettoyage utilisant un agent désinfectant à base de peroxyde d'hydrogène, le savon ACCEL PREVENTION, produit par Virox, est pompé en boucle fermée dans le réseau de distribution et dans les systèmes de culture pour une période de 15 minutes. Ce savon,

très efficace contre les biofilms, est aussi un virucide général, un bactéricide, un fongicide, un tuberculocide et un désinfectant à large spectre de 30 secondes. Ce savon a été sélectionné suite aux recommandations de Monsieur Pierrot Tremblay, M.-Sc. et représentant des ventes chez Fischer Scientific. Une fois le lavage terminé, trois rinçages sont réalisés avec de l'eau préalablement traitée et soumise à un rayonnement ultraviolet. Il est important de préciser que lors du rinçage, l'air entrant dans les photobioréacteurs est préalablement filtré à 0.2 μm .

La ligne secondaire, entièrement démontable et autoclavable, permet une stérilisation complète de tous ses composants. Les connexions avec les systèmes de production sont réalisées dans un champ stérile produit par une flamme et nettoyées à l'alcool.

Il faut noter également que tous les éléments entrants dans cette ligne ont soit été préparés sous une hotte biologique ou autoclavés, garantissant ainsi la stérilité de ces composants.

3.3 OXYDATION DU MILIEU ET NEUTRALISATION

Après plusieurs essais de mise en culture infructueux, une approche supplémentaire pour tenter de diminuer la contamination bactérienne a été entreprise. Des recherches ont permis d'identifier que plusieurs traitements de purification d'eau étaient réalisés à l'aide d'ozone. L'ozone est un agent oxydant très puissant et présente une demi-vie très courte. Ce produit est donc intéressant pour aseptiser les unités de production, car il se neutralise naturellement au bout d'un certain temps.

Cependant, l'ozone est également très toxique et plusieurs systèmes de sécurité doivent être mis en place lorsqu'il est introduit dans un processus industriel. De plus, les générateurs d'ozone sont relativement dispendieux et nécessitent un espace considérable. Pour toutes ces raisons, l'ozone a été écarté des solutions possibles pour l'instant et a laissé sa place au peroxyde d'hydrogène, un agent un peu moins oxydant, mais ayant beaucoup moins de contraintes au niveau des aspects de sécurité. De plus, l'un des avantages du peroxyde d'hydrogène comparativement à d'autres agents oxydants comme le chlore est qu'il peut être

neutralisé par des catalases. Il faut cependant noter qu'un système à l'ozone demeure très intéressant dans un contexte industriel où l'aire de production peut s'adapter aux contraintes de sécurité.

Un protocole de nettoyage au peroxyde d'hydrogène a donc été ajouté aux méthodes déjà en place. Ainsi, une fois le cycle de nettoyage terminé et les systèmes de production remplis d'eau, un deuxième traitement au peroxyde d'hydrogène est réalisé pour diminuer les risques de contamination bactérienne : chaque système reçoit une dose de peroxyde d'hydrogène pour atteindre une concentration de 0,05% volume/volume. Les systèmes sont laissés ainsi durant 24 heures avant d'être neutralisés par une injection de catalase. Par la suite, les systèmes pourront êtreensemencés et l'ajout de nutriments pourra se faire sous conditions stériles.

La concentration de 0,05% de peroxyde d'hydrogène avait préalablement été établie en se basant sur la littérature (LUCK, 1962) et sur les résultats de plusieurs tests réalisés en laboratoire. Ces tests avaient pour objectifs de déterminer quelle concentration de peroxyde d'hydrogène était nécessaire pour enrayer toute activité bactérienne à l'intérieur des photobioréacteurs et quelle concentration de catalase pouvait neutraliser le peroxyde d'hydrogène une fois la stérilisation terminée. Ainsi, des milieux de culture (180 µL) de LB (Lysogeny broth) et de BBM enrichis à 30 g/L de glucose et présentant des concentrations différentes de peroxyde d'hydrogène (0,01%, 0,05% et 0,1%) ont été contaminés avec 10 µL de culture d'*E. coli* à une concentration de 10^9 cellules/mL. La croissance bactérienne a été suivie chaque minute durant 24 heures à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 600 nm et a permis de démontrer que 0,05 % de peroxyde était largement suffisant pour éliminer toute forme de croissance bactérienne.

Pour ce qui est de la catalase, différentes concentrations ont été évaluées pour neutraliser 0,05 % de peroxyde d'hydrogène en 20 minutes dans un milieu de BBM enrichi à 30 g/L de glucose. Ces milieux ont été suivis par spectrophotométrie à 240 nm.

Avec cette méthode d'aseptisation, la prolifération bactérienne a grandement été diminuée dans les systèmes de culture. Les résultats de ces manipulations sont présentés au chapitre IV.

La figure 6 présente des systèmes de production en opération.



Figure 6 : Système de production en opération

3.4 INSTRUMENTATION CENTRALISEE ET STANDARDISATION

Les unités de production ont été automatisées à l'aide de plusieurs appareils permettant de connaître les principales conditions de culture, et les maintenir à leur niveau idéal. Ces principes sont facilement transférables à des productions à grandes échelles. Ainsi, les unités de production peuvent être instrumentées à l'aide d'une sonde à pH, d'une sonde à oxygène dissout et d'un lecteur de densité optique. Les actuateurs pouvant initier diverses boucles de régulation sont un débitmètre pour gaz comprimé et une pompe péristaltique, tous deux à

débit variable. Les choix guidant la sélection de ces composants étaient principalement d'ordre économique.

Les systèmes d'échantillonnage ont également été modifiés afin d'assurer la séparation entre la culture de microalgues et l'air environnant extérieur au photobioréacteur. Ainsi, avant d'ouvrir le système, une pression négative est créée dans un réseau tubulaire pour s'assurer qu'aucun flux entrant ne puisse être généré.

Tous ces éléments sont centralisés vers un système d'acquisition et de traitement des données (figure 7).



Figure 7 : Système d'instrumentation et de contrôle

3.5 PROCOLES DE MISE EN CULTURE ET RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les protocoles de mise en culture et les résultats expérimentaux sont présentés au chapitre V. La figure 8 présente les unités de production instrumentées

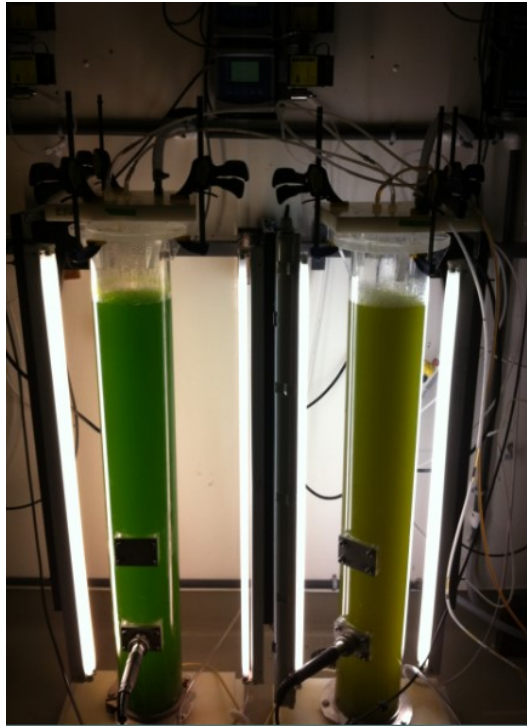


Figure 8 : Unités de production instrumentées

3.6 RETOUR SUR LES SPECIFICATIONS CIBLES

Cette section a pour objectif de vérifier si chacune des spécifications cibles identifiées lors de la phase de développement de concepts a pu être atteinte. Il est à noter que les spécifications relatives aux résultats de culture (contamination bactérienne) seront présentées au chapitre IV.

3.6.1 Nettoyage du système en mode automatique

Le système de nettoyage implanté, bien que réalisé en boucle fermée, n'est pas entièrement autonome. Toutes les valves installées sur le système sont des valves manuelles et nécessitent donc l'action d'un opérateur pour réaliser le nettoyage. Cependant, la séquence d'opération a démontré son efficacité. Il suffirait de remplacer les valves manuelles par des valves électroniques (ouverte, fermée) et interfacer le tout avec une séquence d'automatisation pour automatiser le cycle de nettoyage.

3.6.2 Connexion permanente des systèmes de production

Avec l'implantation de deux lignes d'alimentation, les unités de production demeurent connectées en tout temps au système de nettoyage ce qui diminue grandement les risques de contamination bactérienne. Les grands volumes d'eau nécessaires à la mise en culture peuvent être acheminés par cette ligne principale et les nutriments et l'ensemencement peuvent se faire via la ligne secondaire.

Étant donné que la ligne secondaire doit transporter un volume de liquide relativement faible, il devient plus facile de brancher et de débrancher cette ligne d'alimentation aux unités de production de manière à minimiser les risques de contamination. Des septums branchés sur les unités de production et des aiguilles médicales stérilisées à l'aide d'une flamme sont utilisés pour ces manipulations.

3.6.3 Temps de nettoyage relativement court

L'objectif de cette spécification était de réduire le temps de nettoyage par rapport aux anciens protocoles de préparation de systèmes utilisés afin d'augmenter le rendement opérationnel des équipements. Cette spécification n'a pu être atteinte, car les protocoles de nettoyage ont énormément évolué ajoutant plusieurs étapes de traitement.

3.6.4 Précision du système de distribution de nutriments et d'ensemencement

La distribution des nutriments dans chacun des systèmes est réalisée à l'aide de la ligne secondaire. Cette ligne est alimentée par une pompe péristaltique garantissant un dosage assez précis du volume injecté (plus ou moins 1 mL).

3.6.5 Nettoyage facile du système de distribution de nutriments et d'ensemencement

La ligne secondaire est entièrement démontable et autoclavable ce qui facilite grandement son nettoyage.

3.6.6 Rapidité du protocole d'ensemencement

Avec les installations proposées, l'ensemencement des unités de production, une fois le cycle de nettoyage terminé, prend entre 12 et 15 minutes et pourrait, lui aussi, être automatisé avec le cycle de nettoyage dans une approche à plus grande échelle.

3.6.7 Échantillonnage des systèmes de production

Le système d'échantillonnage installé sur les unités de production permet d'effectuer les prélèvements nécessaires en plein cœur du photobioréacteur, assurant ainsi l'homogénéité de l'échantillon avec le reste de la culture. Étant donné qu'il crée une pression négative avant d'ouvrir le système de production, aucun flux entrant ne peut se développer ce qui diminue grandement les risques de contamination. La spécification cible est donc atteinte.

3.6.8 Contrôle des bioprocédés

L'atteinte de la spécification cible demandait de pouvoir contrôler les unités de production à l'aide d'au moins deux boucles de régulation différentes. La flexibilité du système de contrôle mis en place permet d'en implanter beaucoup plus. En effet, avec trois capteurs différents (sonde à pH, sonde à oxygène dissout et lecteur de biomasse), deux actuators (débitmètre et pompe péristaltique) et un automate de grande capacité, une très grande variété de boucles de régulation peut être implantée pour optimiser divers paramètres de culture.

3.7 RETOUR SUR LES BESOINS DU LABORATOIRE

Afin de compléter le processus de conception, un retour sur les besoins doit être fait. De manière générale, il est possible d'affirmer que tous les besoins sont comblés avec les systèmes implantés. Les systèmes de culture sont faciles à nettoyer et très conviviaux à utiliser, la distribution du milieu de culture est faite d'une manière rapide et efficace, les méthodes de production en mixotrophie, qui seront présentées au chapitre V, présentent des rendements intéressants et supérieurs à l'autotrophie et les cultures de microalgues peuvent être suivies en ligne tout au long de leur croissance.

Bien entendu, plusieurs améliorations peuvent encore être apportées aux systèmes. En effet, comme présenté dans les sections précédentes, différentes options pourraient être envisagées afin de rehausser les performances des systèmes : implanter un traitement de l'eau à l'ozone afin d'améliorer l'efficacité et le temps de nettoyage, ajouter des valves électroniques pour diminuer le temps d'opération, ajouter d'autres capteurs pour optimiser la régulation du système, revoir le design des photobioréacteurs, etc. Une analyse rigoureuse pour déterminer les priorités à implanter devra être faite avant d'entreprendre ces améliorations, car plusieurs d'entre elles nécessitent des investissements importants.

Somme toute, le laboratoire présente désormais des protocoles d'utilisation fonctionnels capable de produire des microalgues en mixotrophie dans un environnement similaire à ce qui serait rencontré en industrie et ce, à relativement grande échelle.

CHAPITRE 4

CONCEPTION D'UN SYSTÈME D'APPLICATION DE BIO-INGRÉDIENT EN MILIEU INDUSTRIEL

4.1 CONTEXTE DE REALISATION

Les produits marins prêts à consommer (PMPAC), tels le saumon fumé et les crevettes saumurées sont des aliments de consommation ayant un vecteur de toxi-infections alimentaires très redoutées (FARBER, 1991). Par leur composition très riche en protéines, vitamines et sels minéraux, les PMPAC sont un environnement très favorable à la prolifération de plusieurs agents pathogènes. Beaufort (BEAUFORT, et al., 2007) estime que dans le monde, 15% à 40% des PMPAC sont contaminés à la *Listeria monocytogenes*. Au Canada, 0,3% à 0,9% du saumon et 13% des crevettes et crabes importés des États-Unis, du Chili et de la Norvège sont contaminés par *L. monocytogenes* (FARBER, 1991).

En 2008, la FDA publiait un guide décrivant plusieurs pratiques pour le contrôle de *L. monocytogenes* dans le secteur bioalimentaire (FDA, 2008). Différents procédés physico-chimiques ont ainsi été développés pour l'inactivation de ce pathogène dans différentes matrices alimentaires. La congélation, l'emballage sous vide ou sous atmosphère de CO₂ (FARBER, 2000) (NILSSON, et al., 1997) de même que des additifs chimiques tels que les nitrites, les sorbates et les lactates (HU & SHELEF, 1996) ont montré des effets inhibiteurs contre des bactéries pathogènes tel que *L. monocytogenes*.

Malgré leur efficacité, plusieurs de ces traitements s'appliquent difficilement à la production de saumon fumé : altération du goût et de la texture, effets négatifs sur la santé de quelques agents chimiques, difficultés technologiques de mise en application à une échelle industrielle. De plus, au Canada, la conservation du saumon fumé pose une problématique particulière dû à son faible niveau de sel combiné à l'utilisation d'emballage sous vide.

Depuis 2002, un consortium de chercheurs a démontré que l'application d'un bio-ingrédient à base de divergicine M35 sur des filets de saumon fumé présente un très fort potentiel d'utilisation comme agent de bio-conservation (FLISS, et al., 2010). Leur méthode consiste à inoculer les produits à conserver à l'aide de bactéries lactiques et d'utiliser leur métabolisme antimicrobien pour inhiber la croissance de micro-organismes non désirés. (Thairi, et al., 2009). Ce consortium de chercheurs regroupe le laboratoire de recherche du département des sciences des aliments et de nutrition de l'Université Laval, l'équipe de recherche du Dr Desbiens (MAPAQ-Gaspé) et l'entreprise Fumoirs Grizzly, Inc.

À la lumière de ces résultats, un projet de recherche a été mis sur pied afin de valider la faisabilité d'une production à grande échelle du bio-ingrédient et de son efficacité en milieu industriel. L'Université du Québec à Rimouski a donc été intégrée à ce consortium afin d'apporter son expertise en design et contrôle de systèmes industriels adaptés aux bioprocédés. Les objectifs spécifiques du projet de recherche sont :

- Mise au point d'un procédé de fermentation pour la production à grande échelle du bio-ingrédient à base de *Carnobacterium divergens*.
- Mise au point d'un procédé physique pour le séchage et la stabilisation à grande échelle du bio-ingrédient à base de *C. divergens*.
- Caractérisation physico-chimique et fonctionnelle et évaluation de la stabilité à l'entreposage du bio-ingrédient
- Développement du prototype pour l'application du bio-ingrédient
- Essais industriels pour l'évaluation du potentiel antimicrobien de bio-ingrédient à base de divergicine M35.

4.2 DEFINITION DU MANDAT POUR CE TRAVAIL DE RECHERCHE

Le mandat spécifique traité dans ce travail se limite au développement du prototype nécessaire à l'application du bio-ingrédient sur la chaîne de production. L'approche de développement utilisée sera la même que celle présentée au chapitre II.

Ainsi, les travaux consistent à identifier dans un premier temps les contraintes et limitations du projet pour ensuite trouver des technologies applicables et évaluer leur potentiel. Des essais de validation permettront de raffiner de plus en plus le design du système en validant les choix de concepts. Enfin, des essais finaux seront réalisés pour déterminer si le prototype répond aux spécifications cibles et aux besoins du client.

4.3 DEFINITION DES BESOINS ET DES SPECIFICATIONS

Afin d'implanter un prototype adéquat, les besoins relatifs à cet équipement doivent être clairement identifiés. Suite à deux nombreuses discussions avec les différents acteurs du projet, les besoins suivants ont été retenus :

Tableau 3 : Liste des besoins pour l'équipement d'aspersion

No	Besoin
1	Permet l'application du bio-ingrédient en quantité suffisante sur chacune des tranches produites afin de contrôler la prolifération bactérienne
2	Respecte toutes les normes alimentaires et de sécurité d'un équipement en milieu industriel
3	Convivialité d'utilisation pour les employés de production
4	Facile d'entretien

À partir de ces besoins et des résultats obtenus par l'équipe de l'Université Laval, il est possible d'identifier les spécifications cibles que doit avoir le prototype fabriqué :

Tableau 4 : Liste des spécifications pour l'aspersion

No	Spécifications	Dom. de var. acceptable
1.1	Chaque tranche devra recevoir au moins 1 mL de bio-ingrédients concentré à 1,8 g/L pour contrôler le développement bactérien.	1 mL / tranche
1.2	Taille des tranches	15 cm x 10 cm
1.3	Vitesse du convoyeur	4 tranches / seconde 1 à 1.5 m/s
1.4	Un dispositif devra confirmer l'application du bio-ingrédient sur chacune des tranches	[0,1]
2	Tous les matériaux et méthode utilisés pour la fabrication du prototype devra respecter les normes FDA et de la CSST	[0,1]
3.1	Le prototype occupera une surface de plancher d'au maximum	18" x 36"
3.2	Temps d'opération du système / heure de production	< 5 min
3.3	Le prototype devra minimiser les éclaboussures et les pertes de bio-ingrédient	[0,1]
4	Le temps de nettoyage maximum du système	< 5 min/jour

Il est important d'apporter quelques détails à trois de ces spécifications. Premièrement, la spécification 1.1 qui définit le volume et la concentration de bio-ingrédient à asperger sur chacune des tranches a été définie à partir de premiers essais en laboratoires. Ces deux paramètres doivent donc pouvoir être modulés en fonction des résultats obtenus sur la chaîne de production afin de pouvoir optimiser le procédé de conservation.

La spécification 1.4 qui précise qu'un dispositif devra confirmer l'application du bio-ingrédient sur chacune des tranches sera très difficile à réaliser avec le niveau de fiabilité souhaité. Dans un cas comme celui-ci, où la sécurité publique est un enjeu, un système en redondance de haute fiabilité devrait être implanté pour assurer une aspersion efficace du

produit. Pour ce prototype, un seul dispositif de confirmation sera mis en place afin de respecter le budget alloué.

Enfin, la spécification 3.3 qui évalue le niveau de perte de bio-ingrédient par éclaboussure sera également difficile à minimiser. En effet, les tranches circulent sur un convoyeur à bandes à une vitesse relativement élevée et le prototype devra administrer le bio-ingrédient à un débit suffisamment grand pour assurer le dépôt de la quantité désirée. Une solution qui devrait être évaluée lors de la phase de conception est de permettre au système d'asperger du bio-ingrédient uniquement lorsqu'une tranche de saumon se trouve sous le système d'aspersion.

En plus de ces contraintes techniques, il est également important de préciser que le budget accordé pour la réalisation de ce système était de 16 000 dollars.

4.4 CHOIX D'UNE TECHNOLOGIE, CONCEPTION ET ESSAIS DE RAFFINEMENT

À partir de la liste des spécifications identifiées, une première recherche de technologie adaptée aux besoins a été réalisée. Étant donné que le système doit opérer en conditions alimentaires, peu de choix de composants et de matériaux étaient disponibles selon les spécifications recherchées.

De plus, l'entreprise Fumoir Grizzly avait déjà ciblé l'endroit où le système d'aspersion devait être implanté sur la ligne de production, diminuant ainsi l'éventail des solutions possibles.

Ainsi, une buse et une pompe péristaltique ont été sélectionnées dans un premier temps. La buse a été sélectionnée avec un système de contrôle à modulation par largeur d'impulsion (MLI) permettant une aspersion par intermittence comme désiré dans la définition du problème. La pompe quant à elle a été sélectionnée pour répondre aux capacités de la buse

et pour sa grande facilité de nettoyage. Les capacités maximales du système seront donc un débit de 19,6 mL/s à une pression d'opération maximale de 35 psi.

Une fois ces deux éléments sélectionnés, différents essais devaient être réalisés afin d'identifier les prochains paramètres de conception. Ces essais avaient pour objectifs les éléments suivants :

1. Déterminer la hauteur optimale de la buse en fonction de la largeur du convoyeur et de la position des tranches de saumon.
2. Déterminer l'influence de la concentration en bio-ingrédient dans le liquide sur son écoulement et l'aspersion (viscosité).
3. Déterminer les paramètres opératoires pour l'aspersion en mode intermittent
4. Déterminer les paramètres opératoires pour l'aspersion en mode continu
5. Évaluer les dernières mesures de conception

Ces différents essais ont donc été réalisés du 26 septembre 2014 au 30 janvier 2015. Voici un résumé des manipulations effectuées et des résultats obtenus.

4.4.1 Hauteur optimale de la buse

Présentation de la méthode

La première étape des essais consiste à fixer de façon temporaire la buse au convoyeur et de déterminer la hauteur minimale nécessaire pour bien couvrir la zone « active » du convoyeur (*c.-à-d.* là où les tranches de saumon peuvent se retrouver).

Étant donné que les tranches de saumon ne tombent pas toujours au même endroit sur le convoyeur et que les dimensions des tranches ne sont pas toutes les mêmes, la hauteur de la buse peut être ajustée pour couvrir une zone d'aspersion plus ou moins importante.

Pour ce faire, les tests se sont déroulés directement sur la ligne de production chez Fumoir Grizzly. La buse fut positionnée pour asperger en continu du liquide sur le convoyeur et, de façon qualitative, avec l'expérience des employés de Fumoir Grizzly, la hauteur idéale de la buse fut déterminée.

Résultats obtenus

À la lumière des tests effectués, la largeur active du convoyeur a été fixée à environ 203 millimètres et la hauteur de la buse à 228 millimètres au-dessus du convoyeur.

4.4.2 Concentration du bio-ingrédient versus caractéristiques d'aspersion

Présentation de la méthode

En fonction de la concentration du bio-ingrédient, la viscosité du fluide varie et peut potentiellement influencer la façon dont s'écoulera ce dernier. Des essais sont donc réalisés pour vérifier si, autour de la concentration ciblée pour l'opération, les caractéristiques spatiales du débit aspergé pourraient varier en fonction de la concentration (débit, allure du jet et dispersion sur le convoyeur).

Des concentrations de bio-ingrédient de 1,8 g/L, 3,6 g/L et 7,2 g/L sont comparées au comportement de l'eau distillée. Il faut noter que selon les essais préliminaires du laboratoire de l'Université Laval, la valeur cible de la concentration du bio-ingrédient est de 1,8 g/L.

Pour chacune des concentrations, six échantillons recevant chacun 4 cycles d'aspersion réglés à 0,10 seconde de temps d'aspersion et 0,20 seconde de temps d'attente, alimentés avec une pompe tournant à une vitesse de rotation de 500 RPM sont recueillis.

Résultats obtenus

Le tableau 3 présente la moyenne (μ) des échantillons recueillis et l'écart-type (σ) sur les données. Les résultats démontrent que la viscosité du liquide avec les concentrations de bio-ingrédient visées ne semble pas influencer son débit. De plus, l'allure du jet et sa dispersion semblent être demeurées constantes.

Tableau 5 : Quantité aspergée (mL) en fonction de la concentration du liquide (g/L)

Fluide	Quantité (mL)	
	μ	σ
Eau	8,83	0,37
Bio-ingrédient 1,8 g/L	8,75	0,10
Bio-ingrédient 3,6 g/L	8,63	0,15
Bio-ingrédient 7,2 g/L	8,80	0,18

4.4.3 Mode de fonctionnement par intermittence

Présentation de la méthode

Le mode intermittent permet théoriquement d'asperger du bio-ingrédient uniquement lorsqu'une tranche de saumon se trouve sous la buse. Ainsi, il serait possible de limiter les éclaboussures et donc les pertes de bio-ingrédient. Les présents tests sont faits pour déterminer le volume de bio-ingrédient aspergé en fonction des caractéristiques temporelles du débit d'aspersion et des paramètres d'opération de la pompe. Selon des estimations préliminaires, la durée de passage d'une tranche de saumon sous la buse est d'environ 0,10 seconde.

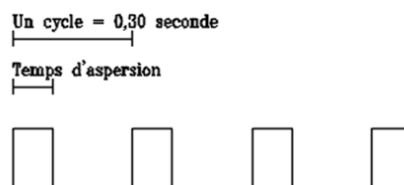


Figure 9 : Schéma d'aspersion par intermittence

Pour caractériser adéquatement le système, trois temps d'aspersion sont donc évalués : 0,05 seconde (temps de passage limitant au maximum les éclaboussures), 0,10 seconde (temps de passage théorique d'une tranche) et 0,20 seconde (double du temps de passage d'une tranche). Le temps sans aspersion a été ajusté pour que le temps entre chaque tranche de saumon (un cycle) soit de 0,30 seconde.

Deux séries d'essais seront réalisées : la première utilisera la pompe péristaltique à des vitesses de rotation entre 400 et 600 RPM. La seconde série d'essais sera réalisée en utilisant deux têtes de pompe à la fois, à des vitesses de rotation entre 300 et 600 RPM. Ces choix de vitesses visent à définir les paramètres d'utilisation qui respectent les débits d'utilisation prescrits de la buse.

Pour chacun des tests, la buse asperge du liquide dans six récipients en aluminium de 8 cm x 18 cm. Le volume est ensuite recueilli et mesuré à l'aide d'un cylindre gradué de 10 mL. La moyenne et l'écart-type des résultats obtenus sont reportés dans le tableau 4.

Résultats obtenus

Le tableau 6 présente l'ensemble des résultats obtenus en mode intermittent.

Tableau 6 : Moyenne (μ) et écart-type (σ) des échantillons recueillis (mL / tranche)

	RPM	Aspersion/arrêt		Aspersion/arrêt		Aspersion/arrêt	
		0,05 / 0,25		0,10 / 0,20		0,20 / 0,10	
		μ	σ	μ	σ	μ	σ
Une pompe	400	0,91	0,05	1,77	0,15	2,93	0,16
	500	1	-	1,95	0,05	3,97	0,41
	600	1	-	2,03	0,10	3,70	0,55
Deux pompes	300	0,82	0,04	1,78	0,08	-	-
	400	0,98	0,04	1,92	0,22	3,32	0,36
	500	1	-	2,02	0,04	4,04	0,05
	600	1	-	-		4,48	0,22

La durée estimée d'aspersion de chaque tranche de saumon est d'environ 0,10 seconde. Selon les essais effectués, cela laisserait le temps d'asperger sur chaque tranche environ 1,77 mL de bio-ingrédient avec une pompe à 400 RPM. Bien sûr, tout cela en prenant pour compte que la tranche occupe 100% de l'espace sous la buse.

Cette vitesse de rotation est préférée des autres, car, selon les spécifications de la pompe, il faut limiter la pression dans le système à 35 psi. Or, le débit de la buse à cette pression peut être estimé à environ 1,96 mL par 0,10 seconde comme présenté à la section sur les spécifications du système.

Selon les résultats recueillis, une seule pompe devrait suffire pour atteindre un volume d'aspersion suffisant pour permettre une bonne application de bio-ingrédient.

Notons toutefois que lors des essais réalisés, tout le bio-ingrédient aspergé durant 0,10 seconde a été recueilli. Il serait prudent de tenir compte des pertes de liquide possibles en cours d'opération et des erreurs d'estimation de la vitesse du convoyeur et du temps de passage d'une tranche. Des essais subséquents lors de la phase d'implantation pourront venir confirmer ces données si le mode d'aspersion en intermittence est sélectionné.

4.4.4 Caractéristiques d'aspersion en mode continu

Présentation de la méthode

En mode continu, la buse injecte sans arrêt du bio-ingrédient sur le convoyeur. Les présents essais sont réalisés afin de déterminer les paramètres d'aspersion du système dans ce mode d'opération, dans l'éventualité où il ne serait pas possible d'interfacer le système d'aspersion avec la ligne de production actuelle (détection des tranches).

Pour caractériser le comportement du système selon ce mode, trois essais sont réalisés avec une pompe tournant à 400, 500 et 600 RPM. La buse injecte alors du liquide en continu pendant 30 secondes dans un bécher de 1000 mL. Trois essais sont réalisés pour chaque vitesse de rotation aux fins de validation statistique des résultats.

Ces résultats seront ramenés sur une durée de 0,10 seconde d'aspersion afin de les comparer avec les autres conditions d'essai.

Résultats obtenus

Tableau 7 : Moyenne (μ) du volume recueilli (mL) et leur écart-type (σ)

Échantillon	Vitesse de la pompe		
	400 RPM	500 RPM	600 RPM
1	400	500	600
2	400	500	600
3	400	500	600
μ	400	500	600
σ	0	0	0
Quantité moyenne aspergée en 0,10 s (mL)	1,33	1,67	2,00

Pour l'aspersion en continu, la vitesse de la pompe qui ne dépasse pas le débit maximal de 1,96 mL par 0,10 seconde tout en conservant une certaine marge de sécurité est 500 RPM.

Les écarts types des données sont nuls, car un bécher de 1000 mL a été utilisé pour recueillir le volume aspergé pour chaque essai. Étant donné la grande précision de la pompe et la grande incertitude de l'instrument de mesure utilisé (graduation au 100 mL), il n'était pas possible de quantifier un écart entre les données.

Pour les mêmes raisons que celles expliquées au point précédent, la quantité de bio-ingrédients aspergée sur une tranche de saumon se situe probablement en dessous des valeurs recueillies lors ces essais.

Des essais préliminaires sur le convoyeur de la chaîne de production avaient permis d'estimer la quantité aspergée à environ 1 mL par tranche pour une vitesse de 500 RMP.

4.4.5 Évaluer les dernières mesures de conception

Une évaluation globale du système est faite lors de la réalisation de ces tests pour détecter tout comportement non pressenti lors des phases de conception. En plus de différentes mesures nécessaires pour terminer la conception du système, différents constats ont pu être tirés :

Lors de la production, la cadence imposée par la trancheuse est trop rapide pour synchroniser manuellement un cycle intermittent sur l'appareil. En effet, avec une tranche toute les 0,3 seconde, il est pratiquement impossible de démarrer le cycle d'aspersion au bon moment. Il faudrait donc intégrer des capteurs sur le convoyeur pour détecter la présence des tranches de saumon et déclencher le cycle d'aspersion ou encore interfacier le système directement avec la trancheuse.

Bien qu'un capteur optique soit prévu à la sortie de la buse pour valider l'aspersion du bio-ingrédient, le système n'est pas en mesure de quantifier la quantité exacte aspergée sur chacune des tranches. Il faudra donc assurer la fiabilité du système après la phase d'implantation.

Étant donné la cadence relativement rapide du système, il est préférable de viser asperger un plus petit volume de bio-ingrédient à une concentration plus élevée pour s'assurer que les tranches reçoivent la bonne quantité de bio-ingrédients en soi. De plus, cela permettrait de limiter l'espace d'entreposage et d'espacer les remplissages du réservoir de bio-ingrédient.

Il faut inclure dans l'automatisation du système une séquence d'opération qui limite la pression dans le circuit si l'option d'aspersion en alternance est privilégiée. En effet, lors des essais, il est arrivé que la pompe soit demeurée en fonction sans que la buse soit activée. Après quelques minutes, le tuyau d'alimentation s'est déchiré sous le mouvement de la pompe. L'un des meilleurs moyens serait de démarrer la pompe uniquement lorsque la buse est active. Pour ce faire, il devient primordial de détecter la présence de saumon à une

distance suffisamment grande de la buse pour laisser le temps au système de démarrer avant l'arrivée des premières tranches.

4.4.6 Conclusion et recommandations suite aux essais

Voici en résumé, la liste des constats tirés des essais.

- La mesure finale de la hauteur de la buse a été fixée à 228 millimètres.
- En mode intermittent, selon les hypothèses posées, la quantité de bio-ingrédients aspergée sur une tranche de saumon devrait être inférieure à 1,77 mL
- En mode continu, la quantité de bio-ingrédients aspergée sur une tranche de saumon devrait être inférieure à 1,67 mL.
- Pour une concentration de bio-ingrédient comprise entre 1,8 g/L et 7,2 g/L, le système ne présente pas de différences significatives au niveau de l'écoulement et de l'aspersion du bio-ingrédient.
- Si le système est utilisé en mode intermittent, il doit obligatoirement être interfacé avec la trancheuse ou détecter la présence de saumon rapidement pour éviter tout décalage entre le système et la ligne de production actuelle.
- La fiabilité du système doit obligatoirement être validée sur une longue période d'utilisation pour s'assurer que chaque tranche de saumon reçoit une quantité adéquate de bio-ingrédients.
- La concentration finale du bio-ingrédient et le mode d'aspersion du prototype (intermittent ou continue) devront être validés lors de la phase d'implantation du système.

4.5 CONCEPT FINAL

Les résultats obtenus à la phase précédente ont permis de réaliser la conception du système. Après de nombreuses itérations et raffinement de concepts, le prototype final a été fabriqué. La figure 10 présente le système dans son ensemble et les plans de fabrication mécanique et électrique sont présentés à l'annexe I et l'annexe II.



Figure 10 : Système d'aspersion lors des essais de validation

Le système est supporté par un charriot fabriqué sur mesure en acier inoxydable de type 316 capable de supporter le poids du réservoir de 110 litres assurant ainsi une autonomie du système à plus de trois heures d'opération en continu. Sur le côté du réservoir, deux capteurs de niveau sont installés et couplés à un système de témoins lumineux pour indiquer

aux opérateurs quand le réservoir doit être rempli ou arrêter l'ensemble de la chaîne de production dans le cas échéant. Le charriot supporte également la pompe et les boîtiers de contrôle nécessaires à l'opération du système.

Sur le convoyeur, un support spécialement conçu est installé pour supporter la buse. Un système anti-éclaboussure et un bac de récupération sont également installés sur le système.

4.6 ESSAIS DE VALIDATION

Des essais de validation ont été réalisés au mois de février 2016 afin de valider si le système d'aspersion est en mesure de pulvériser suffisamment de bio-ingrédients sur les tranches de saumon afin d'augmenter leur durée de conservation.

Lors de ces essais, la concentration du bio-ingrédient a été fixée à 2,81 g/L et la vitesse de la pompe à 400 RMP avec un mode d'aspersion en continu. Ce mode a été préféré à celui par intermittence, car le but de ces essais était de valider le projet dans son ensemble et non de définir les meilleures conditions d'opération possible. Il faut noter également que la concentration du bio-ingrédient a été relevée de 1,8 g/L à 2,81 g/L afin de couvrir les pertes de liquide lors de l'aspersion et d'assurer toujours une quantité suffisante de bio-ingrédient sur chaque tranche de saumon fumé.

Sur la chaîne de production de Fumoir Grizzly, le saumon fumé a été tranché, puis aspergé de bio-ingrédient avant d'être emballé. Les tranches de saumon ont par la suite été transportées dans les laboratoires de l'Université Laval où elles ont été déballées puis inoculées avec 150 µL d'une suspension bactérienne de *L. monocytogenes* LSD 530 à $1,5 \cdot 10^5$ ufc/mL (concentration finale de 10^3 ufc/g de saumon). Les tranches de saumon ont par la suite été réemballées sous vide dans le même type d'emballage que précédemment.

Un échantillonnage quotidien sur 21 jours d'incubation a permis de démontrer que l'ajout de bio-ingrédient a contrôlé la population de *L. monocytogenes* dans différents cas de conservation.

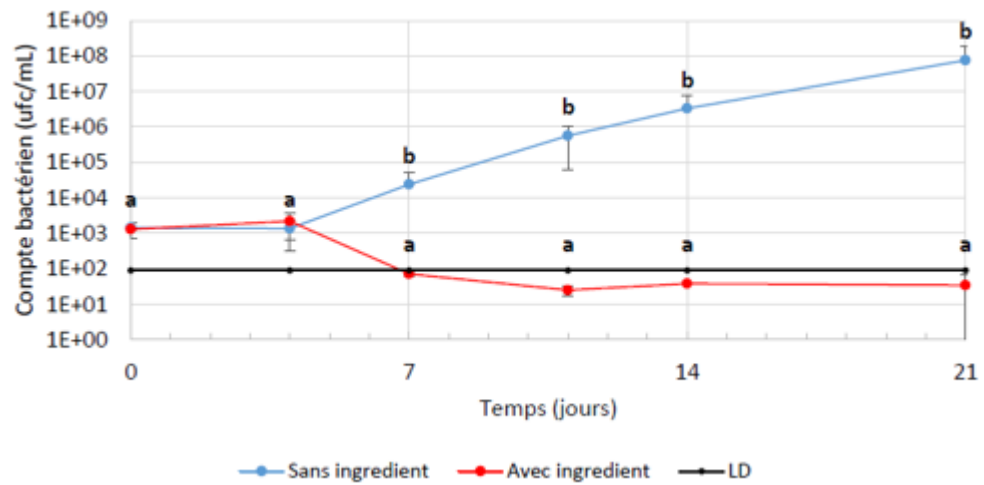


Figure 11 : Croissance de *L. monocytogenes* LSD530 en présence (rouge) ou en absence (bleu) du bio-ingrédient à base de *C. divergens* M35 dans les lots de saumon stockés pendant 21 jours à 4 °C

Source : (FERNANDEZ & FLISS, 2016)

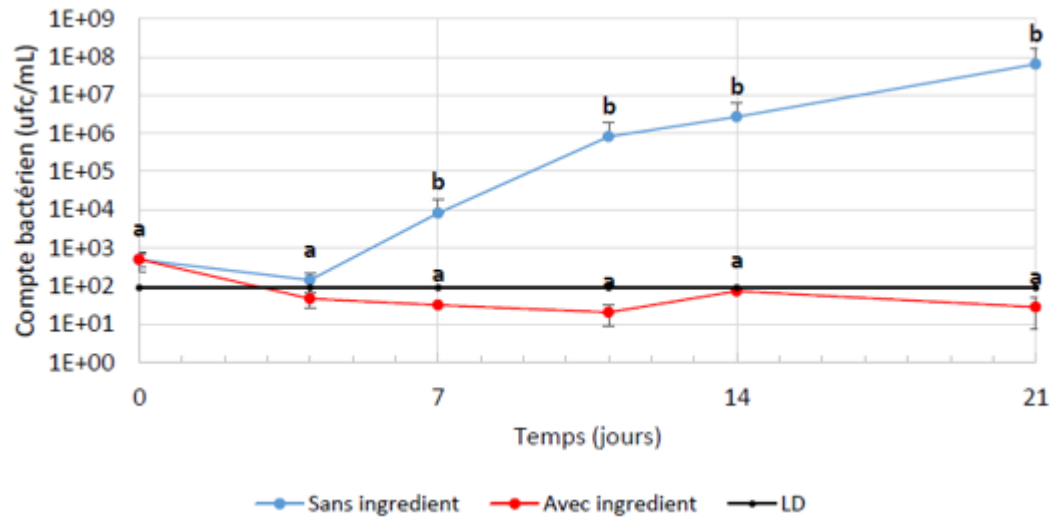


Figure 12 : Croissance de *L. monocytogenes* LSD530 en présence (rouge) ou en absence (bleu) du bio-ingrédient à base de *C. divergens* M35 dans les lots de saumon stockés pendant 7 jours à -20 °C puis 14 jours 4 °C

Source : (FERNANDEZ & FLISS, 2016)

4.7 RETOUR SUR LES SPECIFICATIONS

Après validation, il est possible d'affirmer que suffisamment de spécifications cibles identifiées lors de la phase de développement de concepts sont respectées avec le prototype proposé pour valider la réussite du projet :

- Les tranches de saumon reçoivent suffisamment de bio-ingrédients pour contrôler la prolifération bactérienne.
- Un dispositif confirme l'application de bio-ingrédient
- Tous les matériaux et méthodes sont conformes avec la FDA et la CNSST

- Le prototype occupe une surface de plancher d'exactly 48 pouces par 20 pouces ce qui légèrement supérieur à l'espace prévu (18 pouces x 36 pouces). Cependant, l'endroit prévu pour intégrer le prototype à l'aire de production et conservé et aucun réarrangement d'usine ne sera nécessaire. L'impact du non-respect de cette spécification est donc très faible.
- Le temps d'opération du système demeure inférieur à 5 min par heure de production.
- Les pertes de bio-ingrédient en cours de production sont relativement faibles
- Le temps de nettoyage du système est également inférieur à 5 min par jour. Le choix des matériaux et des composants du système lors du design permet l'atteinte de cette spécification.

Bien que les éclaboussures et les pertes de bio-ingrédient lors de l'aspersion en mode continu étaient relativement faibles, le mode d'aspersion en intermittence aurait sans doute permis de limiter ces pertes. Cependant, ce mode d'aspersion n'a pas été validé lors des essais finaux puisque des capteurs de détection des tranches de saumon auraient été nécessaires à l'entrée du système d'aspersion et le budget ne permettait pas l'achat de tels capteurs.

4.8 VALIDATION DES BESOINS ET SUITES AU PROJET

Suite aux essais de validation réalisés sur la chaîne de production de l'entreprise Fumoir Grizzly, trois des quatre besoins identifiés lors des premières phases de conception ont pu être évalués. Le tableau 8 présente le résultat de cette évaluation.

Tableau 8 : Évaluation des besoins pour l'équipement d'aspersion

No	Besoin	Évalué	Conforme
1	Permettre l'application du bio-ingrédient en quantité suffisante sur chacune des tranches produites afin de contrôler la prolifération bactérienne	X	X
2	Respecte toutes les normes alimentaires et de sécurité d'un équipement en milieu industriel	X	X
3	Convivialité d'utilisation pour les employés de production		
4	Facile d'entretien	X	X

Le seul besoin qui n'a pu être évalué est celui qui présente la convivialité d'utilisation du système pour les employés de production. Ce besoin n'a pu être évalué, car le procédé d'aspersion est en cours d'approbation par Santé Canada et ne peut donc pas encore être implanté sur une production destinée à la consommation humaine. Ainsi, des essais avec des conditions réelles d'utilisation par des employés réguliers de production n'ont pu être réalisés. Toutefois, les observations faites lors des essais finaux laissent entrevoir des résultats satisfaisants dans l'évaluation de ce besoin.

Les prochaines étapes à franchir dans le développement de ce système seront d'évaluer le prototype en cours de production et procéder aux ajustements nécessaires pour améliorer ses performances. Afin d'assurer les critères au niveau de la santé publique, un système de redondance sur la confirmation de l'aspersion sur les tranches de saumon fumé devrait être implanté et validé par les autorités concernées. Enfin, s'il s'avérait nécessaire de limiter les pertes de bio-ingrédient par éclaboussures, des capteurs de détection de tranches de saumon pourraient être installés à l'entrée du système. Bien entendu, d'autres essais de validations seront sans doute nécessaires afin de valider si chaque tranche de saumon fumé reçoit suffisamment de bio-ingrédients pour contrôler la contamination bactérienne avec une aspersion en intermittence.

CHAPITRE 5
PROTOCOLE DE MISE EN CULTURE EN MIXOTROPHIE ET
DISPONIBILITE DES NUTRIMENTS DANS LE MILIEU
EXTRACELLULAIRE POUR CONTROLER LA CROISSANCE
BACTERIENNE

5.1 PRESENTATION DE L'ARTICLE

Ce chapitre présente l'article publié par Jean-Sébastien Deschênes, Alexandre Boudreau et Réjeau Tremblay (DESCHENES, et al., 2015) dans la revue Algal Research en avril 2015 sur les premiers résultats obtenus avec les travaux réalisés au chapitre III. Ces travaux avaient pour objectif principal de définir une stratégie de culture afin d'augmenter le rendement des systèmes de production de microalgues en passant de l'autotrophie à la mixotrophie en conditions industrielles tout en limitant la contamination bactérienne.

Mes travaux ont porté principalement sur le développement conjoint du protocole d'expérimentation, la réalisation des travaux, l'analyse et l'interprétation des résultats.

Mixotrophic Production of Microalgae in Pilot-Scale Photobioreactors: Practicability and Process Considerations

Jean-Sébastien Deschênes*, Alexandre Boudreau, Réjean Tremblay

Université du Québec à Rimouski, 300 allée des Ursulines, Rimouski (Québec)

Canada, G5L 3A1

*Corresponding author: jean-sebastien_deschenes@uqar.ca

Abstract

The practicability of culturing microalgae in mixotrophic mode is evaluated for pilot-scale photobioreactor systems, as a general consideration for new process development: higher biomass production rates, production of (potentially new) high-value products from algae and the transformation (recovery) of other carbon sources are the typical advantages of this production mode. This study is conducted with *Scenedesmus obliquus*, a specie known for its ability to assimilate a wide variety of carbon sources. Autotrophic experiments are first conducted to obtain the typical behavior (growth curve and nutrient consumption rates) of the alga in standard medium composition. Mixotrophic experiments then follow: aside from productivity aspects, results show that bacterial contaminations can remain an issue at this scale, even for closed systems such as photobioreactors. It is however shown possible to exploit some intrinsic dynamic properties of the algae to limit bacterial growth, with no significant impact on algal growth and biomass productivity. Anionic analyses on the mixotrophic cultures show that particular attention should be drawn on the phosphate and sulfate ions for further process optimization.

Keywords (5): mixotrophic growth, microalgae, bacterial contamination, feeding strategy, pilot-scale photobioreactor.

1 INTRODUCTION

An important bottleneck for the industrial advent of new bioprocesses using microalgae is tied to productivity [1, 2]. Economically viable industrial productions of microalgae have yet only been realized for a limited number of (high-value) products and microalgae species [3, 4] in open systems and photoautotrophic mode [2, 3]. As a way to increase productivity,

addition of an organic carbon source has often been shown effective [5, 6]. However, this introduces a high risk of contamination by competing organisms (especially bacteria), thus require such cultivation to take place in a more controlled environment (closed systems) such as a photobioreactor or fermenter. These systems allow a broader range of microalgal species to be cultured [4, 7, 8], thus enhancing the possibilities for new bioprocesses using microalgae: note that this is considered in a very general (non-limitative), for any product potentially obtained from algae (which may or may not include biofuels).

Mixotrophic mode of cultivation for microalgae has received increased attention recently [9, 10, 11, 12]. In this mode, a dissolved organic carbon (DOC) source is supplemented in addition to inorganic carbon (photosynthesis) for growth. Compared to strict heterotrophic growth (on a DOC source in the absence of light), mixotrophic growth still allows CO₂ capture, which is normally the primary interest for the use of algae in a bioprocess [12]. In comparison to the autotrophic case, the presence of the DOC source reduces the culture's dependency on the lighting conditions [3, 9, 10], thus allowing for larger photobioreactor vessels to be used, further supporting scale-up. In addition, for many algae, the mixotrophic biomass productivities are at least equal to those obtained in heterotrophy [13] or greater [3, 12, 14], as the metabolic pathways involved may operate in some kind of symbiotic effect [12]. Compared to strict autotrophy, productivities are often increased by a factor of 5 to 10 [9, 13], making it a highly efficient means of producing microalgal biomass. Since photobioreactors allow a further 10-fold increase in productivity when compared to open (raceway) pond systems [3], comparable productivities can already be obtained using 100 times smaller volume photobioreactor. Thus, a 1.2 million liters raceway system could be replaced with a 12,000 L photobioreactor, which is an attainable size for photobioreactors. Such reduction in size with similar productivities could also make photobioreactors cost-competitive with those field applications, with a better control over the process.

This paper addresses a first practical study for the mixotrophic production of microalgae in pilot-scale photobioreactors with particular focus on bacterial contaminations

and anionic concentrations in the extracellular medium. Note that no particular products are discussed in this paper (not even biofuels), such that the scope of this study is not limitative. Since the paper is strictly about these two process considerations, an artificial light source is used (to minimize fluctuations on the available light intensity through time and thus eliminate this as a factor of variation) and the selected (model) carbon source is glucose: this DOC source is easily assimilated by both the algae and bacteria, and is already known to significantly increase the biomass yield and productivity of microalgae cultures. The objectives of this paper are to evaluate the practicability of implementing mixotrophic growth in pilot-scale photobioreactors (based on contamination issues), and to survey the main ionic contents in the media through time during their operation. We will test the hypothesis that mixotrophic cultures can be implemented at this scale while controlling the contamination through management of the extracellular medium composition. The results of this study could easily be extended to other substrates more appropriate for industrial use, natural light sources and other factors. The specie *Scenedesmus obliquus* used for this study is of particular interest for mixotrophic cultivation since it can assimilate quite a wide variety of DOC sources [14, 15, 16, 17, 18, 19]. The presence of bacteria will be regarded here as undesirable: although they can induce higher specific intracellular contents in algae (see e.g. [20]), they may also increase bio-fouling problems and cause acid formation [20] which would become major issues in large scale systems. Also, as algae can hardly compete with heterotrophic bacteria for DOC sources in a replete environment (see e.g. [21]), more active and original methods (as in this study) have to be investigated.

The paper is organized as follows: details pertaining to the preparation and sterilization of the photobioreactors are presented to show the level of precautions taken. Autotrophic cultures are then conducted to obtain the typical growth curve and nutrient consumption rates in standard medium composition. Mixotrophic cultures are implemented based on this information and compared with the latter: the first run aims to validate its proper operation, while monitoring the bacterial load. The second aims to test a means of control over this

bacterial load. Ion and glucose concentrations for these two (mixotrophic) cultures are last obtained and discussed.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 CULTURE MAINTENANCE AND INOCULUM PREPARATION

The strain *Scenedesmus obliquus* was obtained from the Canadian Phycological Culture Center in Waterloo, Ontario, Canada (CPCC 5). Cultures were kept in heat-sterilized (121 °C, 15 min.) Bold's Basal Medium (BBM) adjusted to pH 6.8 [22]. Seed cultures were maintained in exponential growth phase in Erlenmeyer flasks and incubated at 22.5°C with continuous orbital agitation (120 rpm) and continuous illumination ($100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) in a Multitron II incubator (*Infors-HT, Switzerland*).

2.2 PILOT-SCALE PHOTOBIOREACTOR SYSTEM

The photobioreactors are an adapted (for research) reduced-height, single-column version of an industrial 300 L model [23]. Despite their relatively small volume (27 L), they have all the same pilot-scale characteristics as the original system due to their physical size and material composition which do not allow them to be autoclaved. They are cylindrical bubble-columns of 135 cm in height, 18 cm diameter, 27 L working volume, with acrylic glass walls (through which ports for pH and dissolved oxygen sensors were specifically designed) and high-density polyethylene (HDPE) base (with drain valve and gas input for bubbling) and cover (with accesses for culture sampling, gas evacuation and inoculation and nutrient addition) (Groupe PolyAlto, Québec, Canada). Illumination is provided on two opposite sides of the photobioreactor using two 54 W T5HO fluorescent tubes on each side, resulting in a $140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ constant light intensity measured on these two outer surfaces. Mettler-Toledo pH (InPro 3253) and dissolved oxygen (InPro 6800) probes are used to monitor these variables. Gaseous flows are regulated by mass flow controllers (GFC 17, Aalborg, New York, USA), where CO₂ is modulated to maintain a fixed pH set-point. A CompactLogix L32E Industrial Controller (Allen-Bradley, Rockwell Automation,

Milwaukee, WI, USA) is used to manage these variables and communicate with a computer via Ethernet to record the data. Growth experiments were done at the Station aquicole de Pointe-au-Père (Rimouski, QC, Canada; N 48°30'51", W 68°28'06") of the Institut des sciences de la mer de Rimouski during the summer of 2013.

2.3 BACTERIAL COUNTS AND QUANTIFICATION

Axenic culture conditions were confirmed under reception of the culture and at different moments during the experiments as follows: samples were fixed with glutaraldehyde (0.1 % v/v) and analyzed using an Epic Altra flow cytometer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, BC, CA) fitted with a 488 nm laser operated at 15 mW, with a flow rate of 60 microliters per minute. Data were analyzed with the Expo32 v.1.2b software (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Heterotrophic bacteria were quantified in diluted samples stained with SYBR Green I nucleic acid binder (Molecular Probes Inc., OR, USA), and they were separated according to their nucleic acid content (LNA and HNA for low and high nucleic acid, respectively) [24].

2.4 CHEMICAL STERILIZATION USING HYDROGEN PEROXIDE

Model bacteria *Escherichia coli* was inoculated in 96-well plates under different conditions of hydrogen peroxide concentrations (0.01%, 0.05% and 0.1%) and two different medium compositions: (i) lysogeny broth (LB) and (ii) BBM + 30 g L⁻¹ glucose. 10 µL of *E. coli* suspension culture (10⁹ cells mL⁻¹ concentration) were added to 200 µL total volume wells (~5×10⁷ cells mL⁻¹ inoculation concentration). Each condition was implemented in at least six wells ($n = 6$) for statistical validation and to account for potential pipetting errors. Spectrophotometric measurements at 600 nm were taken every minute over nearly 24 hours using SpectraMax 190 UV-Vis Microplate Spectrophotometer (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) to monitor bacterial growth. *E. coli* cells were previously adapted to grow at 30°C and they were kept at this temperature inside the spectrophotometer for the duration of the experiment.

2.5 HYDROGEN PEROXIDE NEUTRALIZATION

Neutralization of hydrogen peroxide was tested with different concentrations of catalase from bovine liver (Sigma-Aldrich, C1345, 2000-5000 U mg⁻¹) in BBM + 30 g L⁻¹ glucose media with 0.05% hydrogen peroxide. The neutralization reaction kinetics were followed using continuous spectrophotometric measurements at 240 nm in 1 cm cuvettes with a UV-6300PC spectrophotometer (VWR, Radnor, PA, USA).

2.6 AUTOTROPHIC EXPERIMENT

Autotrophic growth curves were obtained in sequential photobioreactor experiments (using all four photobioreactors available) until the stationary growth phase was obtained. The pH was maintained at 7.50 throughout the experiment. Cultures were inoculated (or diluted) at 1×10^6 cells mL⁻¹ at day 0 of the experiments, and were sampled on days 1, 3, 5 and 7 for cell counts, dry weight determination and ionic analyses. Cell counts were done using a Z2 Coulter counter (Beckman, Mississauga, Canada), taking the average result of at least three measurements in diluted samples. Culture samples of 45 mL were also taken daily and centrifuged for separating the biomass and the supernatant. Cells were washed twice with distilled water to remove excess salts, sugars or any component that could influence the measurement of the dry weight. The supernatant and the cells were then stored separately at -80°C for later analysis. Dry weights were quantified by precisely weighting the centrifuge tubes (± 0.1 mg) before sampling and after freeze-drying the algae over 48 hours (Freezone 6 system, Labconco, Kansas city, MO, USA). Ion measurements were done using an ion chromatography system (Dionex ICS-1000, Thermo-Scientific, Sunnyvale, CA, USA) with AS40 automated sampler. The apparatus was calibrated before every usage with standard solutions in the concentration range of the samples that were to be analysed.

2.7 MIXOTROPHIC EXPERIMENTS

Cultures were started in autotrophic mode in BBM medium until a concentration of at least 10×10^6 cells mL^{-1} was attained before adding glucose. Additional nitrate (NaNO_3) as well as glucose were fed to the cultures in different quantities at different time intervals with the objective of maintaining growth as long as possible. Glucose concentration in the media was analyzed periodically using a glucose (HK) assay kit (GAHK20-1KT, Sigma-Aldrich) and spectrophotometric measurements at 340 nm in 1 cm cuvettes using a fixed wavelength DU640 UV-visible spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, BC, CA). These cultures were maintained for nearly 20 days. One first run using only two photobioreactors was conducted to quickly validate proper system operation and monitor the bacterial load, while a second run (using all four photobioreactors in two different conditions, $n = 2$) was conducted to evaluate a possible mean of controlling this bacterial load. Measurements of ion concentrations were realized after both mixotrophic runs were completed following the same method as described in section 2.6. Glucose measurements were also done at that time.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 STERILIZATION USING HYDROGEN PEROXIDE

Bacterial growth occurred in both control conditions (LB and BBM + glucose media without hydrogen peroxide) and in all LB wells with 0.01% H_2O_2 . Control conditions showed that the BBM + 30 g L^{-1} media was less supportive of bacterial growth (0.7115 ± 0.0491 Abs) than LB (0.8420 ± 0.0233 Abs) (based on absorbance measurements in the stationary phase), which might explain why some BBM + 30 g L^{-1} glucose + 0.01% H_2O_2 wells did not exhibit bacterial growth. All wells containing either 0.05% and 0.1% H_2O_2 , showed a continual decrease in absorbance throughout the experiment. The most rapid drop was observed during the first 45 minutes (approximately), which is probably when cell death occurs [25]. A 0.05% H_2O_2 concentration appears to be the best trade-off among the concentrations tested: this concentration is also known to be efficient for eliminating many bacterial species in less than 24 hours [25].

3.2 HYDROGEN PEROXIDE NEUTRALIZATION AND PHOTOBIOREACTOR PREPARATION

The spectrophotometric kinetic experiment was conducted to quickly determine sufficient amounts of catalase necessary to neutralize the hydrogen peroxide in less than 30 minutes as an exceptional precautionary measure in the preparation of the photobioreactors. Due to the cost of the enzyme, this is not a realistic industrial possibility, and since the test result is specific to the enzyme used, it is of no further interest for this study. Thus, the following protocol was used for photobioreactor sterilization and preparation: the systems were filled (including all feed and exit lines) with UV-treated ultrafiltered water with 0.05% H₂O₂, and left as such for 24 hours. The same was done for the concentrated culture media (0.05% was added and it was left for 24 hours). Then, the bioreactors were partially emptied (while carefully ensuring that no contaminated air entered the system using 0.2 μm air filters) and replaced with the concentrated culture media. Catalase was then added and left to act for 30 minutes before inoculating with the algae. An alternate method (after the 24 hour period of H₂O₂ action in the reactor) would be to almost completely flush the reactor contents, then fill it with UV-treated ultra-filtered water, flush it again, and fill it for the last time with the sterile water and concentrated media (through any sterilization method) before inoculating with the algae.

3.3 AUTOTROPHIC EXPERIMENT

Two growth curves were obtained over 7 days (on all four available photobioreactors) until the stationary phase was reached based on immediate cell counts. Samples were taken from the reactors for the later determination of the dry weights (g L⁻¹ of biomass) and ion concentrations. Fig. 1 shows the cell counts and the dry weights for days 1, 3, 5 and 7 of the growth phase. During the first sequence, a problem occurred with the pH and DO probes of photobioreactor # 2 and its data was considered unusable. The problem was then corrected and it was re-inoculated in time for the second sequence. Growth curve # 1 was thus based

on the data from the three other photobioreactors ($n = 3$), while growth curve # 2 was based on all four replicates ($n = 4$).

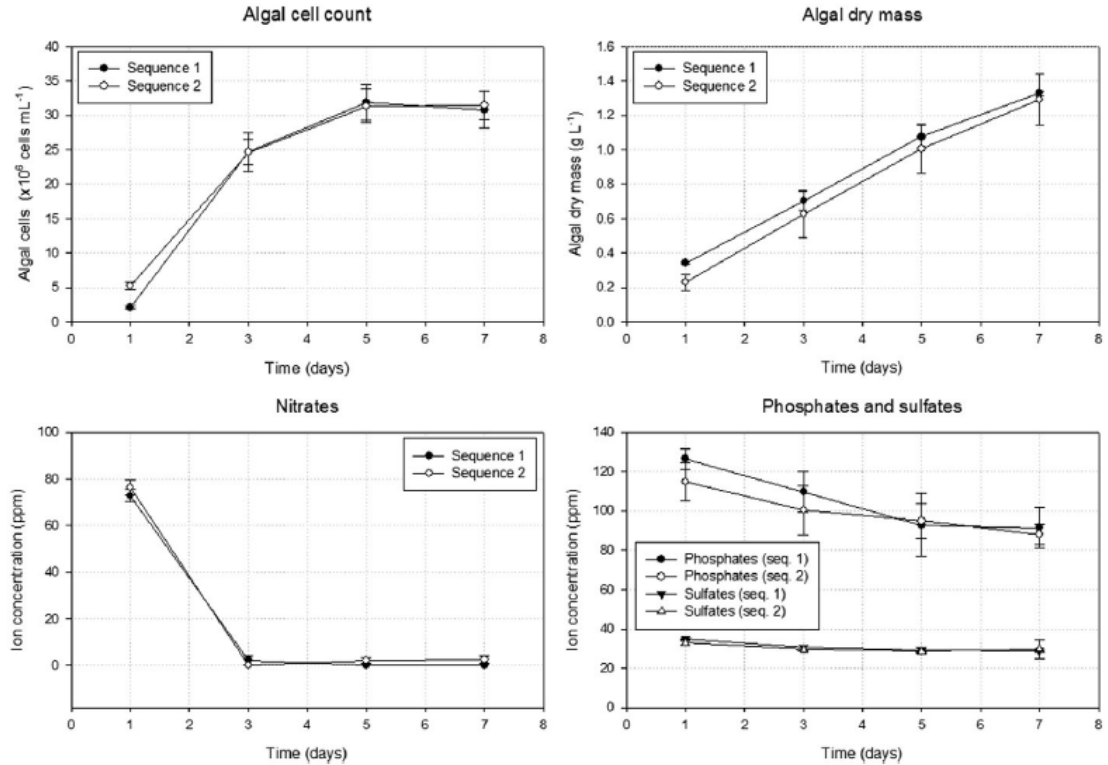


Fig. 1. Biomass and main ion concentrations for the autotrophic growth trials (error bars represent standard deviation, $n = 3$ for sequence 1, $n = 4$ for sequence 2).

Results show similar results for the cell counts (around 30×10^6 cells mL⁻¹) of the stationary phase in both experiments with rather small variations from one bioreactor to another. Dry weights maintain a steady increase after the stationary phase is reached, which probably corresponds to an energy reserve (either in the form of lipids or starch) enrichment phase. Again, the curves are very similar for all photobioreactors. Ionic measurements show that nitrates are quickly consumed, while the other nutrients (*e.g.* phosphate and sulfate) remain largely in excess during the stationary phase. Fig. 1 also shows the nitrate ion concentration (other nitrogen forms were negligible) and the phosphate and sulfate ion concentrations in the two experiments. All nitrogen is consumed from the media somewhere between day 1 and day 3: although a straight line is present between the two points, the nitrogen could as well have been depleted somewhere in between (this would have to be

verified in a future work). Since the algal population keeps increasing beyond this point (up until day 5) it is to be assumed that the nitrogen is accumulated as intracellular quota [26] and used from this form. From day 5, this intracellular quota is probably depleted and growth stops due to a nitrogen nutrient limitation. During this time, both the phosphate and sulfate ions remain in large excess, following the cell population curve.

This type of response to nitrogen starvation is well-known for various microalgae. These results show that the amount of nitrates present in the standard BBM medium composition is appropriate for producing biomass concentrations up to around 1 g L^{-1} . Adding nitrates would improve the biomass yield over time, but as the increase in biomass mainly depends on light availability, the net (instantaneous) biomass productivity would probably remain similar, around $0.2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (calculated from Fig. 1). This autotrophic growth process could thus be further optimized, but since the objective of this paper is not to obtain and compare optimal productivities, let us simply retain that nitrogen could quickly become a limiting factor in mixotrophic experiments if no adjustments of this quantity are planned.

3.4 MIXOTROPHIC EXPERIMENT # 1

A first experiment was conducted in mixotrophic mode in the photobioreactors following their sterilization and preparation using the procedure from section 3.2. Only two systems were used independently (photobioreactors # 1 and # 4, no replication), since the objective was only to test rapidly whether (i) the sterilization procedure was sufficient to prevent contamination effectively and (ii) the mixotrophic mode could be operated properly. The cultures were started in autotrophic mode until a concentration of $10 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ was reached to provide the algae with an initial competitive advantage over (potentially present) bacteria. Additional glucose (in concentrated sterilized solution) was then fed to each system in different quantities: $+0.5 \text{ g L}^{-1}$ (system # 1) and $+2 \text{ g L}^{-1}$ (system # 4) on days 5, 6, 7 and 8. Similar cell and biomass concentrations as in the autotrophic case were then attained in both systems in a somewhat stationary phase, which appeared to confirm nitrate limitation.

Additional nitrate (sterile solution of concentrated NaNO_3) was then fed to the cultures ($+1 \text{ g L}^{-1}$ in system # 1 and $+0.5 \text{ g L}^{-1}$ in system # 4) on day 10, which did allow the cultures to resume growth. Various quantities of nitrate and glucose were then again added until around day 20 where the cultures had to be stopped due to a significant bacterial contamination in both systems (not explicitly quantified but a very well visible cloudy appearance). Despite differences in the nutrient feeds, both cultures reached similar cell concentrations (Fig. 2) around $150\text{-}160 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ and dry weights near 5 g L^{-1} (which however do include the weight of the bacterial load). From the observed maximal productivities (1.5 to $2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) immediately following glucose addition at day 13 (Fig. 2), it suggests that mixotrophic operation properly stimulated growth at certain points. This first trial run also underlines the importance of well timing the nutrient additions, and that nutrient limitations can occur for both compounds (see the sudden growths in Fig. 2 at days 10 and 13). Other concluding remarks about the bacterial contamination can be that either something was overlooked in the chemical sterilization procedure, or that it is quite difficult to operate at this scale in axenic conditions despite numerous careful efforts at this level. Means other than sterilization (plus the high initial microalgal cell concentration) are thus necessary to ensure algal competitiveness against bacteria in mixotrophic mode.

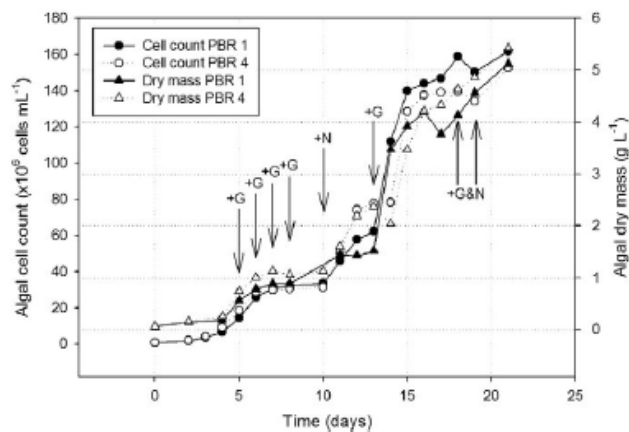


Fig. 2. Cell counts and dry weights from mixotrophic experiment # 1 (individual measurements). G indicates addition of glucose and N of nitrates.

3.5 MIXOTROPHIC EXPERIMENT # 2

A second run was then planned in duplicate conditions, as from the latter observations, a more strategic approach has to be used to prevent (or to limit) bacterial contamination, as well as nutrient limitation. From the results of the autotrophic run, the algae have shown an intrinsic ability to internalize nitrate much faster than its effective use for growth: this process has been well described for other microalgae by Droop [26], where the actual growth rate is more accurately expressed as a function of the internal nutrient reserves. In bacteria, growth is more accurately described as a function of the readily available nutrients from the culture media [27]. These distinct dynamic properties are exploited to favor the growth of algae over bacteria (despite their probable presence in the photobioreactors) through a specifically designed feeding strategy.

To this end, the experimental design was as follows: all systems were again started in autotrophic mode (where algae have the competitive advantage over bacteria of being able to fix inorganic carbon), then they were fed with glucose and additional nitrate following different patterns. Positive feeds of glucose ($+4 \text{ g L}^{-1}$) and nitrate ($+0.5 \text{ g L}^{-1}$) were added either simultaneously or alternately every two days, a time interval based on the autotrophic internalization rate of nitrates that should suffice for the algae to deplete it from the media before the glucose additions. These feeds were initiated on day 6, with nitrate as the first positive feed for the alternately fed systems (based on mixotrophic experiment # 1 results). Results are shown in Fig. 3 for the algal and bacterial cell counts: the alternate feed method clearly shows a significant influence over bacterial growth. Systems 1 and 2 indeed show a much lower bacterial load than systems 3 and 4 (throughout the experiment), while algal cell concentrations and growth rates are similar in most cases. Large uncertainties (standard deviations) in some results are probably attributable to differences in bacterial populations, being an uncontrolled factor due to the nature of the experiment (random contamination).

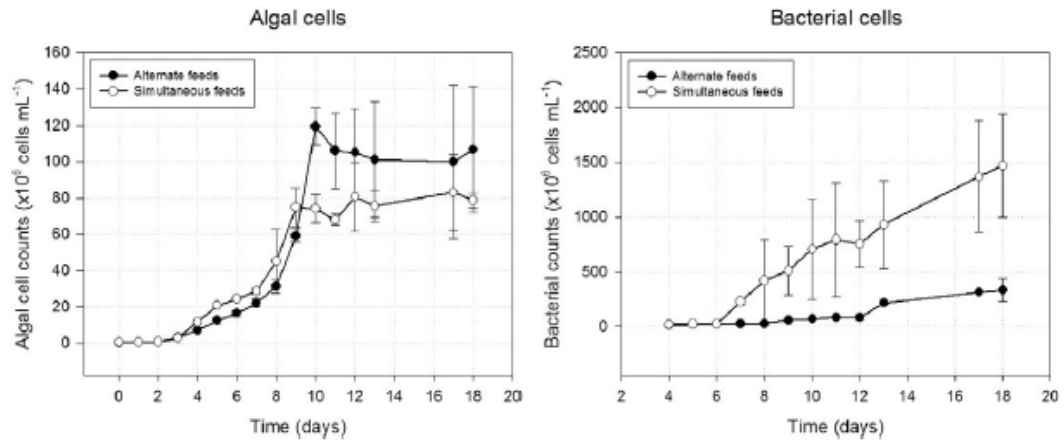


Fig. 3. Algal cell and bacterial cell counts from mixotrophic experiment # 2 (error bars represent standard deviation, $n = 2$).

3.6 ION AND GLUCOSE MEASUREMENTS IN MIXOTROPHIC EXPERIMENTS

Ion and glucose measurements were performed after the realization of the two mixotrophic experiments. A first relevant observation from experiment # 2 (Fig. 4) is the rather clear correspondence between the combined presence of glucose and nitrate in the extracellular medium and bacterial growth (and inversely at day 6 in photobioreactors # 1 and 2 when only nitrate is present). In the alternately fed systems, bacterial growth essentially occurred when there was an incomplete exhaustion of either nutrient at the time the other was added, which emphasises the importance of improving the timing of these additions. In the other systems, significant bacterial growth occurred at every feeding “pulse” of both nutrients. Future work should thus be dedicated to the development of methods for determining the appropriate moment for these additions.

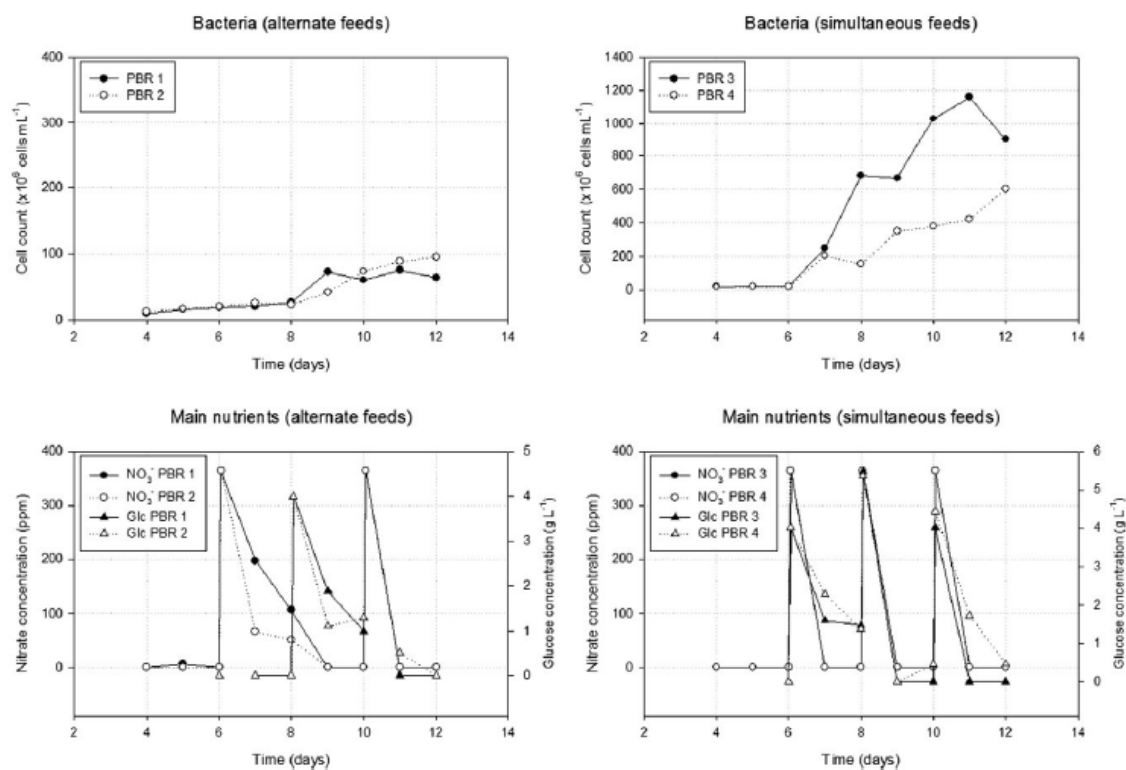


Fig. 4. Nitrate and glucose concentrations versus bacterial counts in mixotrophic experiment # 2 (individual measurements).

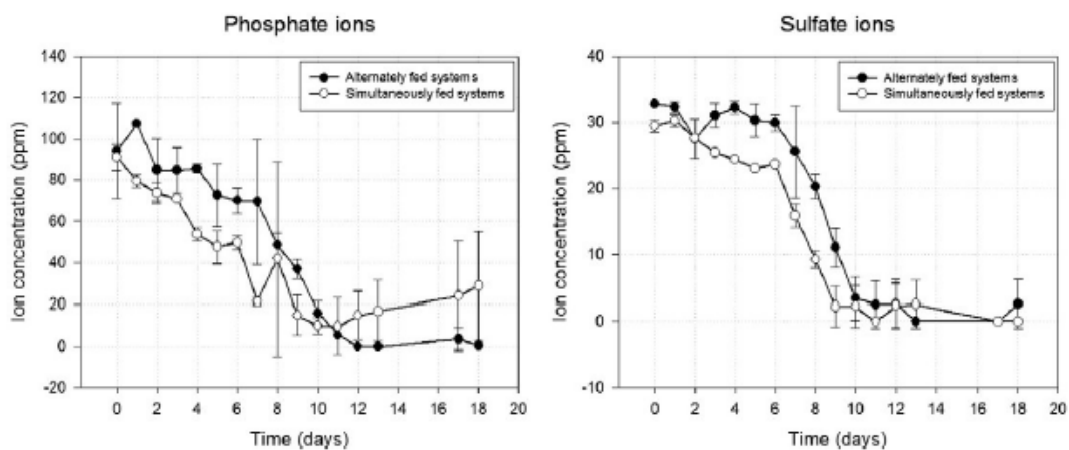


Fig. 5. Phosphate and sulfate ions from mixotrophic experiment # 2 (error bars represent standard deviation, $n = 2$).

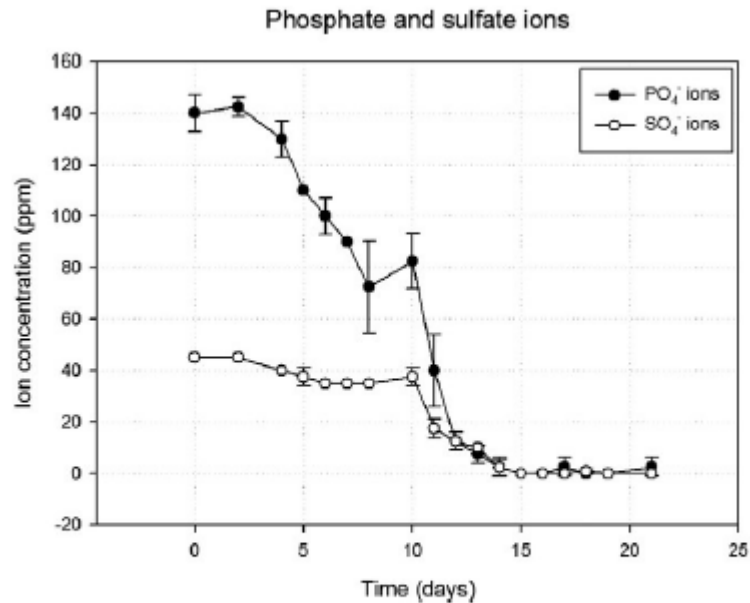


Fig. 6. Phosphate and sulfate ions from mixotrophic experiment # 1 (error bars represent standard deviation, $n = 2$).

One last observation for both mixotrophic experiments is the exhaustion of the phosphate and sulfate ions from the media after about 15 days (Fig. 5-6), which is probably the reason why the stationary phase is reached in all occurrences (another nutrient limitation). Again, large deviations in certain results (Fig. 5) could be attributed to differences in the bacterial populations which could in some cases induce more algal cell death and thus the release of phosphate in the medium. This experiment suggests that close attention should be also drawn to these two other nutrient concentrations (both during growth and in the medium composition) in practical implementations of mixotrophic microalgal cultures. Optimizing the feeding strategy could also include alternating the addition of various nutrients present in the media formulation. This aspect is seldom discussed in papers about mixotrophy, which are generally limited to the influence of carbon and/or nitrogen sources.

4 CONCLUSIONS

This paper addressed the practicability of mixotrophic productions of microalgae in pilot-scale photobioreactors, as a general process consideration. Despite their advantage of

being a closed and highly controllable environment, they can be difficult to maintain in axenic conditions while operated in mixotrophic mode: means other than sterilization need to be considered to ensure competitiveness of the algae over possible bacterial contaminations. An alternate feeding approach was shown effective to control the bacterial populations, exploiting the intrinsic dynamic properties of the algae to provide them with a competitive advantage over bacteria. Careful optimization remains to be done for mixotrophic cultures of microalgae, which should consider ion concentrations such as phosphate and sulfate, as will be addressed in future work.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, grant # 372081-2013), FRQNT (Fonds de Recherche Québec - Nature et Technologies, grant # 138971) and RAQ (Ressources Aquatiques Québec) for funding this project, and other students involved in some more technical parts of this work: Thomas Poirier-Audet, François Turcotte and Jean-Michel Girard.

6 REFERENCES (MAX. 35 FOR ORIGINAL PAPER)

- [1] H.M. Amaro, A.C. Guedes, F.X. Malcata, Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, *Appl. Energy*, 88 (2011), 3402-3410.
- [2] T.M. Mata, A.A. Martins, N.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14 (2010), 217-232.
- [3] L. Brennan, P. Owende, Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 14 (2010), 557-577.
- [4] I. Rawat, R.R. Kumar, T. Mutanda, F. Bux, Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production, *Appl. Energy*, 103 (2013), 444-467.
- [5] N.T. Eriksen, The technology of microalgal culturing, *Biotechnol. Lett.*, 30 (2008), 1525-1536.

- [6] O. Perez-Garcia, F.M.E. Escalante, L.E. de-Bashan, Y. Bashan, Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products, *Water Res.*, 45 (2011), 11-36.
- [7] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.*, 25 (2007), 294-306.
- [8] A. Bahadar, M.B. Khan, Progress in energy from microalgae: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 27 (2013), 128-148.
- [9] J. Wang, H. Yang, F. Wang, Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 172 (2014), 3307-3329.
- [10] R. Chandra, M.V. Rohit, Y.V. Swamy, S.V. Mohan, Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation, *Bioresour. Technol.*, 165 (2014), 279-287.
- [11] F. Pagnanelli, P. Altimari, F. Trabucco, L. Toro, Mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oculata*: interaction between glucose and nitrate, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 89 (2014), 652-661.
- [12] Y. Wang, H. Rischer, N.T. Eriksen, M.G. Wiebe, Mixotrophic continuous flow cultivation of *Chlorella protothecoides* for lipids, *Bioresour. Technol.*, 144 (2013), 608-614.
- [13] T. Heredia-Arroyo, W. Wei, B. Hu, Oil Accumulation via heterotrophic / mixotrophic *Chlorella protothecoides*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162 (2010), 1978-1995.
- [14] J-M. Girard, M-L. Roy, M. Ben Hafsa, J. Gagnon, N. Faucheux, M. Heitz, R. Tremblay, J-S. Deschênes, Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production, *Algal Res.*, 5 (2014), 241-248.
- [15] V. Andruleviciute, V. Makareviciene, V. Skorupskaite, M. Gumbyte, Biomass and oil content of *Chlorella sp.*, *Haematococcus sp.*, *Nannochloris sp.* and *Scenedesmus sp.* under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol, *J. Appl. Phycol.*, 26 (2014), 83-90.
- [16] G.H. Gim, J.K. Kim, H.S. Kim, M.N. Kathiravan, H. Yang, S.H. Jeong, S.W. Kim, Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 37 (2014), 99-106.

- [17] S. Yang, G. Liu, Y. Meng, P. Wang, S. Zhou, H. Shang, Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*, *Bioresour. Technol.*, 172 (2014), 180-185.
- [18] T.M. Mata, A.C. Melo, M. Simões, N.S. Caetano, Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*, *Bioresour. Technol.*, 107 (2012), 151-158.
- [19] J. Dvoráková-Hladká, Utilization of organic substrates during mixotrophic and heterotrophic cultivation of algae. *Biologia Plantarum*, 8(5) (1966), 354-361.
- [20] B.T. Higgins, J.S. VanderGheynst, Effects of *Escherichia coli* on mixotrophic growth of *Chlorella minutissima* and production of biofuel precursors. *PLoS one*, 9(5) (2014), e96807.
- [21] N. Kamjunke, B. Köhler, N. Wannicke, J. Tittel, Algae as competitors for glucose with heterotrophic bacteria, *J. Phycol.*, 44 (2008), 616-623.
- [22] J. Stein, *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*, Cambridge University Press, 1973.
- [23] J-S. Deschênes, P.N. St-Onge, J-C. Collin, R. Tremblay, Extremum seeking control of batch cultures of microalgae *Nannochloropsis oculata* in pre-industrial scale photobioreactors, in *Proc. ADCHEM Conf.*, Singapore, July 10-13 (2012), 585-590.
- [24] G. Tremblay, C. Belzile, M. Gosselin, M. Poulin, S. Roy, J. Tremblay, Late summer phytoplankton distribution along a 3500 km transect in Canadian Arctic waters: strong numerical dominance by picoeukaryotes, *Aquat. Microb. Ecol.*, 54(1) (2009), 55-70.
- [25] H. Lück, The use of hydrogen peroxide in milk and dairy products. *Milk hygiene: hygiene in milk production, processing and distribution*, 1962, pp. 423-447.
- [26] M.R. Droop, 25 years of algal growth kinetics a personal view. *Botanica Marina*, 26(3) (1983), 99-112.
- [27] J. Monod, *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann, Paris, 1942.

5.2 CONCLUSION DES RESULTATS EN LIEN AVEC LA REINGENIERIE DU LABORATOIRE

À la lumière de ces résultats, il est possible de confirmer que malgré tous les efforts déployés dans la réingénierie des expériences de culture en laboratoire présentée au chapitre III, il n'a pas été possible d'enrayer totalement la contamination bactérienne dans les photobioréacteurs utilisés en mixotrophie. Malgré l'absence de culture axénique, les systèmes ont été suffisamment aseptisés pour supporter une culture de microalgues en mixotrophie selon différents protocoles de culture.

De plus, l'approche proposée de limiter la disponibilité des nitrates et des sources de carbone organique dans le milieu de culture en même temps et de viser sur la capacité des microalgues à internaliser ces nutriments pour une utilisation future semble être une voie très prometteuse pour le contrôle de l'activité bactérienne.

CHAPITRE 6

CONCLUSION GÉNÉRALE

La conclusion sera présentée en trois volets. Premièrement, un retour sur l'approche de design suggérée pour la conception des systèmes sera présenté. Par la suite, la conclusion générale du projet d'implantation d'une culture de microalgues en mixotrophie en conditions industrielles sera faite. Enfin, la conclusion du projet du système d'application de bio-ingrédient et perspectives viendront conclure ces travaux.

Avec les deux projets de conception réalisés dans ces travaux de recherche, il est possible d'affirmer que le processus de design présenté au chapitre II semble tout à fait à-propos pour la conception de systèmes reliés aux bioprocédés. En effet, la stratégie d'effectuer une recherche des technologies disponibles avant la génération de concepts et d'introduire des essais de validation tout au long de la conception s'est avérée indispensable dans les deux projets. Les premières technologies sélectionnées ont dicté plusieurs orientations subséquentes dans l'architecture du produit et ont permis d'identifier certains comportements non pressentis des systèmes. Dans le cas du projet microalgues, ces éléments se sont retrouvés dans les nombreuses itérations nécessaires pour raffiner le protocole de nettoyage et d'ensemencement des cultures. Dans le cas du projet relatif à l'application du bio-ingrédient, les choix de la buse et de son système de contrôle ont imposé les autres contraintes de conception (concentration du bio-ingrédient, volume du réservoir, dimensions du charriot, etc.).

De plus, l'adaptation du processus de design proposait également d'évaluer le prototype final en fonction, non seulement des spécifications cibles du produit, mais également en fonction des besoins identifiés. Pour le projet microalgues, cet aspect est très important, car quelques besoins traitent de l'interaction entre l'opérateur et les systèmes de production. Or, le sentiment d'appréciation que peut avoir un opérateur à la fin d'un cycle de production n'est pas évalué entièrement dans les spécifications cibles du système. Ces

éléments se doivent d'être évalués dans ce projet, car il est précurseur ici des risques de mauvais fonctionnement du système et de pertes de production.

Pour le projet d'aspersion du bio-ingrédient, cette phase du processus n'a pu être complétée, car le prototype ne pouvait pas être utilisé en conditions réelles d'utilisation. Il est cependant possible d'observer toute la pertinence de l'ajout de l'étape de l'évaluation du prototype en fonction des besoins dans le processus de design. En effet, malgré le fait que le système respecte toutes les spécifications ciblées, on constate que l'évaluation du produit ne peut être complète sans connaître la rétroaction des employés de production ce qui est relatif au besoin du client ou du marché identifié. Ces éléments de l'évaluation concordent donc avec l'approche proposée.

En résumé, l'adaptation du processus de design semble répondre aux contraintes et réalités qu'ont les projets de conception en bioprocédé. Il pourrait être intéressé d'appliquer ce processus à d'autres types de projets présentant des caractéristiques similaires, c'est-à-dire une utilisation variée de différentes technologies ne pouvant être maîtrisées par l'équipe de conception afin de lui apporter des améliorations et des raffinements et des comportements de systèmes difficiles à prévoir.

Pour conclure le projet sur la culture de microalgues, il est possible d'affirmer que ces travaux définissent un protocole de culture permettant à des systèmes de production de microalgues d'utiliser une source de carbone organique afin d'améliorer leur rendement de productivité en conditions industrielles. Les travaux présentent également une méthode afin de contrôler l'activité bactérienne dans les systèmes de culture. Bien entendu, plusieurs améliorations restent à faire : améliorer les photobioréacteurs pour les adaptés d'avantage ou nouveau cycle de nettoyage et d'ensemencement, mieux synchroniser les cycles d'apport de nutriments nouveaux pour limiter la présence de nitrates et de carbone dans les systèmes, être certains qu'aucune carence nutritionnelle n'est présente et remplacer certains éléments ou technologies du protocole par d'autres ayant un attrait économique plus intéressant. Ce projet démontre qu'implanter une culture de microalgues en mixotrophie dans des conditions industrielles est possible. La prochaine étape serait d'évaluer le rendement économique de

cette méthode afin d'identifier des marchés potentiels et les modifications nécessaires à imputer à ces procédures pour s'y implanter.

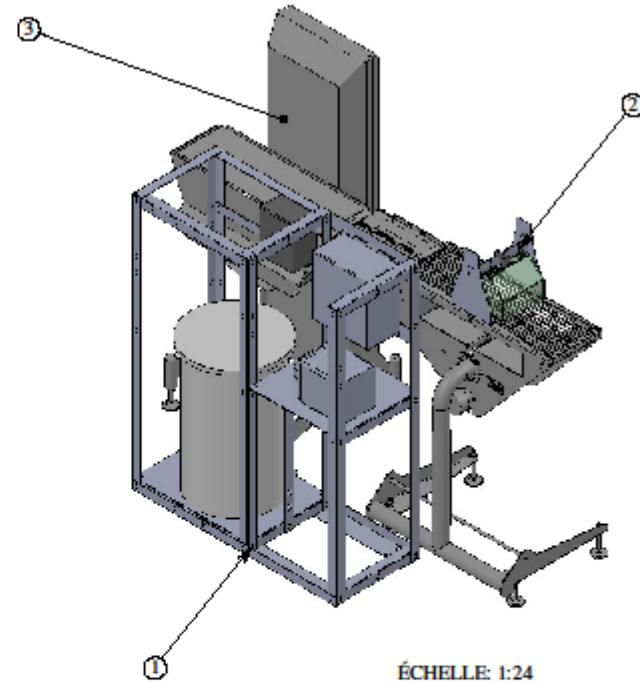
Pour ce qui est du projet d'application du bio-ingrédient sur une chaîne de production industrielle, le système conçu satisfait les exigences de client. Les essais de validation ont démontré que le système est en mesure d'appliquer suffisamment de bio-ingrédients sur les tranches de saumon pour contrôler l'activité bactérienne. Le système respecte toutes les normes alimentaires et de sécurité d'un équipement en milieu industriel. Il est facile d'entretien et est convivial à utiliser.

Des essais plus approfondis en cours de production devront être réalisés afin d'ajuster ses performances. Un mode de production permettant de limiter les éclaboussures, soit celui en intermittence, n'a pas été testé. Une utilisation à long terme permettra de valider si d'autres essais de validation s'avèrent nécessaires.

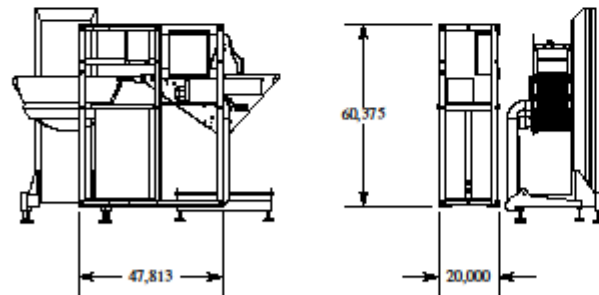
ANNEXE I


Plans mécaniques – projet application d'un bio-ingrédient

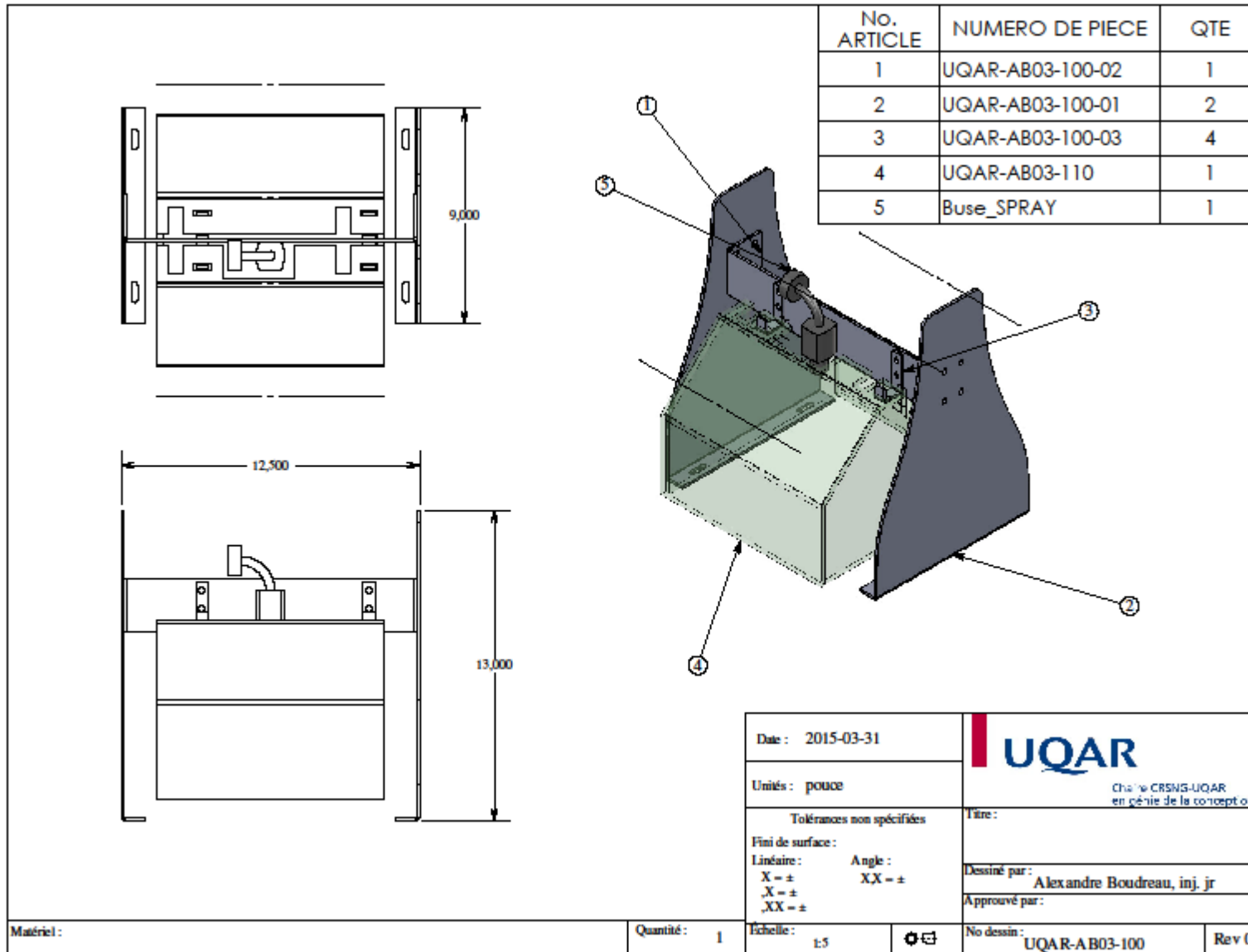
No. ARTICLE	NUMERO DE PIECE	QTE
1	UQAR-AB03-200	1
2	UQAR-AB03-100	1
3	436+scanvaegt	1

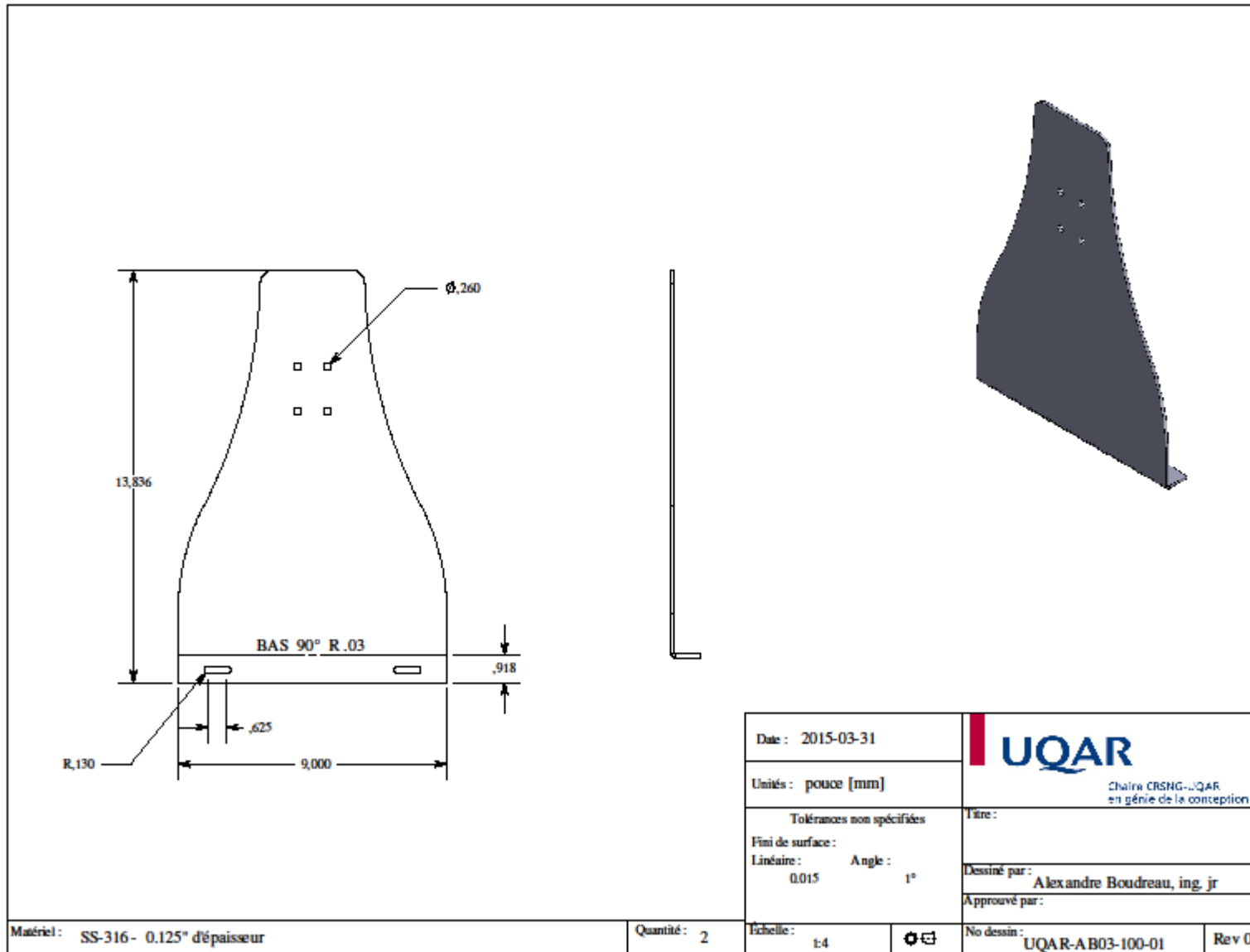


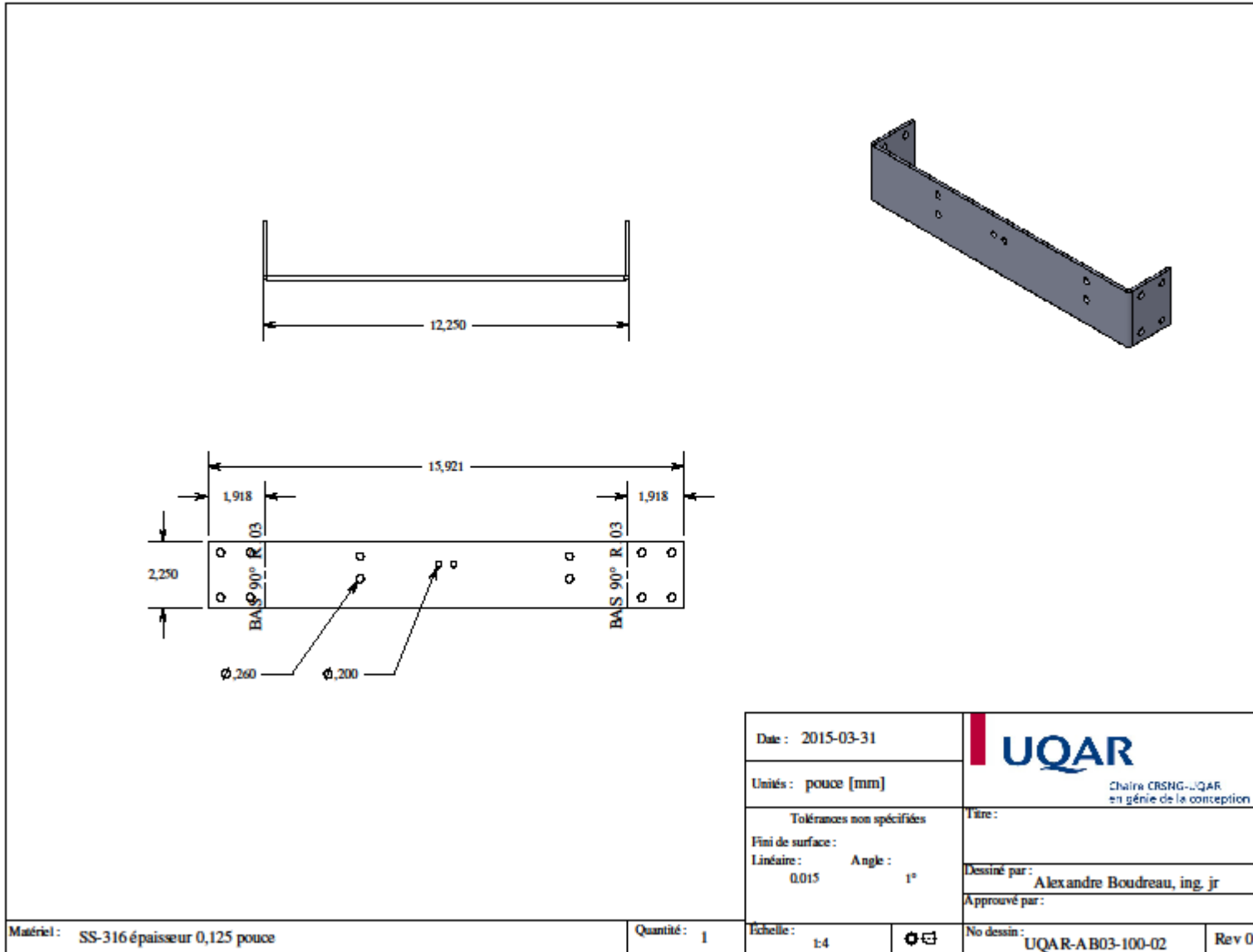
ÉCHELLE: 1:24




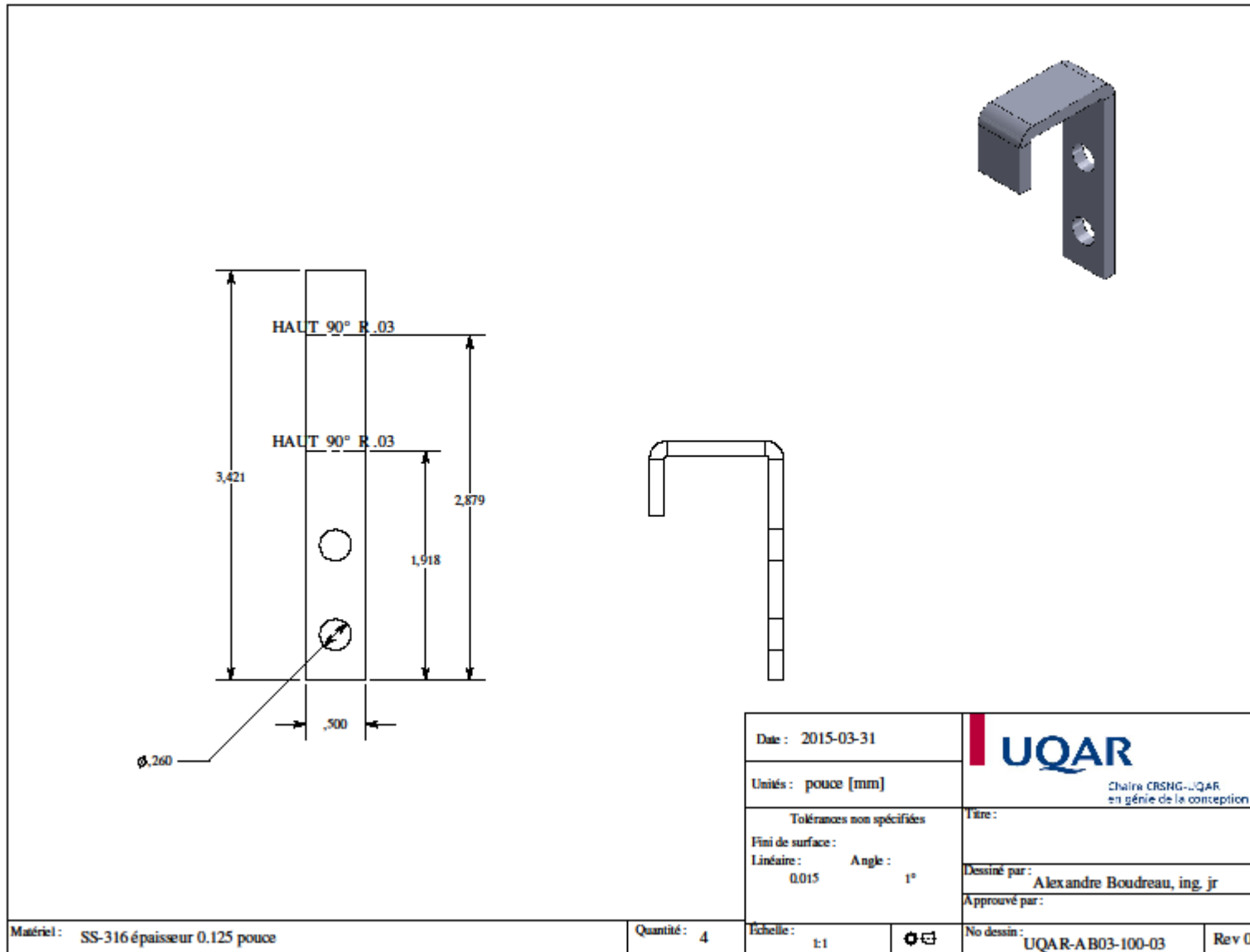
Date : 2015-03-31		 UQAR Chaire CRSNG-UQAR en génie de la conception
Unités : pouce [mm]		
Tolérances non spécifiées		Titre :
Fini de surface :		Dessiné par : Alexandre Boudreau, ing. jr
Linéaire : 0.015	Angle : 1°	Approuvé par :
Matériel : SS-316		No dessin : UQAR-AB03-000
Quantité : 1		Rev 0
Échelle : 1:48		

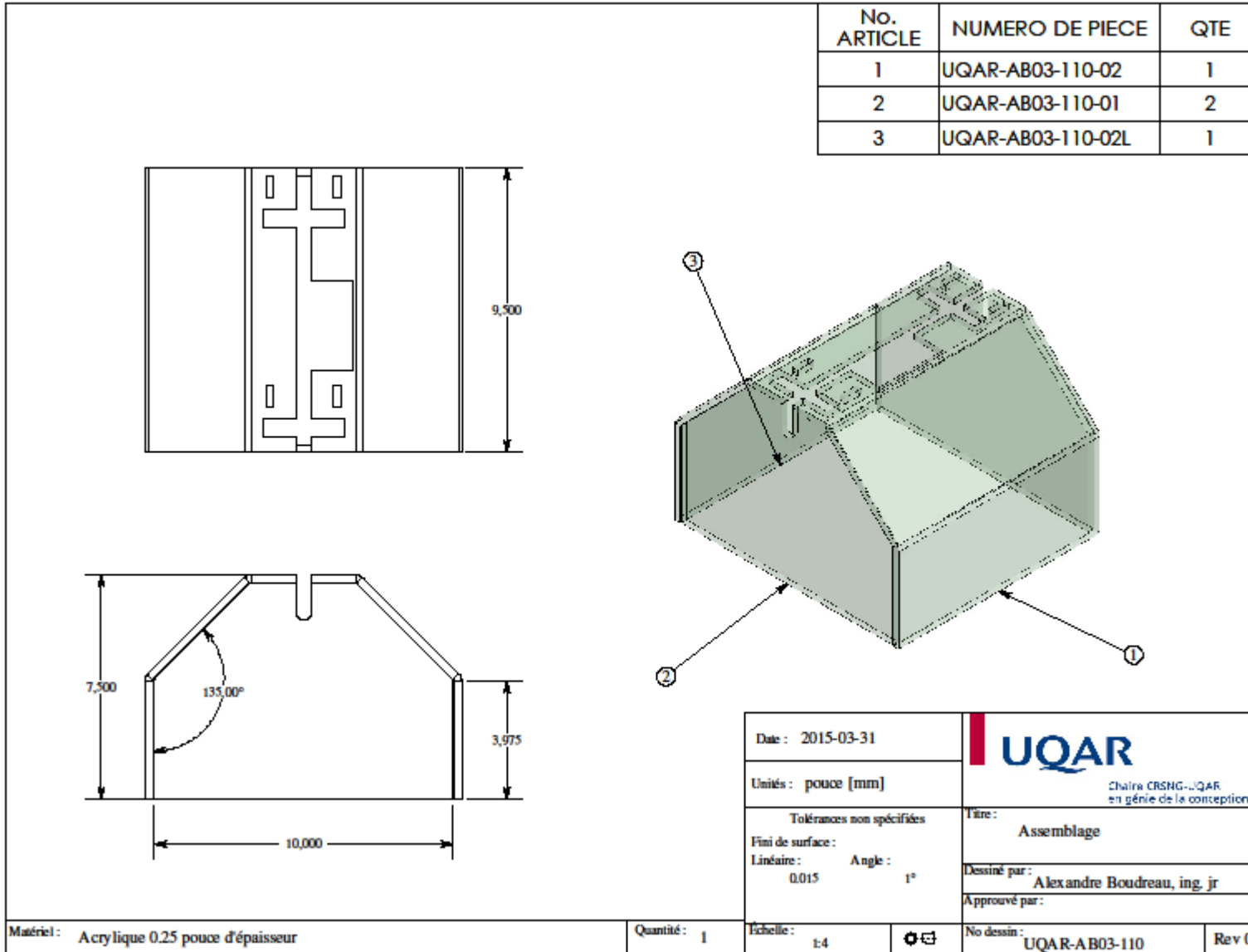


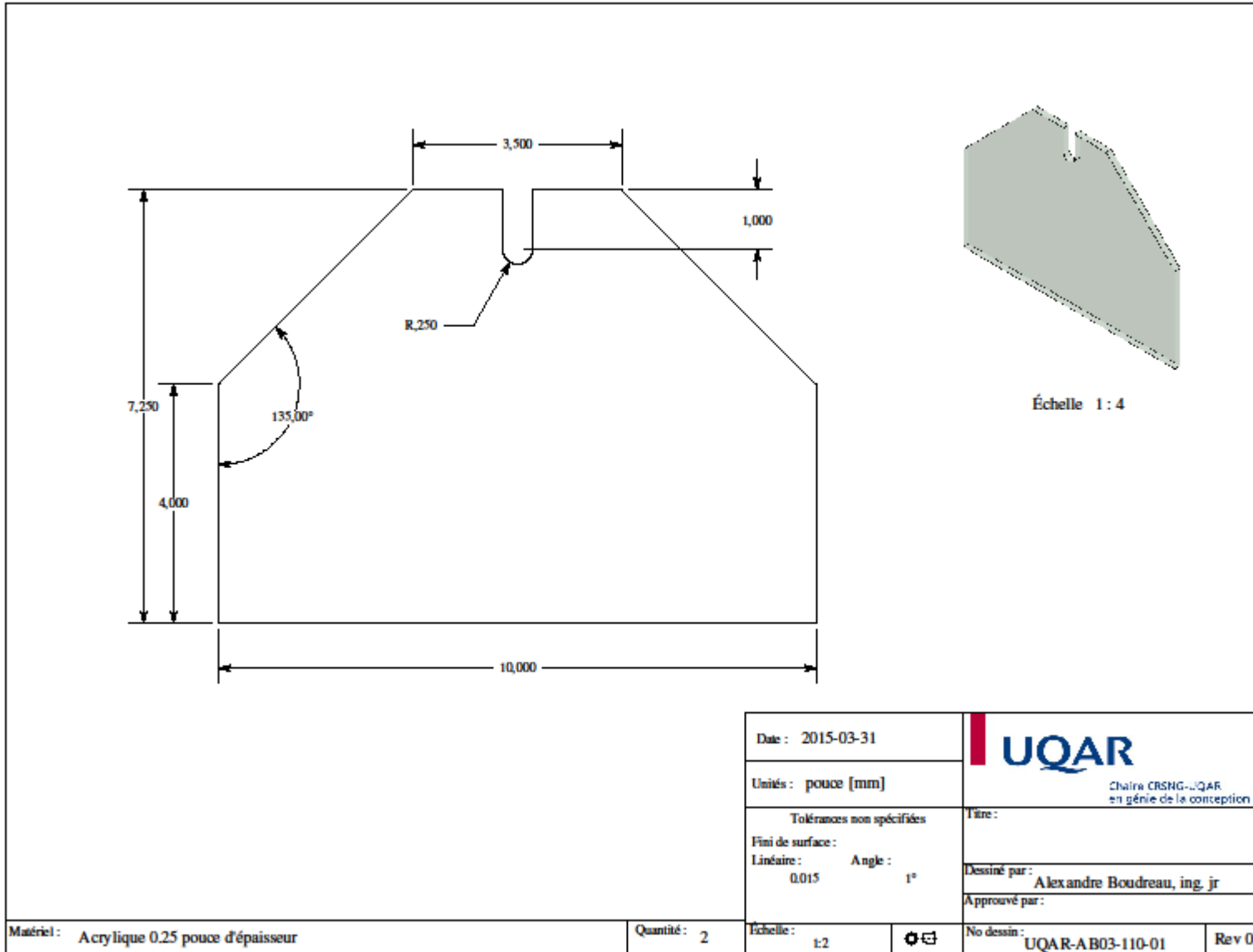


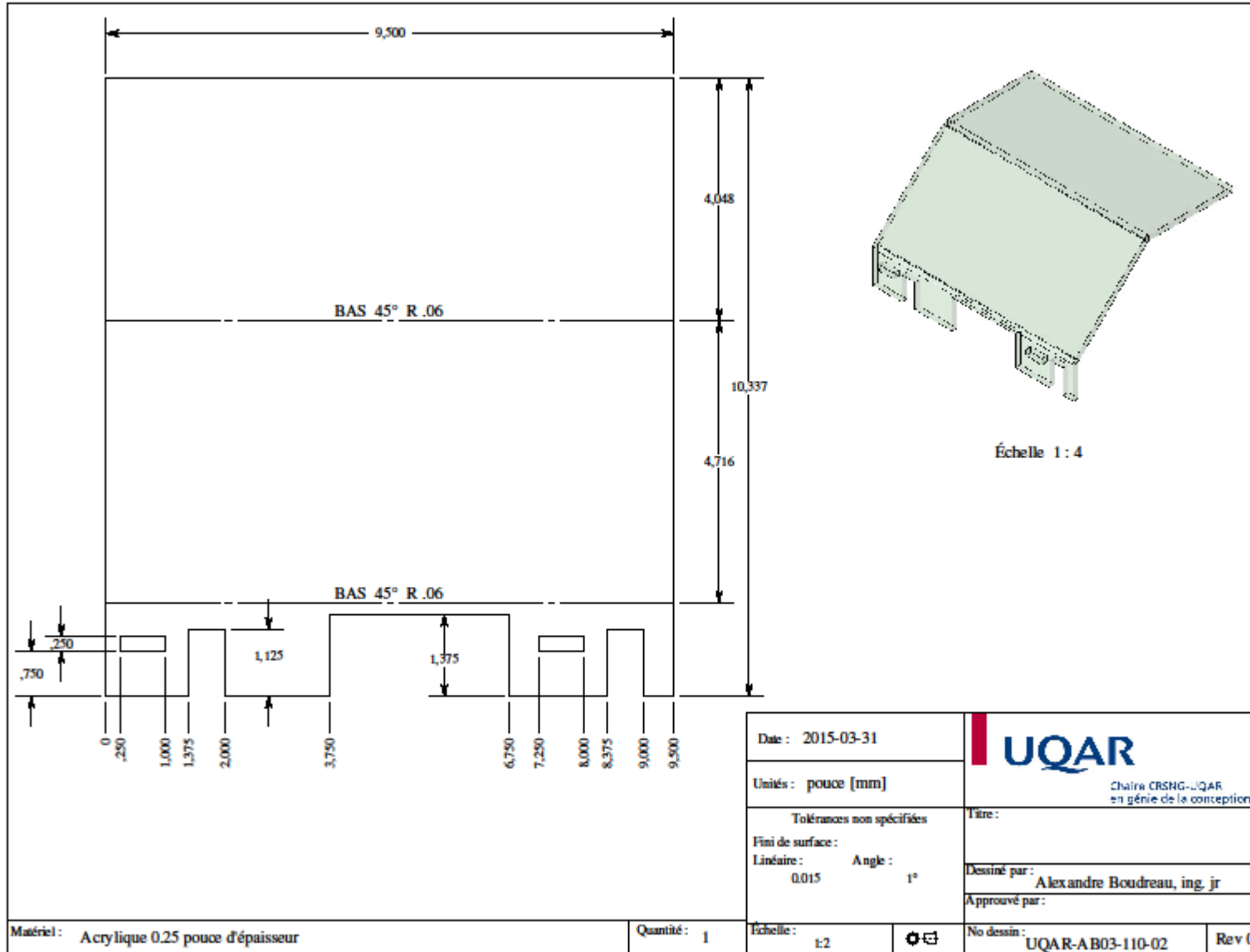


Date : 2015-03-31		 UQAR Chaire CRSNG-UQAR en génie de la conception
Unités : pouce [mm]		
Tolérances non spécifiées		Titre :
Fini de surface :		Dessiné par :
Linéaire :	Angle :	Approuvé par :
0.015	1°	Alexandre Boudreau, ing. jr
Matériel : SS-316 épaisseur 0,125 pouce		No dessin : UQAR-AB03-100-02
Quantité : 1	Échelle : 1:4	Rev 0









Date : 2015-03-31



Unités : pouce [mm]

Tolérances non spécifiées
 Fini de surface :
 Linéaire : 0.015 Angle : 1°

Titre :
 Dessiné par : Alexandre Boudreau, ing. jr
 Approuvé par :

Matériel : Acrylique 0.25 pouce d'épaisseur

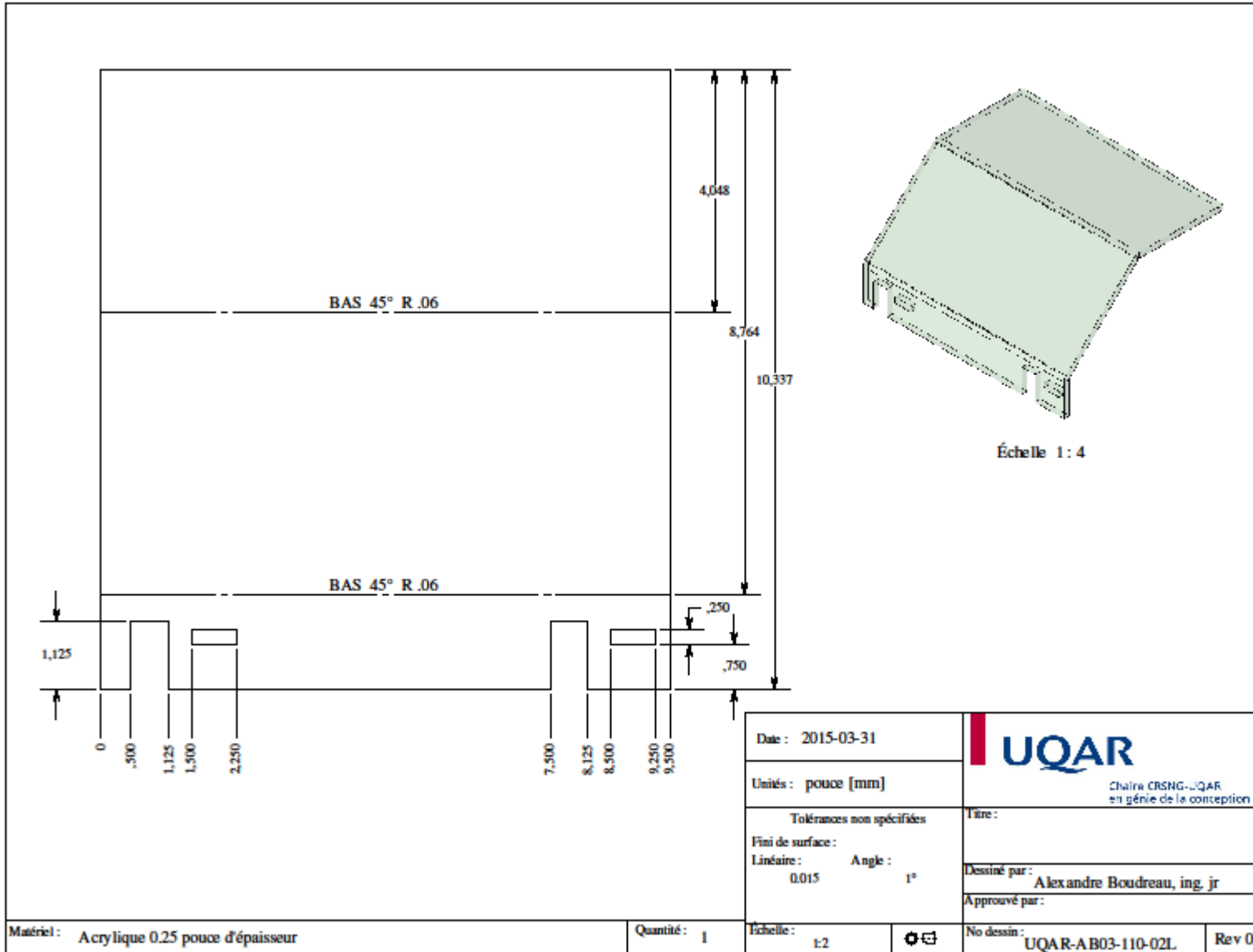
Quantité : 1

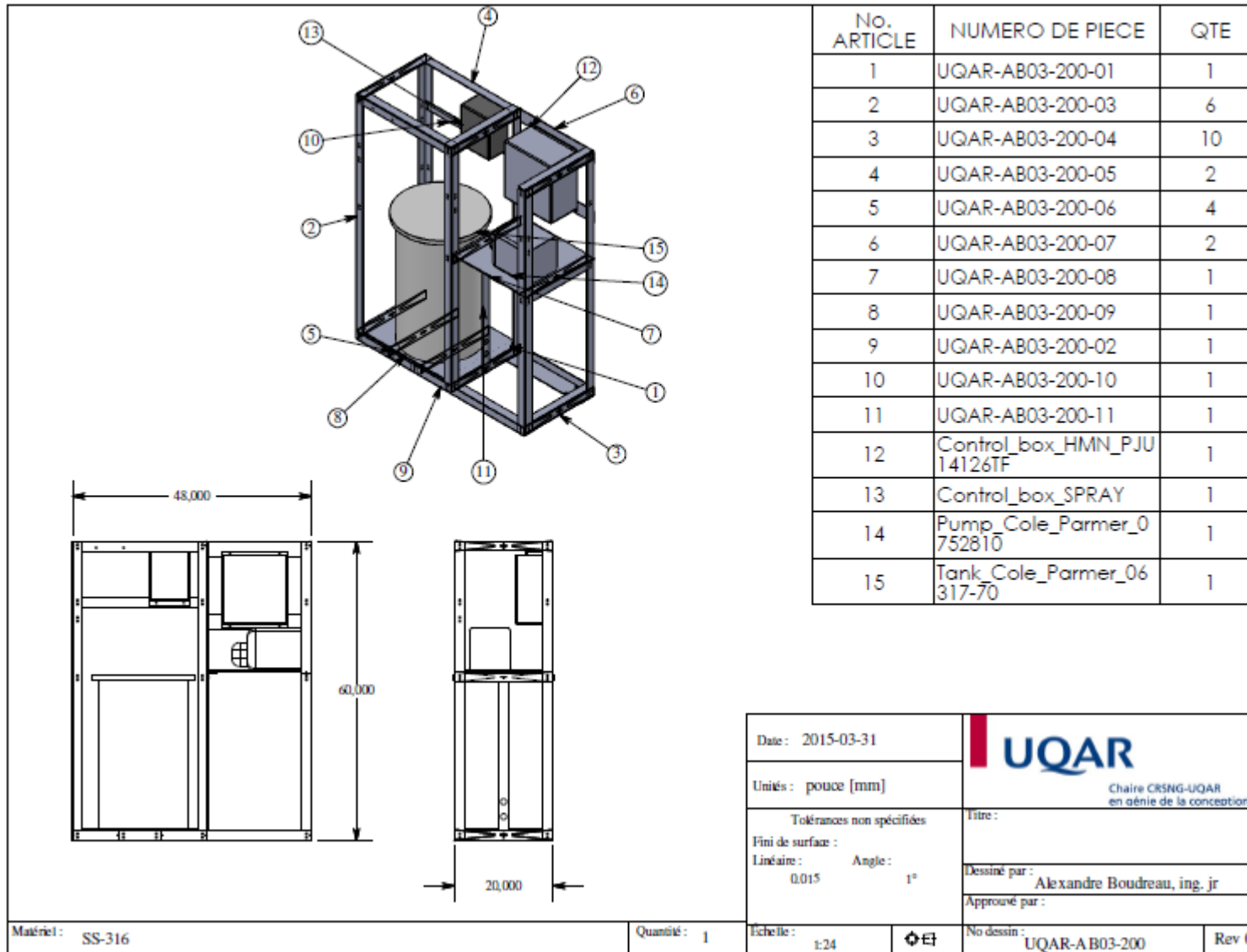
Échelle : 1:2

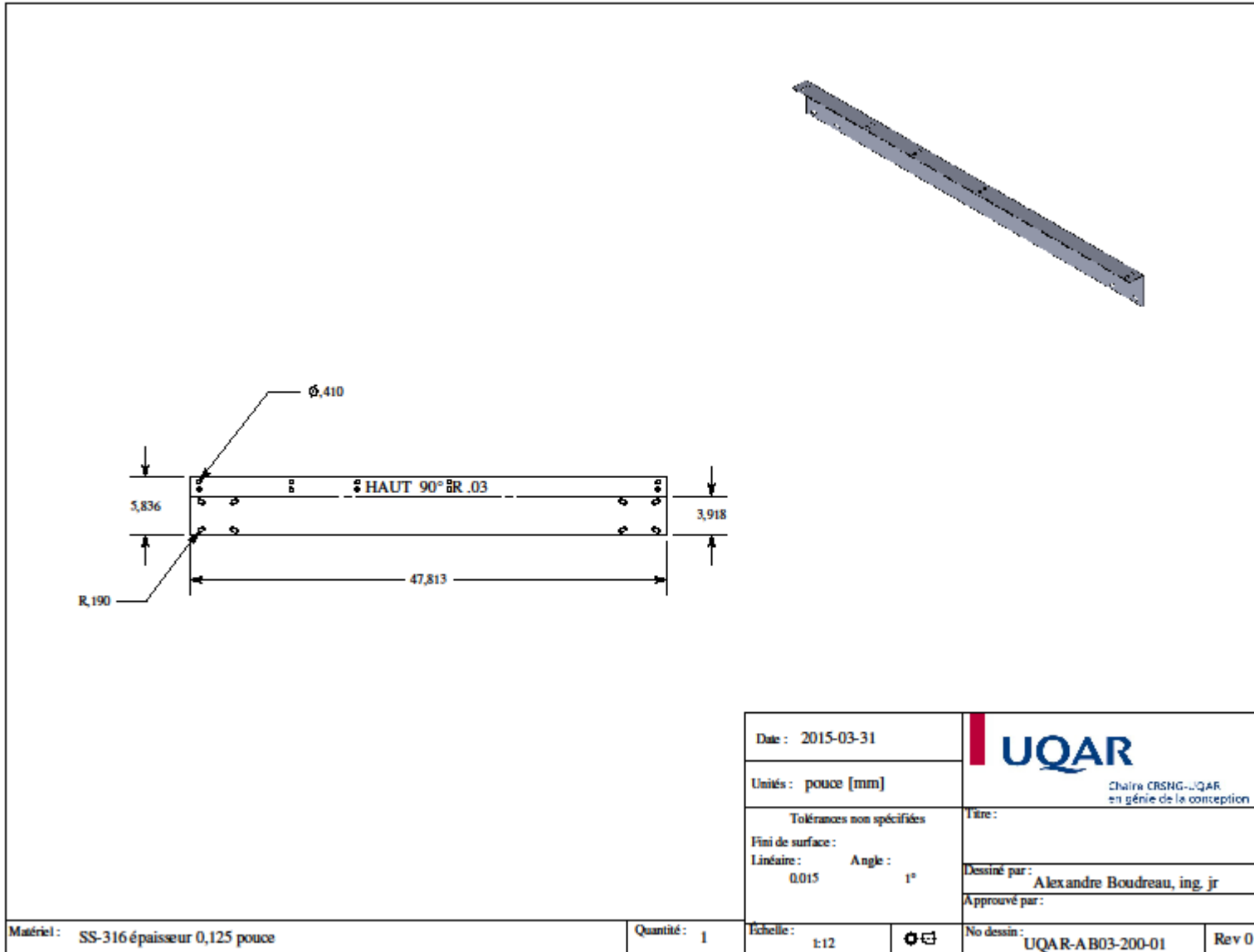


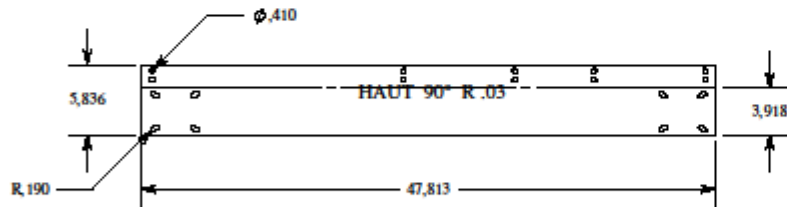
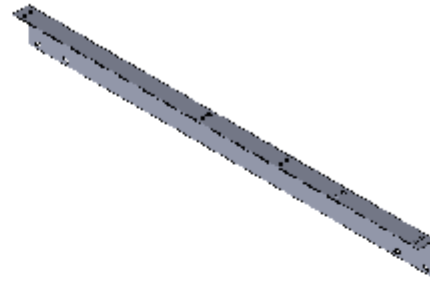
No dessin : UQAR-AB03-110-02


Rev 0

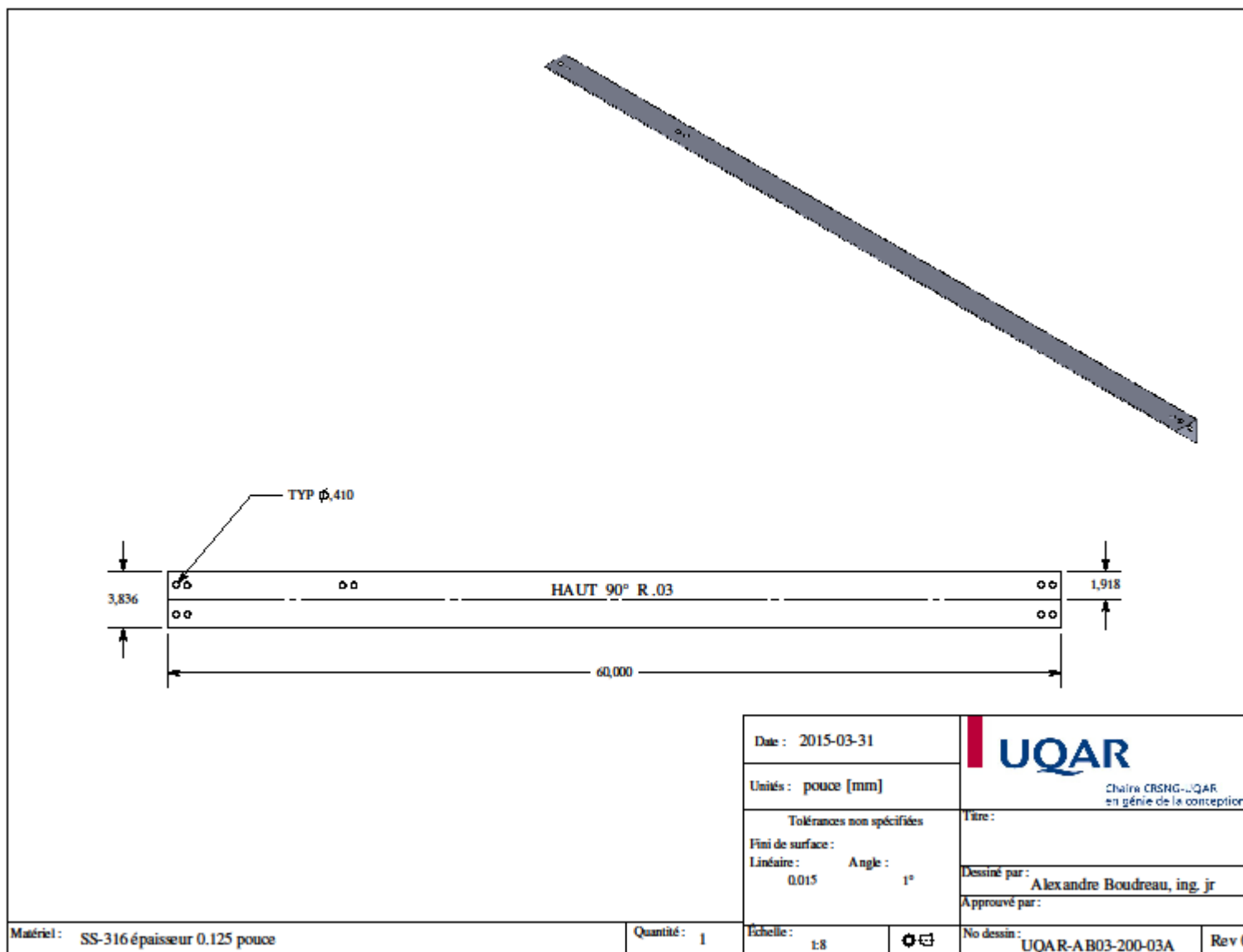


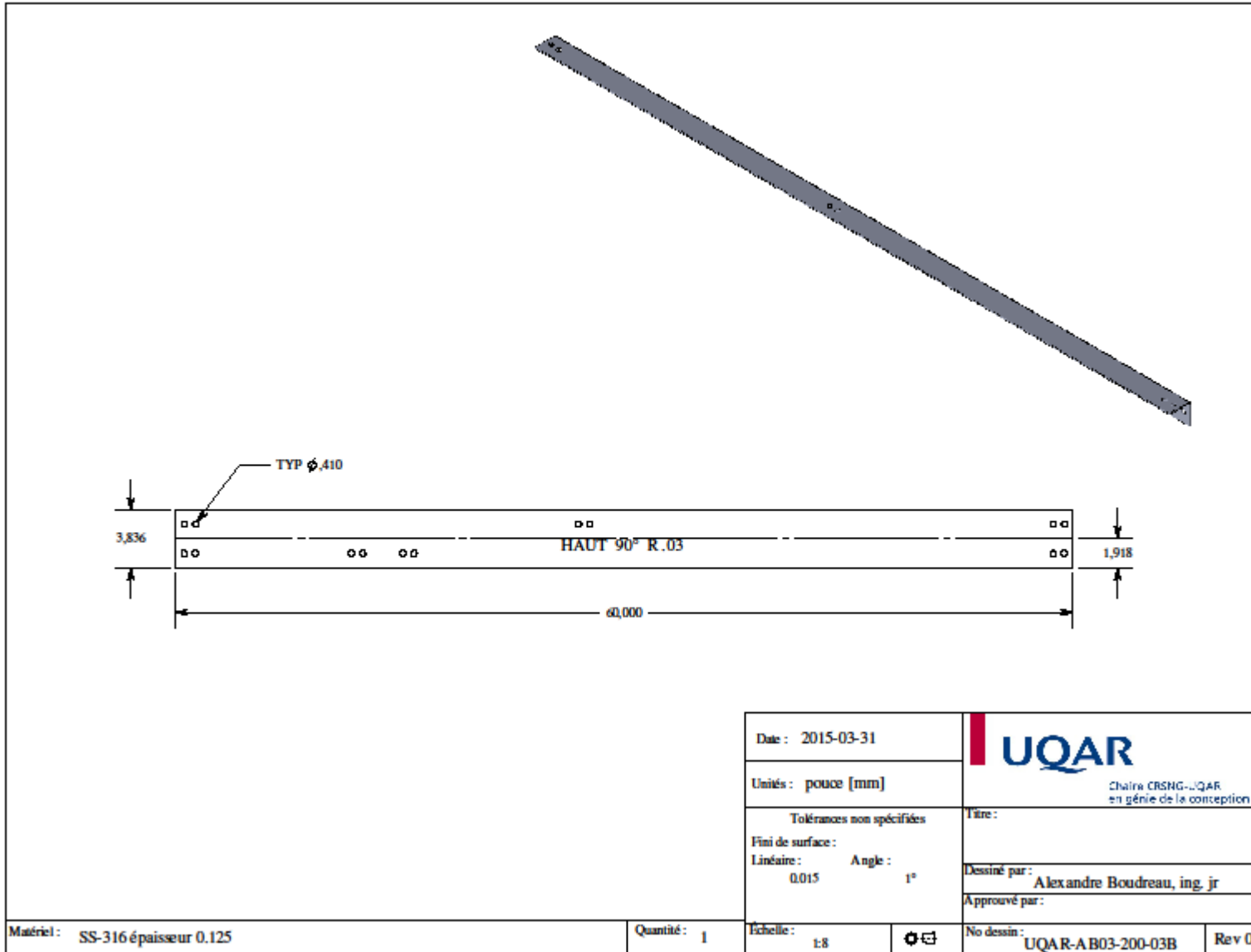


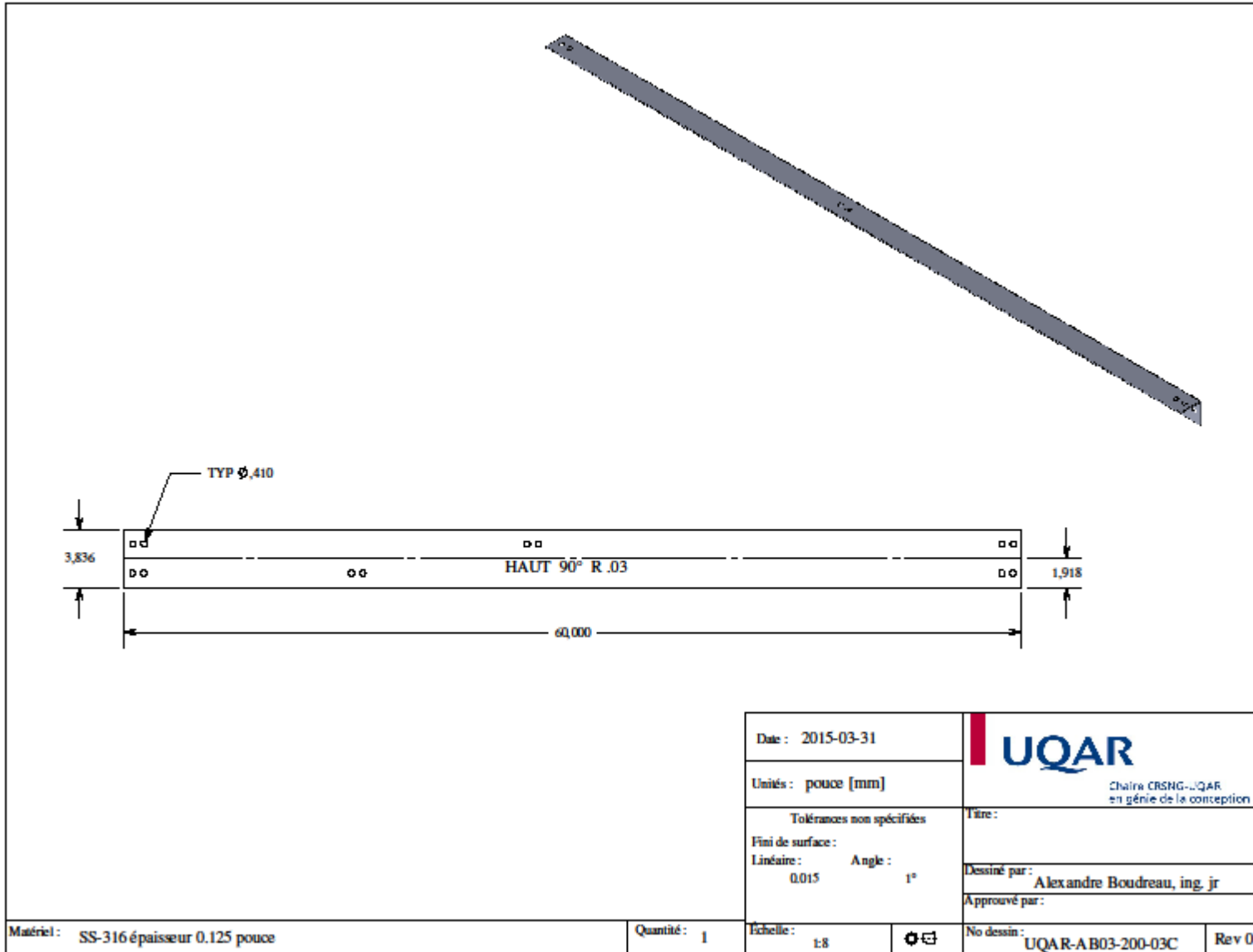


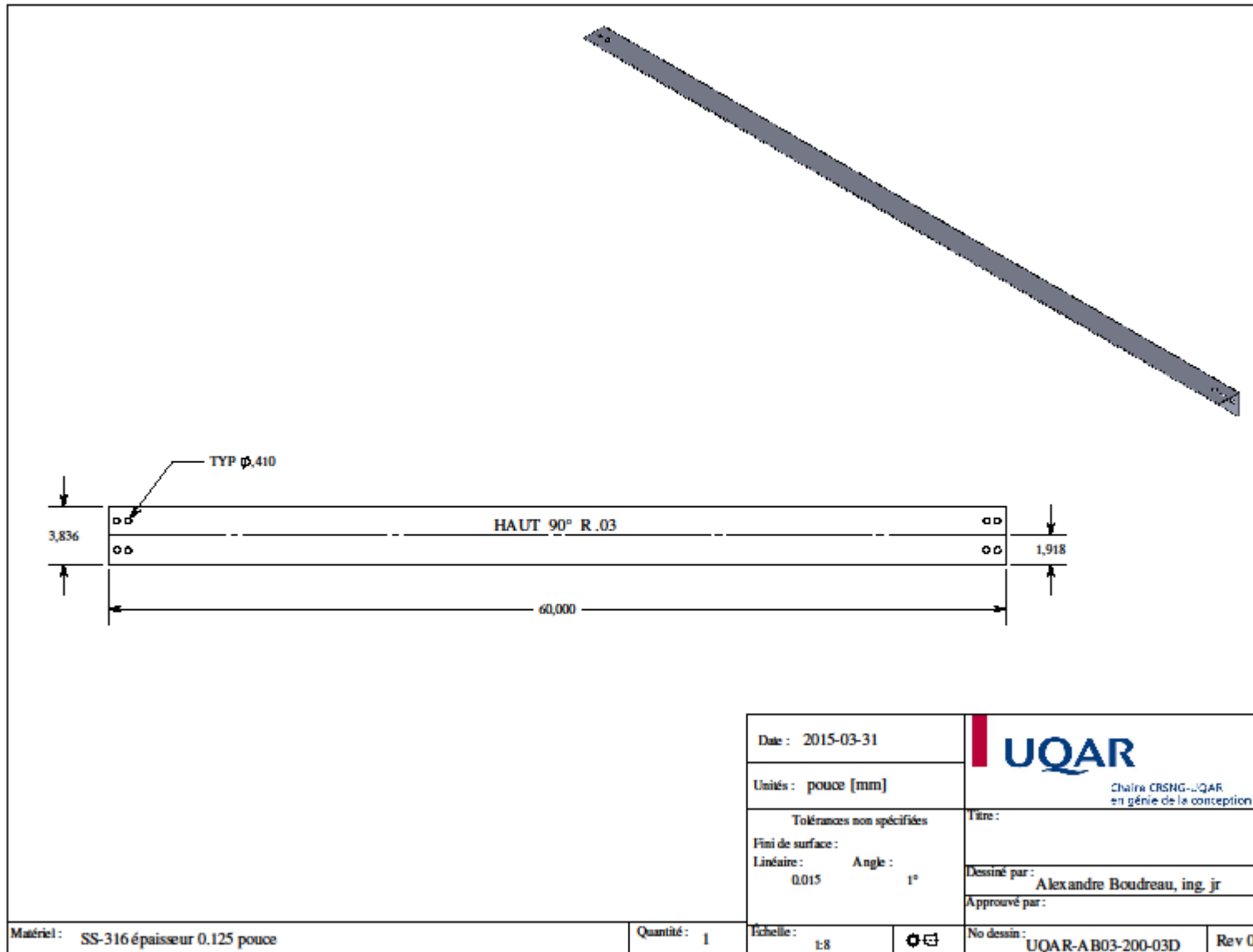



Date : 2015-03-31	 UQAR Chaire CRSNG-UQAR en génie de la conception			
Unités : pouce [mm]				
Tolérances non spécifiées	Titre :			
Fini de surface :	Dessiné par : Alexandre Boudreau, ing. jr			
Linéaire : 0,015 Angle : 1°	Approuvé par :			
Matériel : SS-316 épaisseur 0.125 pouce	Quantité : 1	Échelle : 1:12	No dessin : UQAR-AB03-200-02	Rev 0

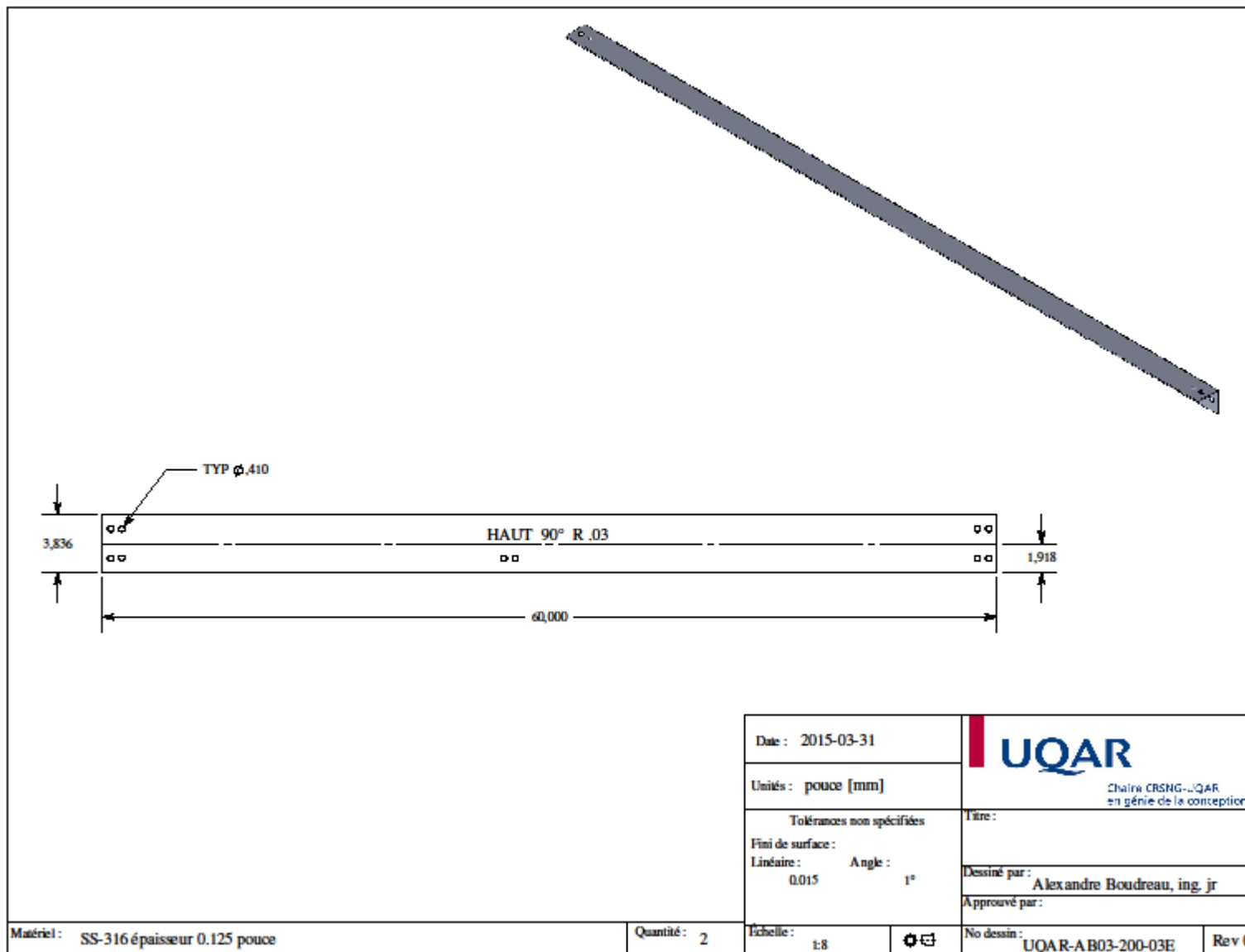


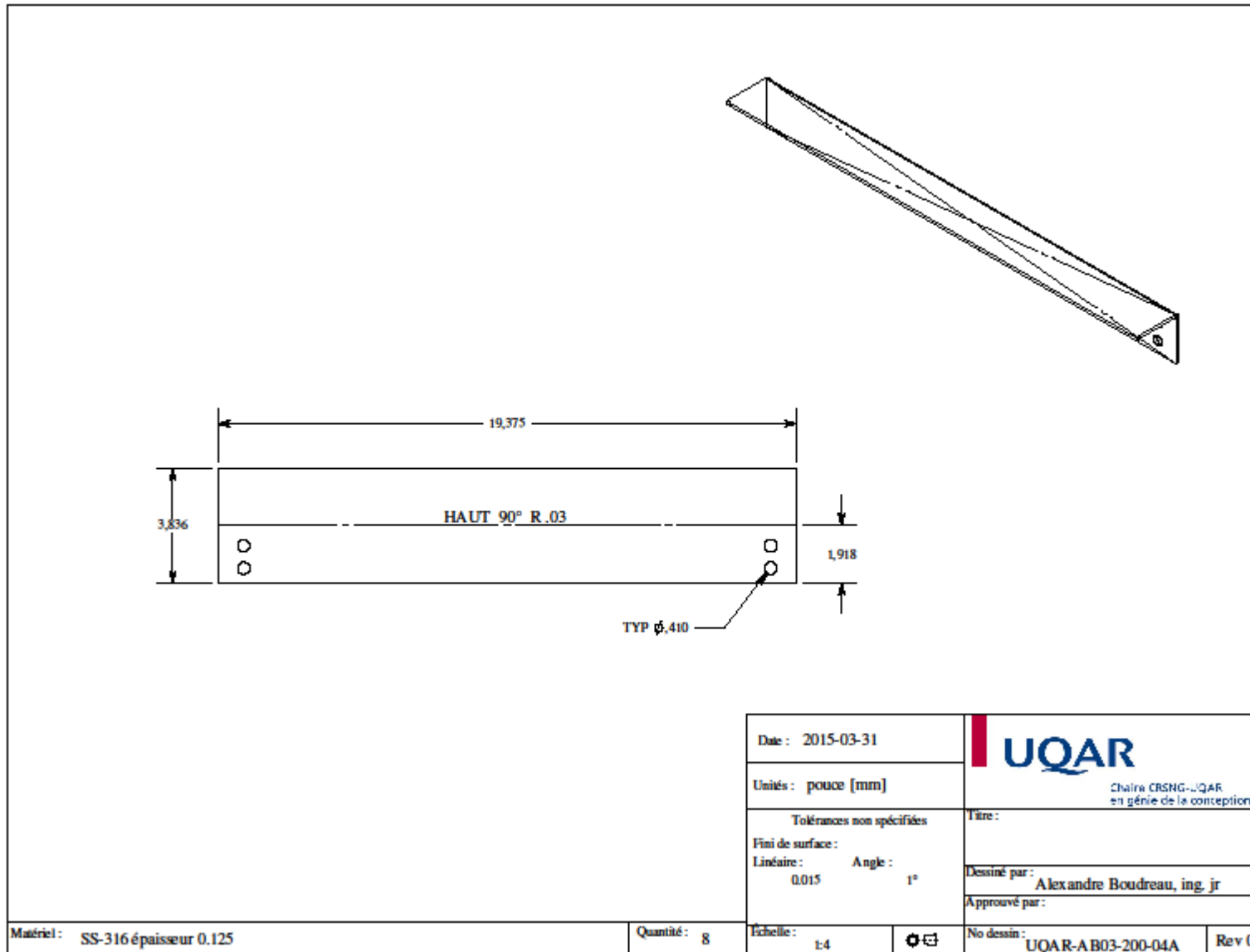


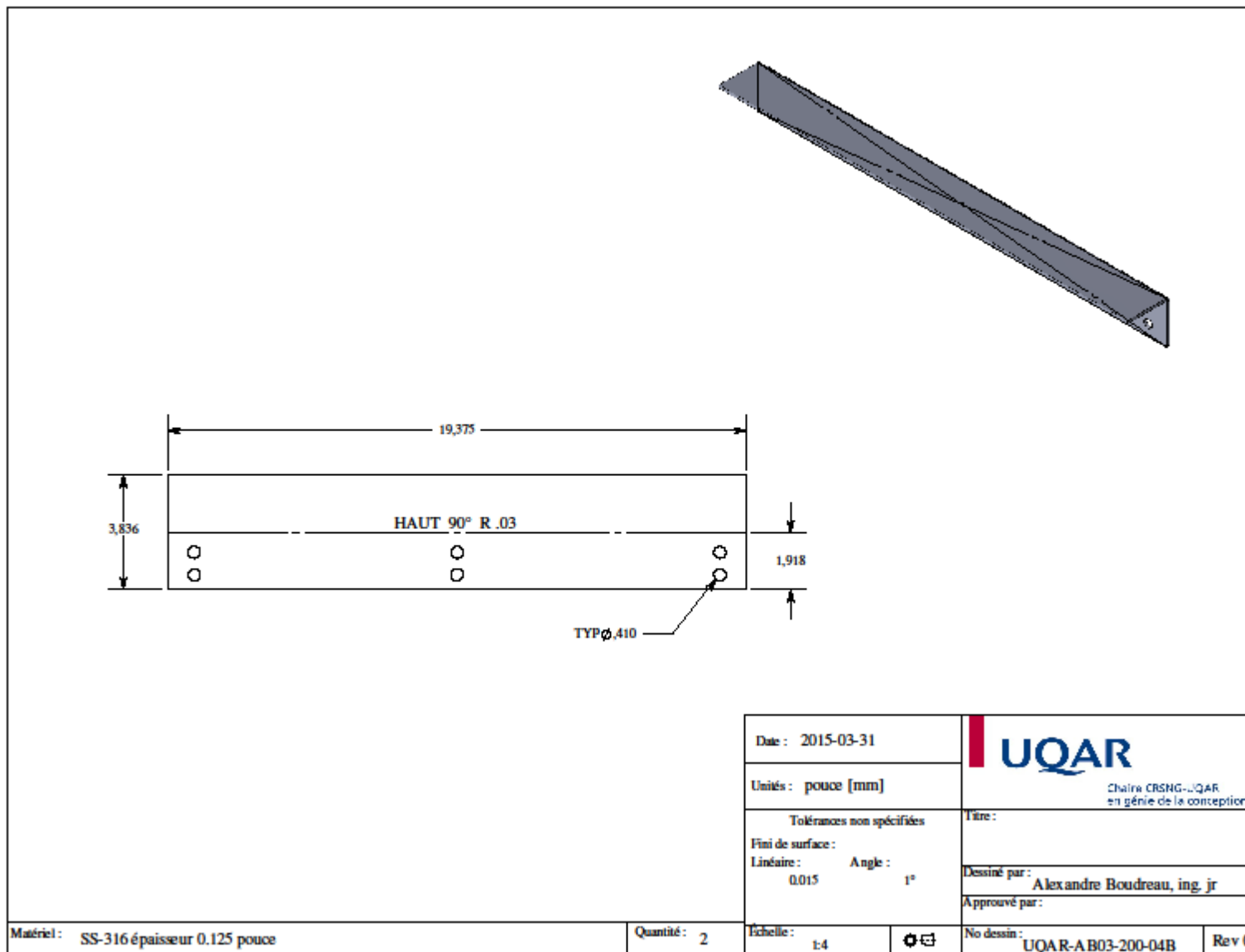


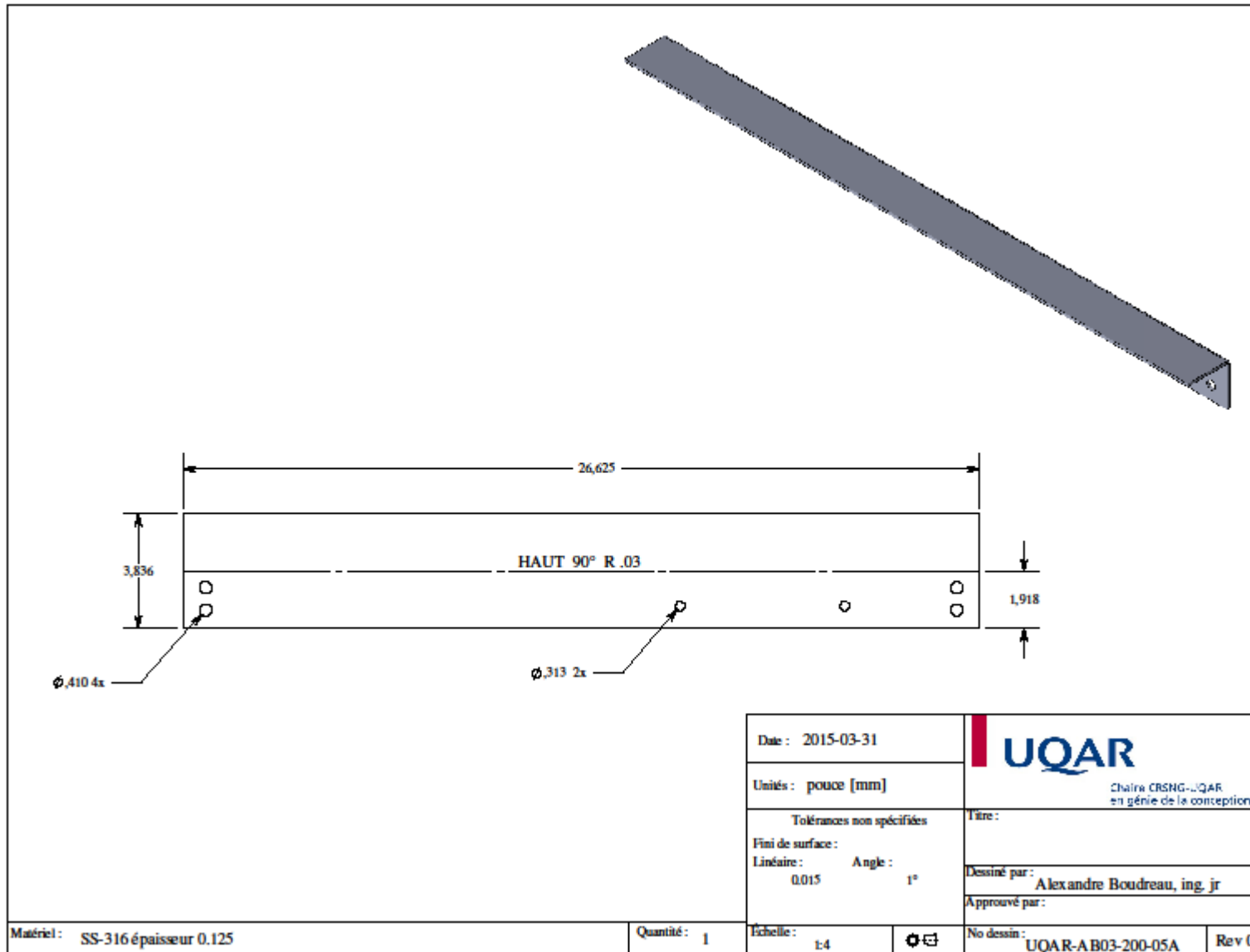


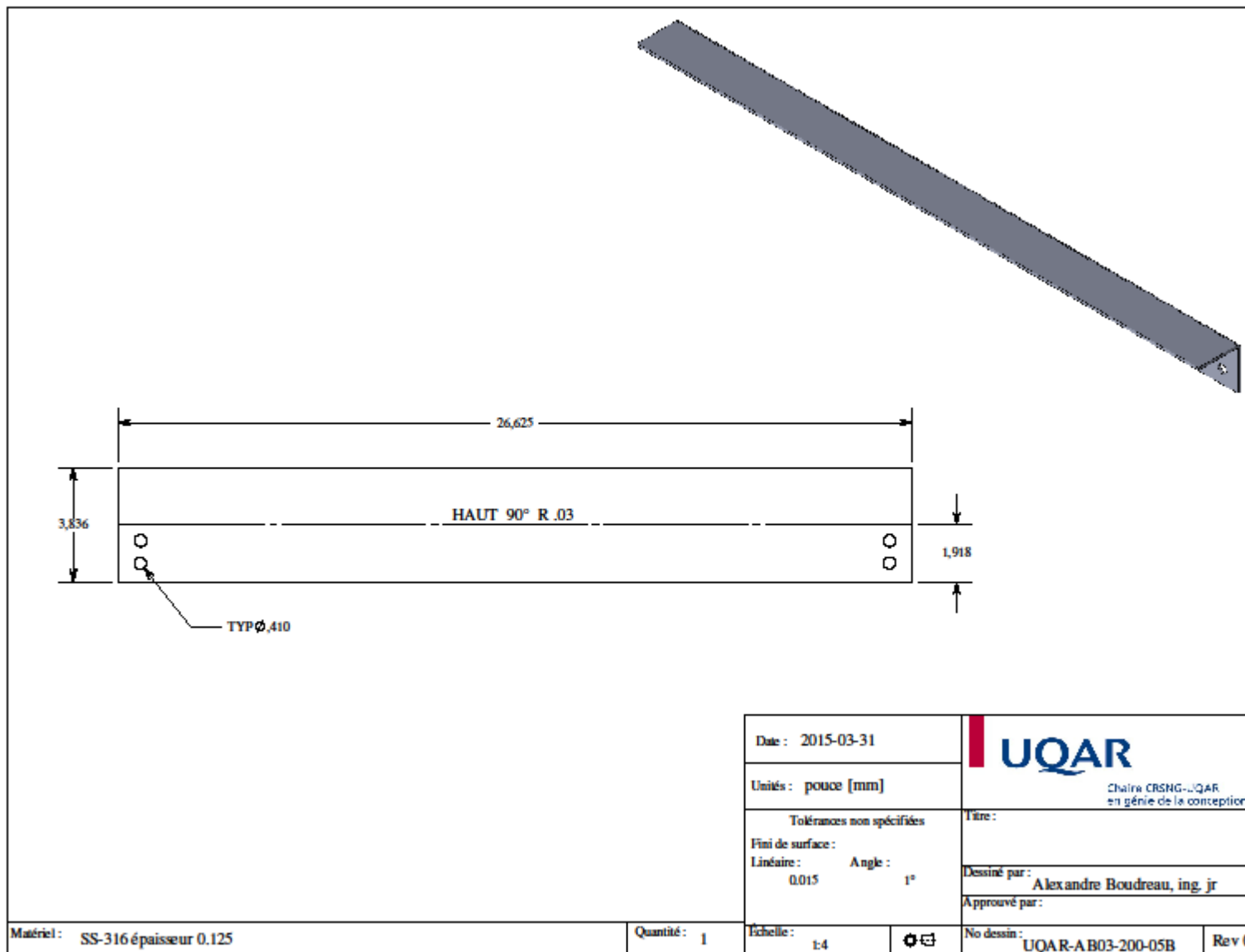
Date : 2015-03-31		 UQAR Chaire CRSNG-UQAR en génie de la conception
Unités : pouce [mm]		
Tolérances non spécifiées		Titre :
Fini de surface :		Dessiné par : Alexandre Boudreau, ing. jr
Linéaire : 0.015 Angle : 1°		Approuvé par :
Matériel : SS-316 épaisseur 0.125 pouce		No dessin : UQAR-AB03-200-03D
Quantité : 1		Rev 0

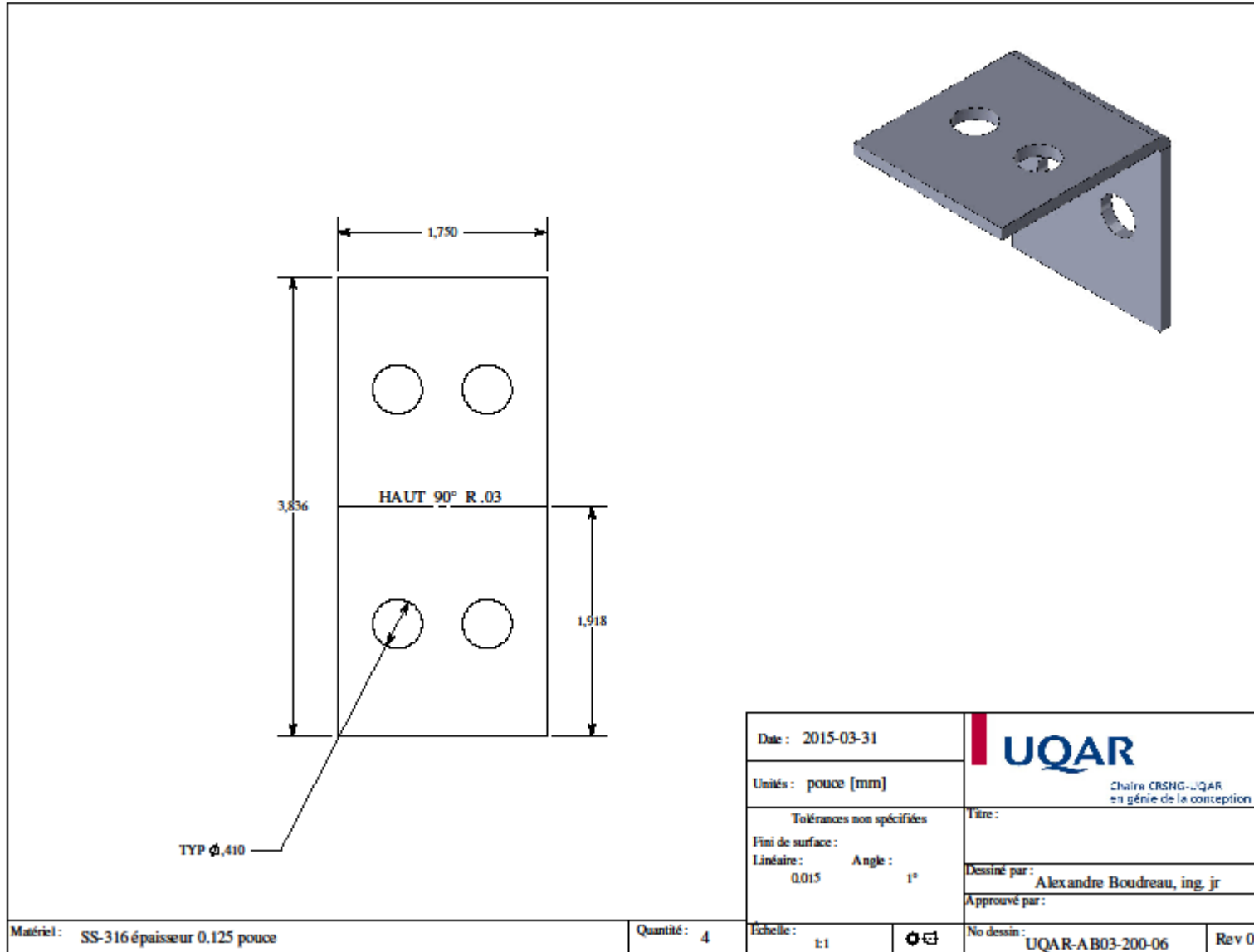


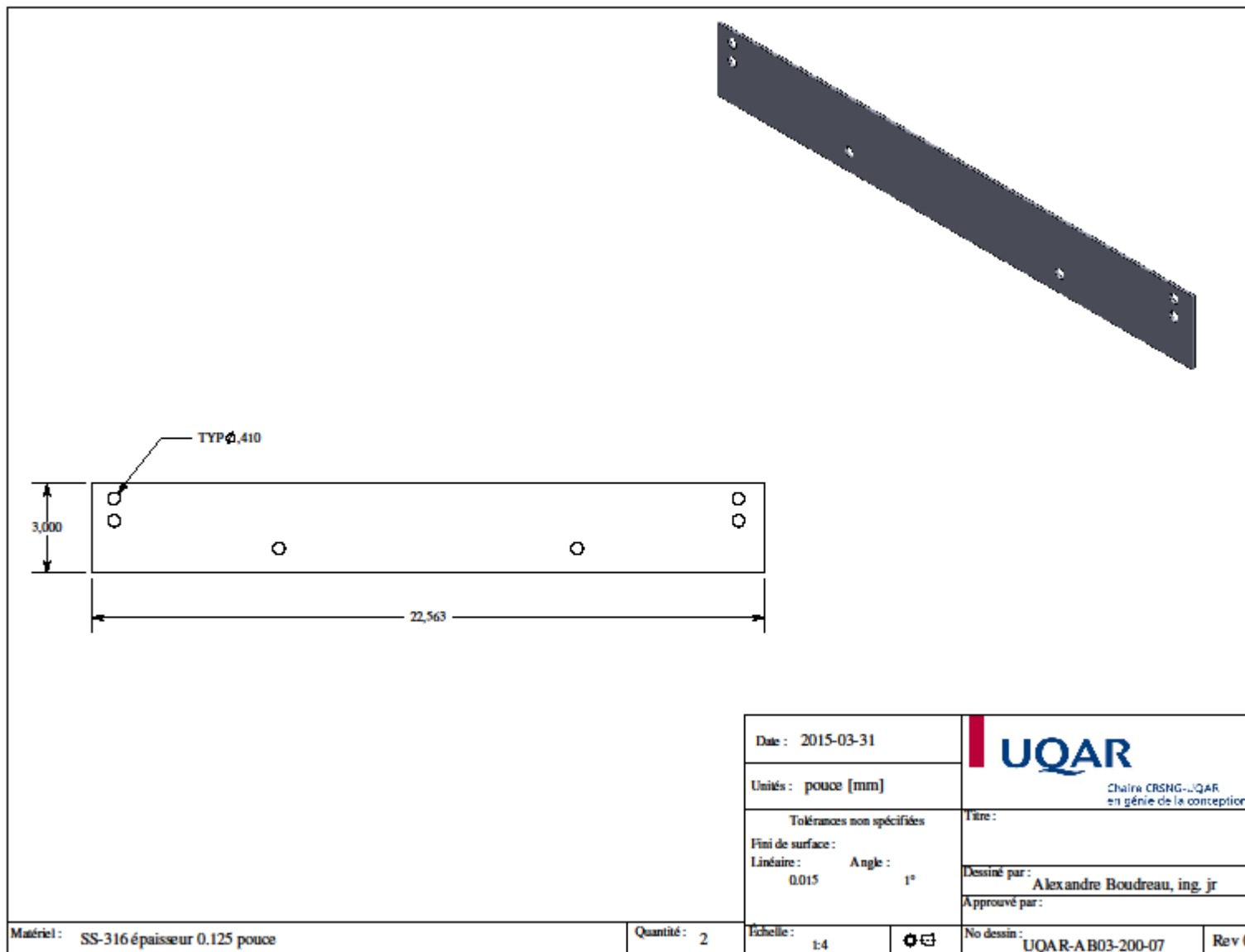


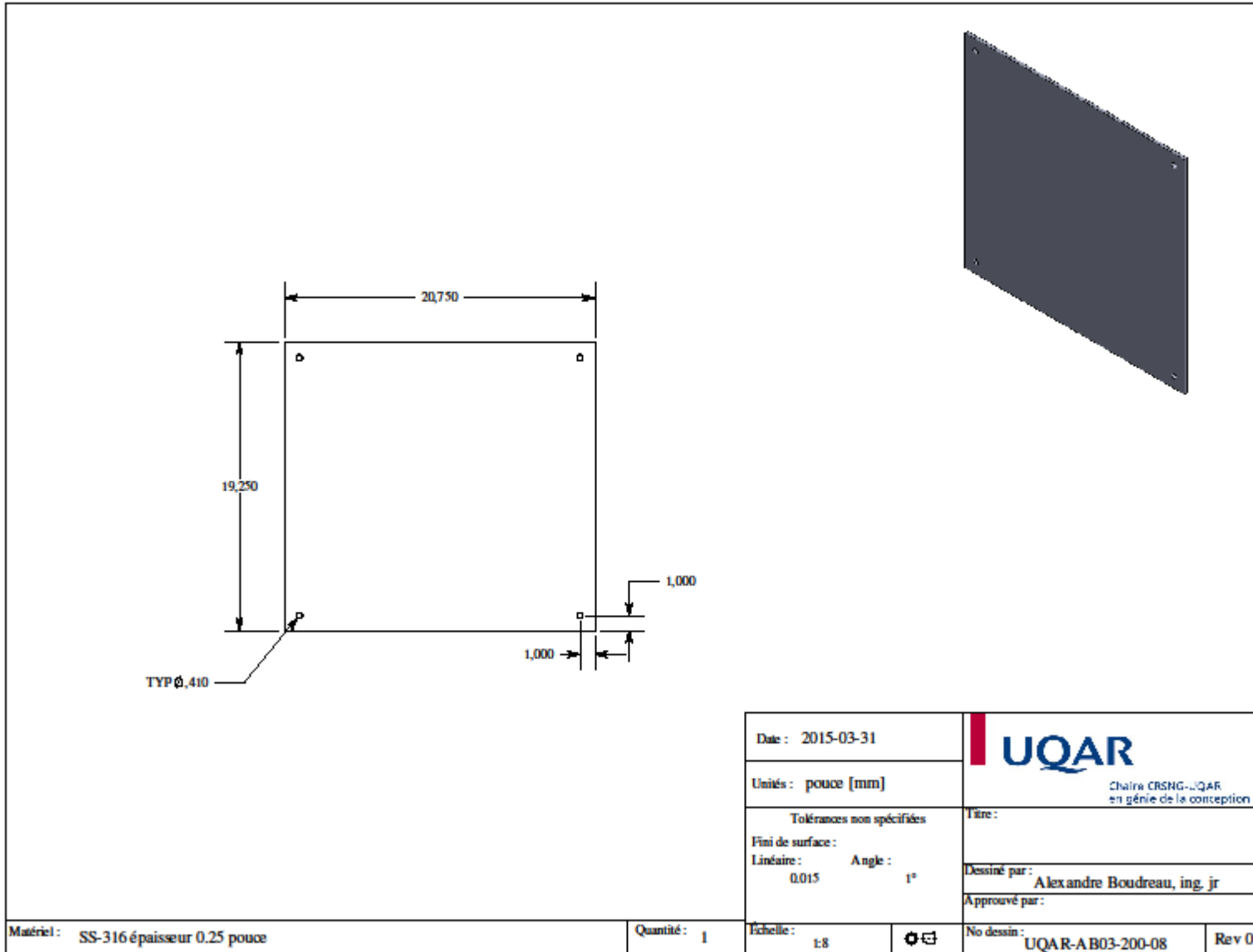


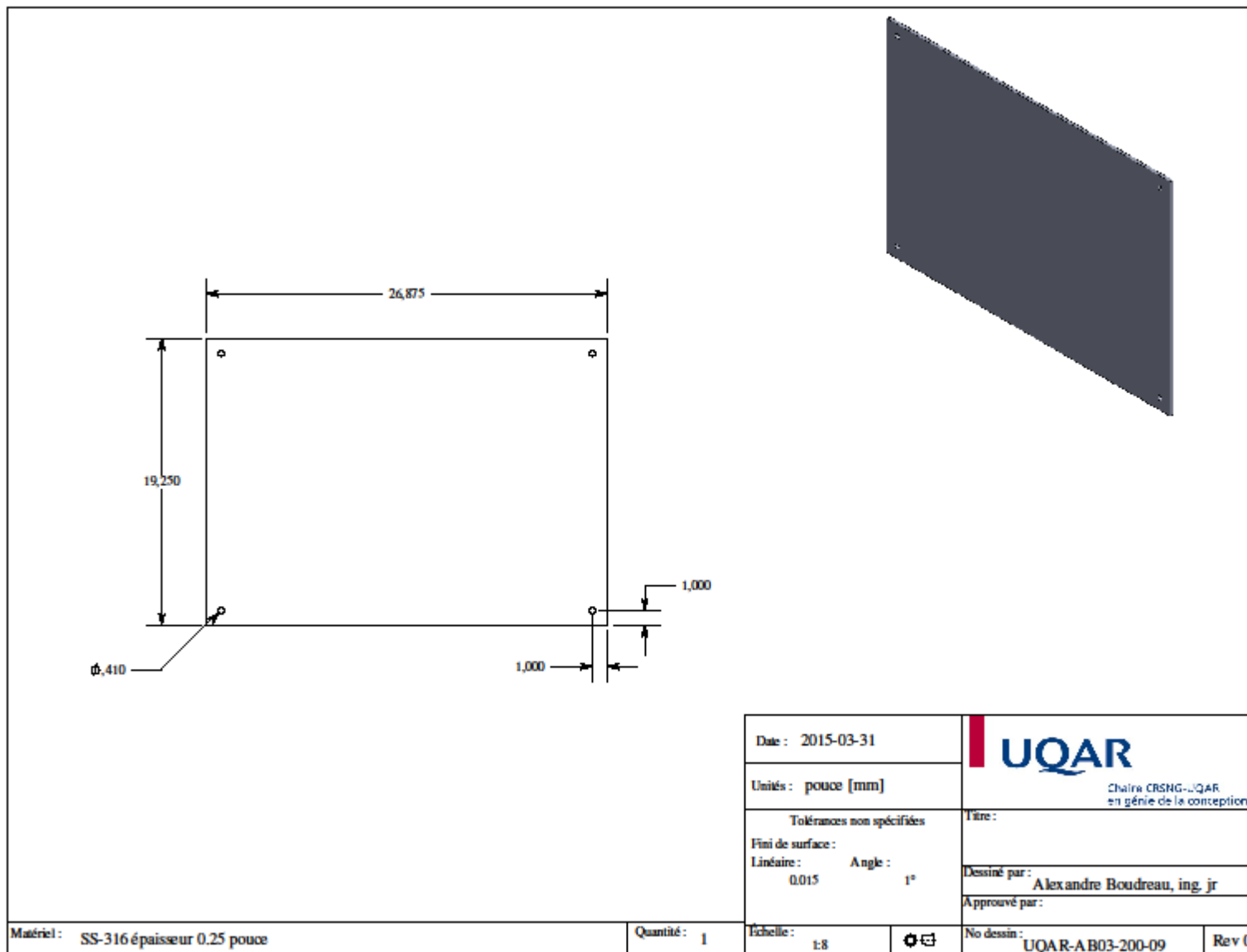


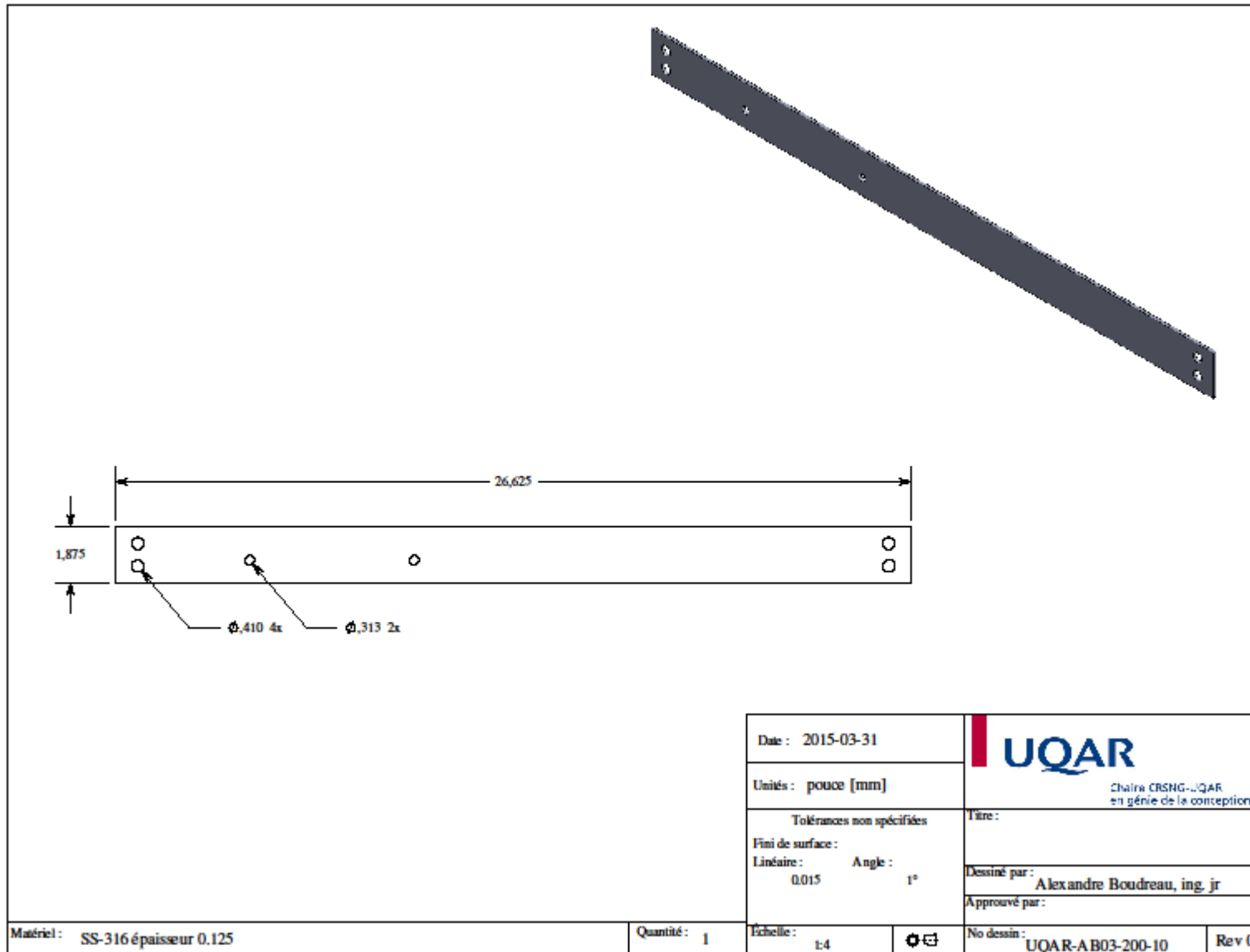


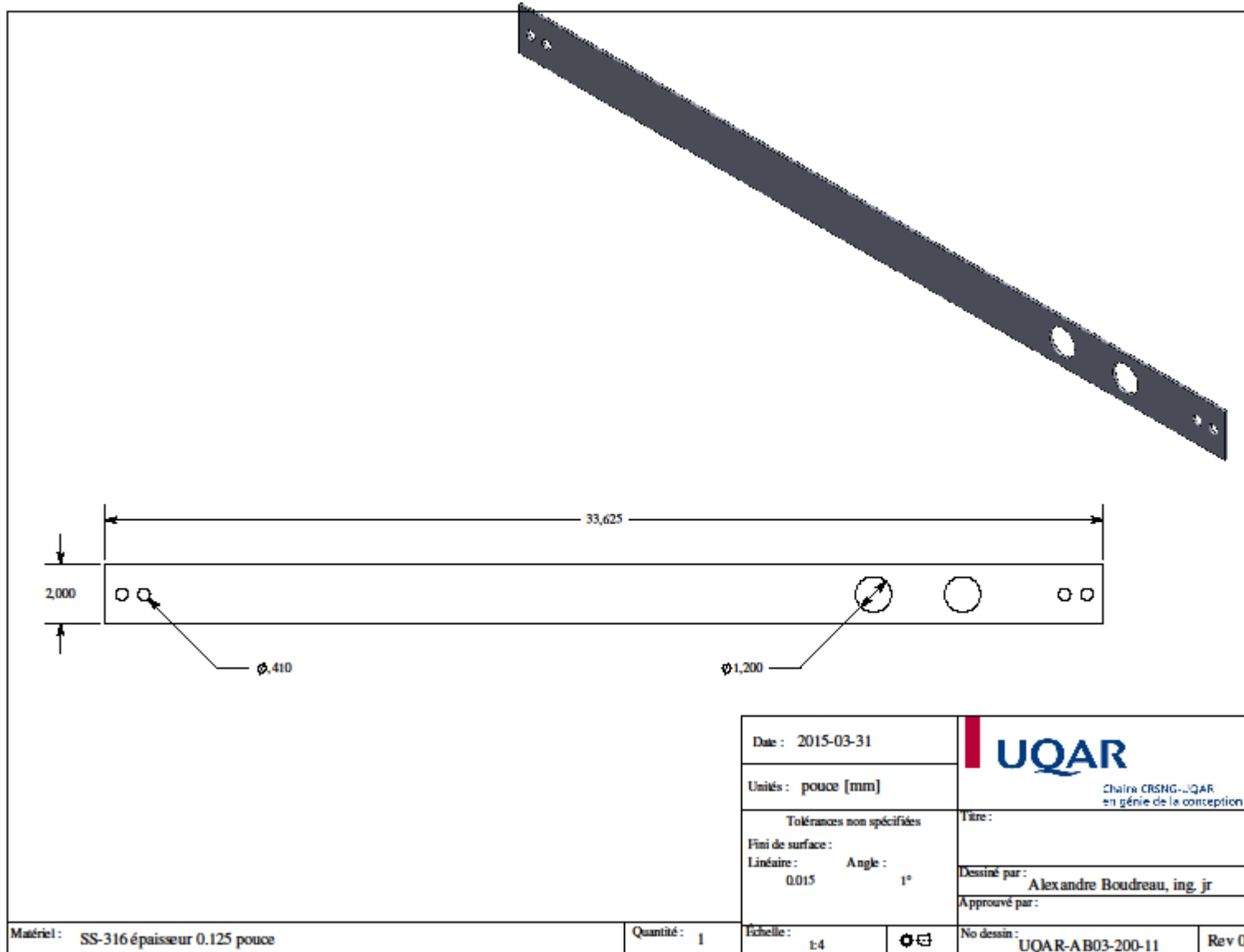






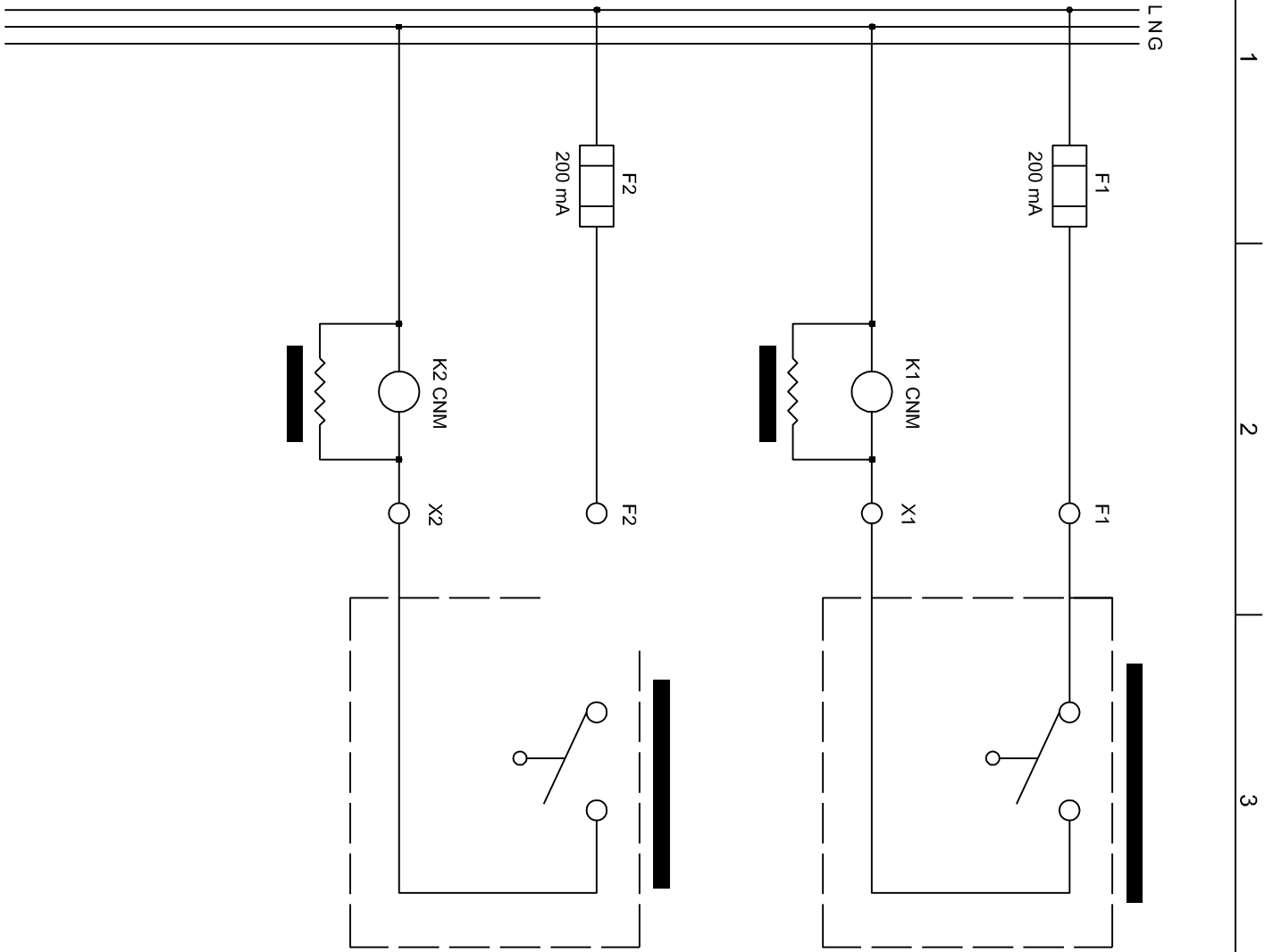






ANNEXE II

Plans électriques– projet application d'un bio-ingrédient



1 2 3 4 5

E

D

C

B

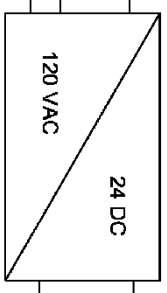
A

[Redacted]	PAGE 1
[Redacted]	
[Redacted]	

1 2 3 4 5

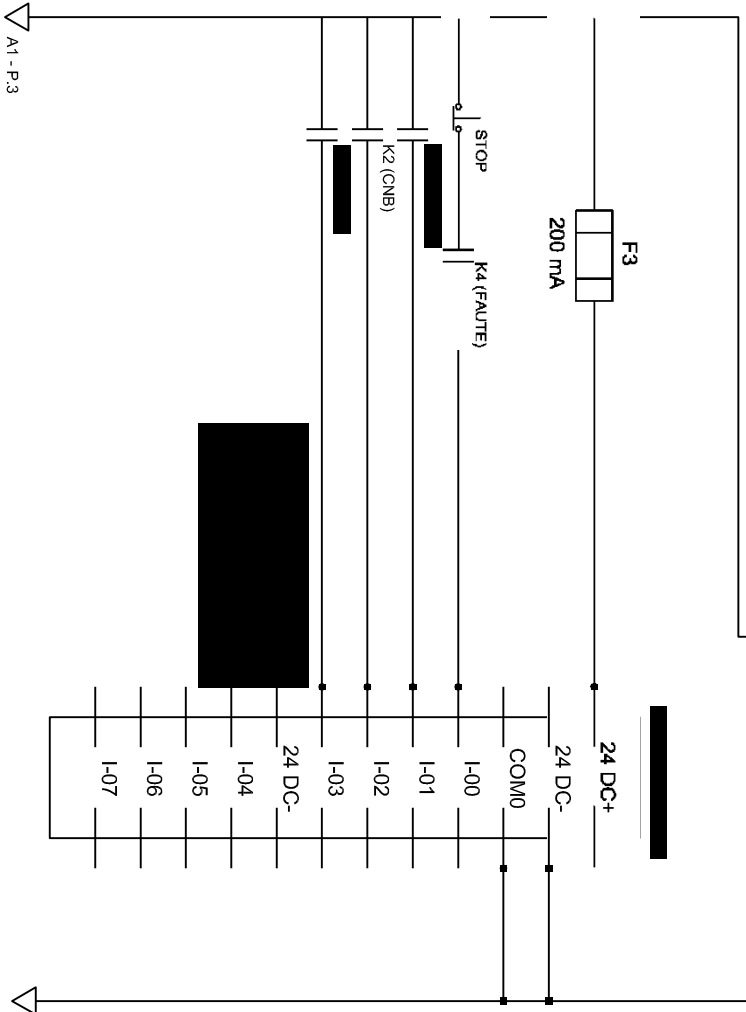
L N G
|||

F0
2.5 A



F4
2.5 A

F3
200 mA



E

D

C

B

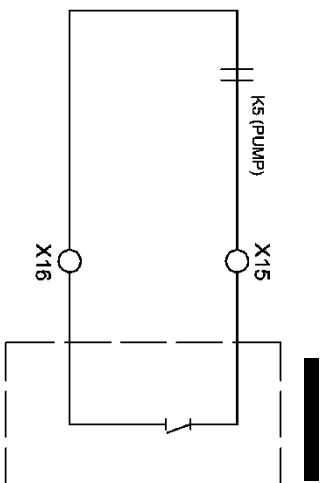
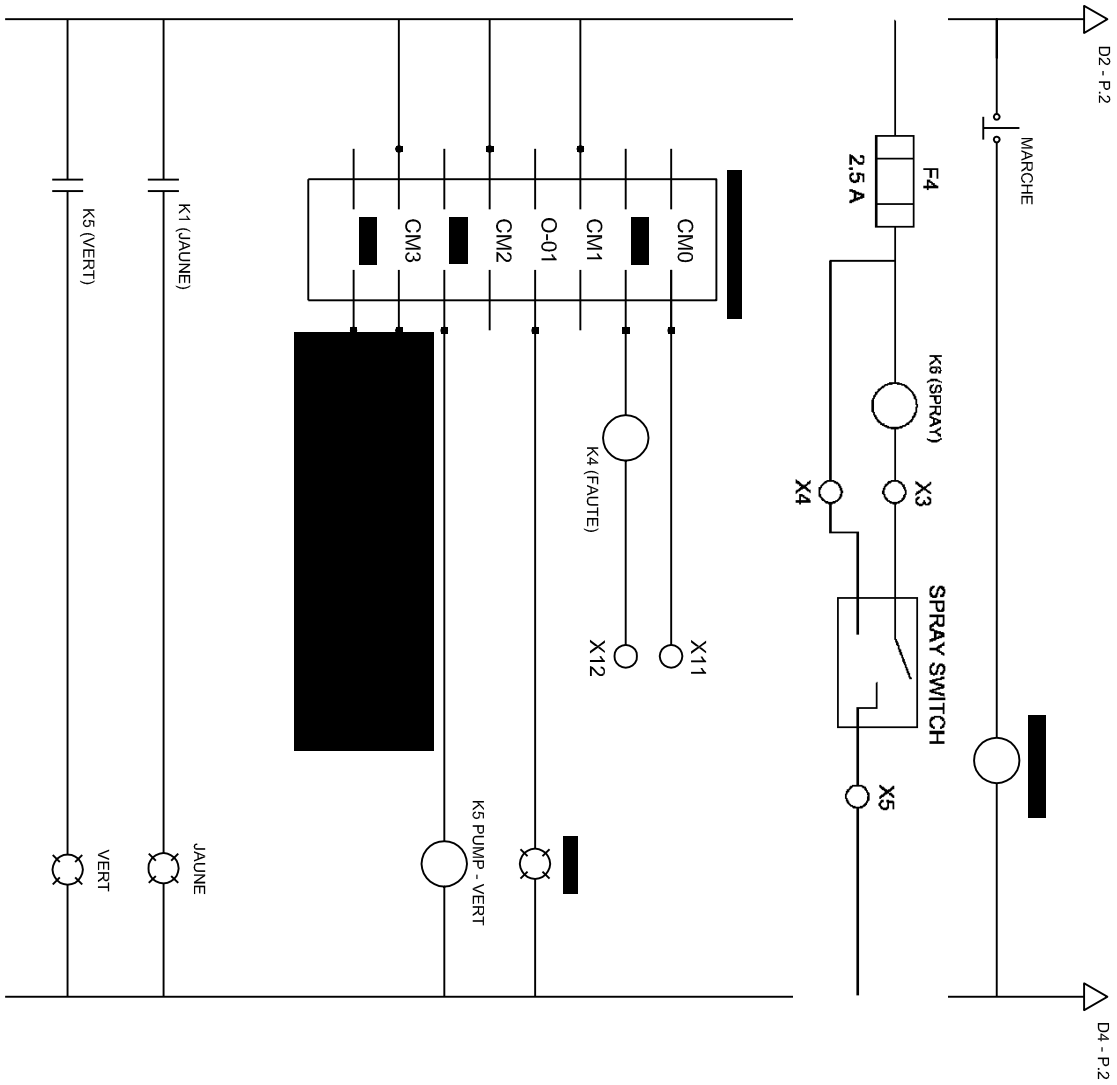
A

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

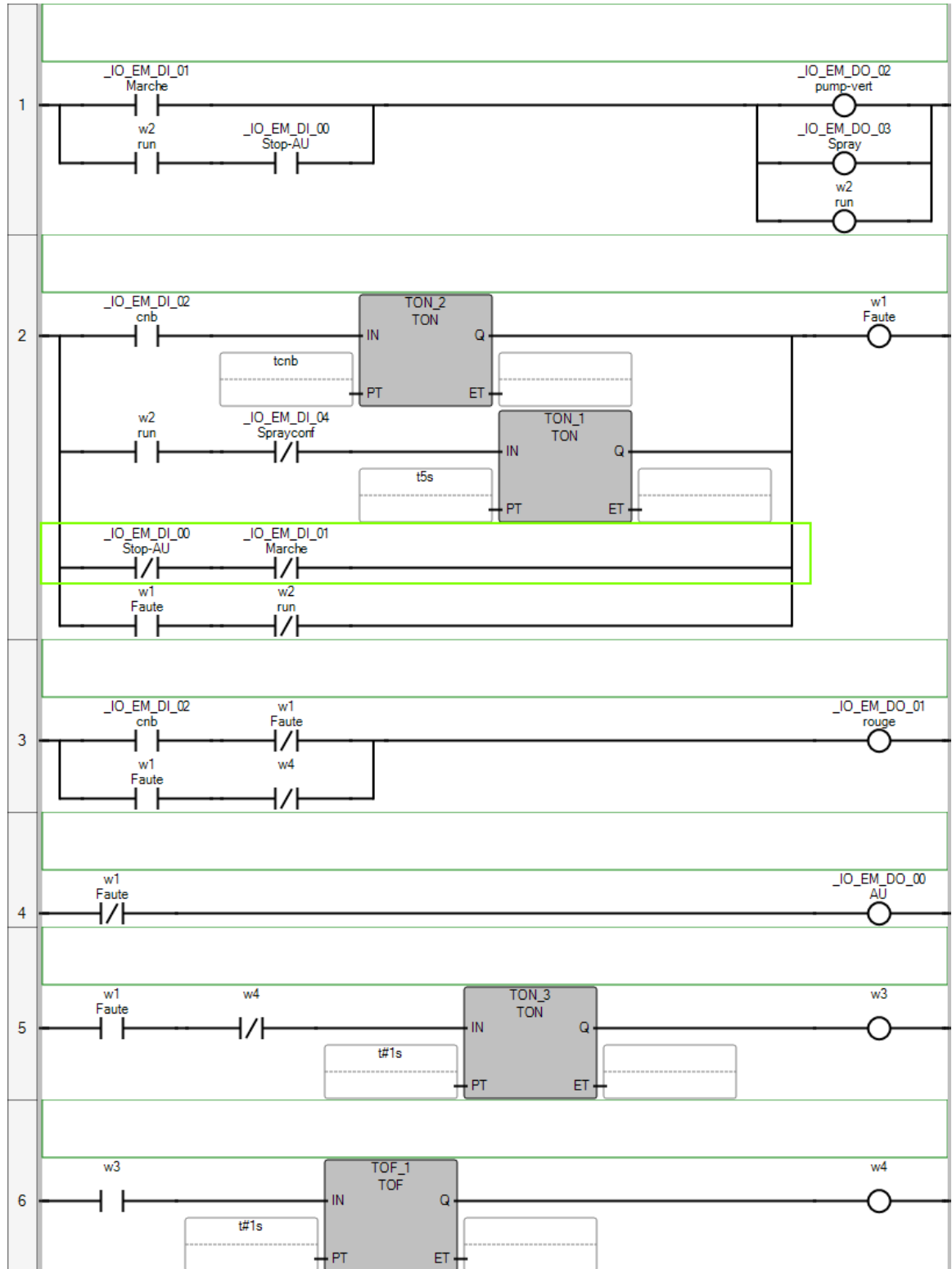
LNG



[Redacted]

[Redacted]

Controller.Micro810.Micro810.Prog1



POU Prog1

Le POU défini 6 variable(s).

Variable TON_1

(* *)

Direction: Var

Type de données: TON Attribut:
Read/Write

Variable t5s

(* *)

Direction: Var

Type de données: TIME Attribut:
Read/Write

Variable TON_2

(* *)

Direction: Var

Type de données: TON Attribut:
Read/Write

Variable tcnb

(* *)

Direction: Var

Type de données: TIME Attribut:
Read/Write

Variable TON_3

(* *)

Direction: Var

Type de données:
Read/Write

TON Attribut:

Variable TOF_1

(* *)

Direction: Var

Type de données:
Read/Write

TOF Attribut:

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AHMAD, A., MAT YASIN, N., DEREK, C. & LIM, J., 2010. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(2011), pp. 584-593.

AMARO, H. M., GUEDES, A. C. & MALCATA, F. X., 2010. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88(2011), pp. 3402-3410.

BAQUERISSE, D. et al., 1998. Modelling of a continuous pilot photobioreactor for microalgae production. *Biotechnology*, 70(1999), pp. 335-342.

BEAUFORT, A. et al., 2007. Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Lett. Appl. Microbiol.*, Volume 44, pp. 406-411.

BORDOLOI, S. & GUERRERO, H. H., 2007. Design for control: A new perspective on process. *International journal of production economics*, 113(2008), pp. 346-358.

BOROWITZKA, M. A. & MOHEIMANI, N. R., 2010. Sustainable biofuels from algae. *Mitig Adapt Glob Change*, 18(2013), pp. 13-25.

BRENNAN, I. & OWENDE, P., 2010. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sustain Energy*, pp. 557-577.

CADORET, J.-P. & BERBARD, O., 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues :. *Société de Biologie*, 202(3), pp. 201-211.

CHANDRA, R., ROHIT, M., SWAMY, Y. & MOHAN, S., 2014. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. *Bioresource Technology*, Volume 165, pp. 270-287.

CHEN, C.-Y. et al., 2010. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel. *Bioresource Technology*, 102(2011), pp. 71-81.

CHEN, X. et al., 2011. Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. *Bioresource Technology*, 102(2011), pp. 6005-6012.

CHOI, S., SUH, I. & LEE, C., 2003. Lumostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rate as a control parameter. *Enzyme Microb. Technol.*, Volume 33, pp. 403-409.

COWARD, T., LEE, J. G. & CALDWELL, G. S., 2013. Development of a foam flotation system for harvesting microalgae biomass. *Algal Research*, 2(2), pp. 135-144.

DEKKERS, R., CHANG, C. & KREUTZFELDT, J., 2013. The interface between ‘product design and engineering’. *International Journal of Production Economics*, 144(2013), pp. 316-333.

DESCHENES, J.-S., SAINT-ONGE, P., COLLIN, J.-C. & TREMBLAY, R., 2012. Extremum Seeking Control of Batch Cultures of Microalgae *Nannochloropsis Oculata* in Pre-Industrial Scale Photobioreactors. *IFAC Proceedings Volumes*, 45(15), pp. 585-590.

DESCHENES, J.-S., TREMBLAY, R. & BOUDREAU, A., 2015. Mixotrophic production of microalgae in pilot-scale photobioreactors: Practicability and process considerations. *Algal Research*, pp. 80-86.

FARBER, J., 1991. *Listeria monocytogenes* in fish products. *J. Food Prot.*, Volume 54, pp. 922-924.

FARBER, J., 2000. Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood products. *Int. J. Food. Microbiol.*, Volume 62, pp. 247-251.

FDA, 2008. *Guidance for Industry: Control of Listeria monocytogenes in Refrigerated or Frozen Ready-To-Eat Foods; Draft Guidance*. Washington: s.n.

FERNANDEZ, B. & FLISS, I., 2016. *Activité anti-Listeria monocytogenes d'un bio-ingrédient à base de Carnobacterium divergens M35 sur le saumon fumé*, Québec: Université Laval, 20 p..

FLISS, I. et al., 2010. *Développement et essai pilote d'un ingrédient biologique pour la bio-conservation à long terme des produits marins fumés*. Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF) éd. Québec: Université Laval.

FLISS, I. & DESCHENES, J.-S., 2011. *Proposition ACCÉLÉRATION*, Québec: Université Laval.

GIRARD, J.-M. et al., 2014. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research*, Volume 5, pp. 241-248.

GRAY, N. F., 2014. *Microbiology of Waterborne Diseases*. Second Edition éd. London: Academic Press.

HEREDIA-ARROYO, T., WEI, W., RUAN, R. & HU, B., 2011. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, 35(2011), pp. 2245-2253.

HERMANN, A., HUBER, F. & BRAUNSTEIN, C., 1999. Market-driven product and service design: Bridging the gap between customer needs, quality management, and customer satisfaction. *International journal of production economics*, 66(2000), pp. 77-96.

HUANG, G., CHEN, F. W., ZHANG, X. & CHEN, G., 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl Energy*, Volume 87, pp. 38-46.

HU, A. & SHELEF, L., 1996. Influence of fat content and preservatives on the behavior of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage. *J Food Saf*, Volume 16, pp. 175-181.

HULATT, C. J. & THOMAS, D. N., 2011. Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology*, 102(2011), pp. 5775-5787.

HU, Q., GUTERMAN, H. & RICHMOND, A., 1996. A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of phototrophs. *Biotechnol*, Volume 51, pp. 51-60.

KAMJUNKE, N., KOEHLER, B. & WANNICKE, N., 2008. Algae as competitors for glucose with. *Journal of Phycology*, 44(2008), pp. 616-623.

LABRIJN, A. F., SCHUURMAN, J., WINKEL, J. G. J. v. d. & PARREN, P. W. H. I., 2010. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *nature biotechnology*, 28(2), pp. 126-128.

LAM, M. K. & Lee, K. T., 2011. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30(2012), pp. 673-690.

LEE, D., 2010. Algal biodiesel economy and competition among bio-fuels. *Bioresource Technology*, 102(2011), pp. 43-49.

LUCK, H., 1962. The use of hydrogen peroxide in milk and dairyproducts. *Milk Hygiene: Hygiene in Milk Production, Processing and Distribution*, pp. 423-447.

MANDALAM, R. K. & PALSSON, B. O., 1998. Elemental Balancing of Biomass and Medium Composition Enhances Growth Capacity in High-Density *Chlorellavulgaris* Cultures. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 59(5), pp. 605-611.

MATA, T., MARTINS, A. & CAETANO, N., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sust Energy*, 14(2010), pp. 217-232.

MOELLERING, E. & BENNING, C., 2009. RNAi silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, Volume 9, pp. 97-106.

NILSSON, L., GRAM, L. & HUSS, H., 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere.. *Int. J. Food Microbiol.*, Volume 38, pp. 217-227.

NILSSON, S. & LINDAHL, M., 2016. A Literature Review to Understand the Requirements Specification's Role when Developing Integrated Product Service Offerings. *Procedia CIRP*, 47(2016), pp. 150-155.

NORSKER, N.-H., BARBOSA, M., VERMUE, M. & WIJFFELS, R., 2011. Microalgal production - a close look at the economics. *Biotechnol*, Volume 29, pp. 24-27.

OGBONNA, J. C., YADA, H. & TANAKA, H., 1995. Light Supply Coefficient: A New Engineering Parameter for Photobioreactor Design. *Fermentation and Bioengineering*, 80(4), pp. 369-376.

PAGNANELLI, F., ALTIMARI, P., TRABUCCO, F. & TORO, L., 2014. Mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oculata*: interaction between glucose and nitrate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Volume 89, pp. 652-661.

PEGALLAPATI, A. K., ARUDCHELVAM, Y. & NIRMALAKHANDAN, N., 2012. Energy-efficient photobioreactor configuration for algal biomass production. *Bioresource Technology*, 126(2012), pp. 266-273.

RAWAT, I., KUMAR, R. R., MUTANDA, T. & BUX, F., 2012. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, 103(2013), pp. 444-467.

RICHMOND, A., 2004. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. 1 éd. Oxford: Blackwell Science Ltd.

SANCHEZ MIRON, A. et al., 2002. Growth and characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme Microb*, Volume 31, pp. 1015-1023.

SCOTT, S. A. et al., 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 21, pp. 277-286.

SINGH, J. & GU, S., 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew Sustain Energy*, Volume 14, pp. 2596-2610.

SINGH, R. & SHARMA, S., 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(2012), pp. 2347-2353.

SING, S. F., ISDEPSKY, A., BOROWITZKA, M. A. & MOHEIMANI, N. R., 2011. Production of biofuels from microalgae. *Mitig Adapt Strateg Glob Change*, 18(2013), pp. 47-72.

SORATANA, K. & LANDIS, A. E., 2011. Evaluating industrial symbiosis and algae cultivation from a life cycle perspective. *Bioresource Technology*, 102(2011), pp. 6892-6901.

TRAN, T. A. & PARK, J. Y., 2013. Development of integrated design methodology for various types of product – service systems. *Journal of Computational Design and Engineering*, 1(1), pp. 37-47.

U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION, 2012. *today in energy*. [En ligne]

Available at: <http://www.eia.gov/>
[Accès le 10 2012].

UGWU, C., AOYAGI, H. & UCHIYAMA, H., 2007. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(2008), pp. 4021-4028.

ULRCH, K. T. & EPPINGER, S. D., 2016. *Product Design and Development*. sixth éd. New-York: McGraw-Hil.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ECONOMIC RESEARCH SERVICE, 2012. *in the news*. [En ligne] Available at: (<http://www.ers.usda.gov/topics/in-the-news/us-drought-2012-farm-and-food-impacts.aspx>) [Accès le 15 octobre 2012].

VASUMATHI, K., PREMALATHA, M. & SUBRAMANIAN, P., 2012. Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(2012), pp. 5443-5450.

WAHIDIN, S., IDRIS, A. & SHALEH, S. R. M., 2012. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp.. *Bioresource Technology*, 129(2013), pp. 7-11.

WANG, B., LAN, C. & HORSMAN, M., 2012. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, 30(2012), pp. 904-912.

WANG, F.-K., YEH, C.-T. & CHU, T.-P., 2016. Using the design for Six Sigma approach with TRIZ for new product development. *Computers & Industrial Engineering*.

WANG, J. & H. YANG, F., 2014. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Volume 172, pp. 3307-3329.

WILLIAMS, J., 2002. Keys to bioreactor selection. *CEP Mag*, pp. 34-41.

XU, L., Weathers, P. J., Xiong, X.-R. & LIU, C.-Z., 2009. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Eng. Life Sci.*, 9(3), pp. 178-189.

ZIMMERMAN, W. B. et al., 2011. Design of an airlift loop bioreactor and pilot scales studies with fluidic oscillator induced microbubbles for growth of a microalgae *Dunaliella salina*. *Applied Energy*, 88(2011), pp. 3357-3369.

