

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre : 17/D3C/2014

N° de série : 07/MIB/2014

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle
En Biotechnologies, Biologie et Environnement/Option: Bioprocédés et
Biotechnologies, Applications Mycologiques

Par : KARA ALI Mounira

Thème

**Isolement et caractérisation de souches levuriennes
des milieux arides productrices de l'éthanol sur
différents substrats**

Jury d'évaluation :

Président de jury: Mr. BOULAHROUF A.
Directeur de thèse : Mr. KACEM CHAOUICHE N.

Prof. Univ. Constantine 1.
Prof. Univ. Constantine 1.

Examineurs: Mr. THONART P.
Mr. LAROUS L.
Mr. HAMIDECHI M.A.
Mr. DEHIMAT L.

Prof. Univ. Liège -Belgique-.
Prof. Univ. Sétif.
Prof. Univ. Constantine 1.
Prof. Univ. Constantine 1.

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2013-2014

Remerciements

*Mes remerciements, avant tout, à **DIEU** tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a données durant toutes ces longues années d'études afin que je puisse arriver à ce stade*

Mes remerciements particuliers à mon promoteur, le Professeur Noredine Kacem Chaouche. Merci pour votre confiance et votre patience. La confiance que m'a témoignée le professeur Noredine Kacem Chaouche, le soutien et les conseils qu'il m'a prodigué tout au long de ce parcours de recherche, ainsi que l'autonomie qu'il m'a laissé, m'ont permis de réaliser cette thèse dans des conditions intellectuelles favorables au questionnement et à l'approfondissement de la pensée. Travailler avec lui est une expérience passionnante, apportant de nouveaux projets régulièrement. C'est un homme que j'estime pour son honnêteté et son humanisme. J'espère pouvoir encore relever de nombreux autres défis avec lui dans les prochaines années.

*Je n'arrive pas à trouver de mots suffisamment forts pour exprimer la reconnaissance que j'ai à l'égard du Professeur **Philippe Thonart** qui m'a donné la chance de travailler dans les centres de recherche qu'il dirige en Belgique, à savoir : le Centre Wallon de Biologie Industrielle et Agrobiotech-Gembloux.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur, **Boulahrouf A.** Professeur au département De Microbiologie de l'université Constantine1 pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter de présider le jury de cette thèse.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Monsieur, **Laarous L**, Professeur au département de Microbiologie de l'université Sétif, pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Messieurs, **Dehimat L.** et **Hamidechi M.A.**, Professeurs à l'Université Constantine 1 trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de participer au jury de soutenance et pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail.*

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité microbienne (LaMyBAM) : Fathia, Mounia, Hamida Asma, Insaf, Hajer, Sara et Imen Pour leur collaboration et serviabilité qu'elles m'ont témoignées durant ces dernières années. Merci pour tous ce que vous avez fait pour moi mes très chères amies...

Plein d'amour et beaucoup de reconnaissance à mes adorables amies, sœurs Mounia et Asma auxquelles j'adresse mes sincères sentiments de gratitude et pour tous ce qu'elles m'ont

apporté que ce soit sur le plan personnel ou professionnels.....Merci mes deux adorables amies

Un remerciement spécial, profond et reconnaissant de tous les efforts fournis par ma chère amie Asma pendant toute la période de préparation de ma thèse. Je n'oublierai jamais tous ce que tu as fais pour moi.

Un remerciement particulier au Dr Nassim Moula, pour son soutien permanent, ses aides précieuses et sa disponibilité permanente à chaque fois j'avais besoin de lui lors de mon séjour en Belgique. Grand merci Nassim

Un Grand merci également à toute l'équipe du Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) et (agrobiotech de Gembloux) qui m'a appris et initié à la réalisation d'une bonne partie de ma thèse

... Merci : Alina, Wissal, Alaa, , Julien, Chi, ...

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents

A mes chers frères et sœurs, Rafik, Farid, wahiba et nadia,

A tous les membres de ma famille

« Je vais te montrer la 1^{ère} lampe de poche à énergie solaire !!!!! Il ne me reste plus qu'un tout petit problème à résoudre : elle ne fonctionne qu'en plein soleil ».

Gaston Lagaffe

Table des matières

1-Introduction.....	01
2- Revue Bibliographique	03
2.1- Sources d'énergie: Bref aperçu.....	03
2.2- La biomasse : une énergie en plein essor	04
2.3- Energies renouvelables, une priorité en Algérie.....	05
2.4- Bioéthanol.....	06
2.4.1- Production du bioéthanol dans le monde.....	06
2.4.2- Utilisation du bioéthanol.....	07
2.4.3- Procèdes de Production du bioéthanol	08
2.4.3.1- Matières premières utilisées.....	08
2.4.3.2- Microorganismes utilisés.....	09
2.5- Inuline.....	13
2.5.1- Généralités.....	13
2.5.2- Enzymes de dégradation d'inuline.....	14
2.5.2.1- Endo-inulinase.....	15
2.5.2.2- Exo-inulinase.....	15
2.5.3- Principales sources microbienne d'inulinase.....	16
2.5.4- Voie de dégradation de l'inuline.....	17
2.6- Le genre <i>Pichia</i>	18
2.6.1- Caractéristiques et taxonomie.....	18
2.6.2- Besoins nutritionnels.....	19
2.6.2.2- Sources d'azote.....	20
2.6.2.3- Oligoéléments et facteurs de croissance.....	20
2.6.2- Mécanismes de production d'éthanol.....	20
2.6.2.1- Métabolisme fermentaire.....	21
2.6.2.2- Métabolisme respiro-fermentaire.....	22
2.7- Le sol	22

2.7.1- Généralités sur le sol.....	22
2.7.2- Caractéristiques du sol aride.....	23
2.7.3- Zones aride en Algérie.....	24
2.7.4- Sol et microorganismes.....	24
2.7.5- Microorganismes des zones arides.....	25
2.8- Modélisation	26
2.8.1- Définition et objectif.....	26
2.8.2- Les modèles non-structurés	26
2.8.2.1- Modélisation de la croissance avec limitation par le substrat.....	27
2.8.2.2- Modélisation de la croissance en présence de produits.....	28
2.8.2.2.1- Modèle de Luedeking et Piret.....	28
3- Matériel et méthodes.....	31
3.1- Echantillonnage.....	31
3.2- Etude climatologique et pédologique.....	32
3.2.1- Etude pédologique.....	32
3.3- Isolement des levures	33
3.3.1- Dilutions.....	33
3.3.2- Ensemencement.....	33
3.3.3- Purification des levures.....	33
3.3.4- Conservation des levures.....	34
3.4- Sélection des levures productrices d'éthanol.....	34
3.5- Identification de l'isolat levurien sélectionné.....	34
3.5.1- Observation macroscopique.....	34
3.5.2- Observation microscopique.....	35
3.5.2.1- Observation à l'état frais.....	35
3.5.2.2- Coloration au bleu de méthylène	35
3.5.2.3- Aptitude à la filamentation.....	35
3.5.3- Identification biochimique (galerie API 20 C AUX).....	35

3.5.4- Identification moléculaire	36
3.5.4.1- Extraction d'ADN	36
3.5.4.2- Amplification des gènes étudiés par PCR.....	37
3.5.4.3- Purification de l'ADN.....	37
3.5.4.4- Séquençage des gènes amplifiés et traitement des séquences.....	38
3.6- Méthode de fermentation.....	38
3.6.1- Production d'éthanol en fiole.....	38
3.6.1.1- Préparation de la pré-culture.....	38
3.6.1.3- Conduite de fermentation.....	38
3.6.2- Sélection de conditions physico-chimiques optimales de production d'éthanol à partir d'inuline.....	39
3.6.2.1- Température.....	39
3.6.2.2- pH	39
3.6.3- Sélection de la concentration optimale d'inuline pour la meilleure production d'éthanol.....	39
3.6.4- Production d'éthanol en fermenteur de 20 litres.....	39
3.6.4.1- Préparation de l'inoculum.....	39
3.6.4.2- Préparation du fermenteur.....	39
3.6.4.3-Évaluation des paramètres de croissance et de production du fructose et d'éthanol.....	40
3.7- Production d'éthanol sur milieu à base de l'artichaut.....	42
3.8- Modélisation	42
3. 9.1- Equations des modèles.....	42
3. 9.1.1- Croissance de la biomasse.....	43
3. 9.1.3- Consommation du substrat : (forme modifiée du modèle de Leudeking et Piret).....	44
3. 9.2- Simulation des systèmes dynamiques.....	44
3. 9.2.1- Logiciel de simulation MatLab.....	44
3. 9.2.2- Résolution numérique des modèles.....	44

3.9.2.3- Discrétisation des équations par la méthode FDTD.....	45
4- Résultats.....	46
4.1- Etude climatologique et pédologique du site d'échantillonnage ...	46
4.1.1- Etude climatologique de la région de Biskra.....	46
4.1.2- Etude pédologique.....	46
4.2-Isolement des levures.....	47
4.3- Sélection des isolats levuriens producteurs de l'éthanol sur divers sucres.....	48
4.3.1-Les pentoses	49
4.3.2- Les hexoses.....	49
4.3.3- Les disaccharides.....	50
4.3.4- Les polysaccharides.....	50
4.4- Identification de l'isolat sélectionné.....	52
IV. 4 .4.1- Identification macroscopique.....	52
4 .4.2- Identification microscopique.....	52
4.4.3- Identification biochimique.....	53
4.4.3.1- Test d'assimilation (galerie API 20 C AUX).....	53
4.4.4- Identification moléculaire.....	53
4.4.4.1- Extraction d'ADN.....	54
4.4.4.2- Amplification de séquences d'ADN-18S et ITS.....	54
4.4.4.3- Séquençage.....	54
4.5- Production d'éthanol par <i>Pichia caribbica</i>	55
4.5.1- Production d'éthanol en fiole de 250ML.....	55
4.5.2 - Sélection des paramètres physico-chimiques optimaux de production d'éthanol	56
4.5.2.1 –Température.....	56
4.5.2.2 - Le pH.....	57
4.5.3- Sélection de la concentration optimale d'inuline pour la production d'éthanol	58

4.5.4- Production d'éthanol en fermenteur de 20 litres	59
4.6- Méthode d'analyse.....	60
4.6.1- Détermination de l'activité inulinasique en fiole.....	60
4.6.2- Détermination de l'activité enzymatique en fermenteur de 20 litres.....	61
4.6.3- Caractérisation partielle de l'inulinase.....	62
4.7- Production d'éthanol sur milieu à base de l'artichaut.....	64
4.7- Modélisation.....	65
4.7.1- Résolution des équations.....	65
4.7.1.1- Modèle de Monod.....	65
4.7.1.2- Modèle de Luderking et Piret.....	66
4.7.1.3- La forme modifiée de Luderking et Piret.....	68
4.7.2.1- Estimation de μ_m et de K_s	70
4.7.2.2- Estimation de γ et de λ	70
4.7.3- Validation des modèles.....	72
4.7.3.1- Modèle de Monod.....	72
4.7.3.2- Modèle de Luedeking et Piret	72
4.7.3.3- La forme modifiée de Luedeking et Piret.....	73
5- Discussion.....	75
6- Conclusion et perspectives.....	84
Résumé.....	86
Abstract.....	86
المخلص	87
Références	88
Annexe	

Liste des figures

Figure 1 Evolution de la production du bioéthanol en millions de litres par région du monde	06
Figure 2 Utilisation potentielle du bioéthanol	07
Figure 3 Schéma explicatif de production du Bioéthanol à partir de plusieurs sources de sucres	09
Figure 4 Structure chimique de l'inuline	13
Figure 5 Réaction générale des enzymes de type glycoside hydrolase	14
Figure 6 Sites de coupure des exo-hydrolase et des endo-hydrolase	15
Figure 7 Sites de coupures des endo et des exo-inulinase	15
Figure 8 Schéma du mécanisme catalytique de l'exo-inulinase d' <i>Aspergillus awamori</i>	17
Figure 9 Division des levures par bourgeonnement.....	18
Figure 10 Cycle de reproduction de la levure.....	19
Figure 11 Voies métaboliques chez les levures	21
Figure 12 Nœud métabolique du pyruvate et de l'acétaldéhyde.	22
Figure 13 Localisation géographique de la région d'échantillonnage (TOLGA).....	31
Figure 14 Site d'échantillonnage : sol humide de palmeraie.....	32
Figure 15 Evaluation d'une dérivée	45
Figure 16 Aspect macroscopique des 9 isolats levuriens obtenus à partir du sol de palmeraie.....	48
Figure 17 Quantité du gaz dégagé par l'isolat L ₅ sur : (A) Glucose; (B) fructose; (C) Inuline ; (D) Saccharose ; (E) Raffinose.....	51
Figure 18 Aspect macroscopique de l'isolat L ₅	52
Figure 19 Observation microscopique de l'isolat L ₅ : (A) Coloration au bleu de méthylène ; (B) bourgeon et (C) Pseudo-mycélium.....	52
Figure 20 Test d'assimilation des substrats carbonés par l'isolat L ₅	53
Figure 21 Migration des bandes d'ADN de l'isolat L ₅ sur gel d'agarose : (a) ITS ; (b) ADN-18S (MM Marqueurs moléculaires).....	54
Figure 22 Séquences finales du gène ITS après avoir été corrigé à l'aide du programme « Bioedit ».....	55
Figure 23 Évolution de la concentration de la biomasse, de la concentration du fructose et de la production d'éthanol par <i>P. caribbica</i> en fiole de 250mL.....	56

Figure 24 Effet de la température sur la production d'éthanol.....	57
Figure 25 Effet du pH sur la production d'éthanol.....	58
Figure 26 Influence de la concentration initiale du substrat sur la production d'éthanol.....	58
Figure 27 Évolution de la concentration de la biomasse, de la concentration du fructose et de la production d'éthanol par <i>P. caribbica</i> en fermenteur de 20 litres.....	60
Figure 28 Evolution de l'activité inulinasique (■) et la concentration de la biomasse (●) pendant la période d'incubation.....	61
Figure 29 Evolution de l'activité inulinasique en fermenteur de 20 litres (■) et la concentration de la biomasse (◆) pendant la période d'incubation.....	62
Figure 30 Influence du pH sur l'activité d'inulinase.....	63
Figure 31 Influence de la température sur l'activité d'inulinase.....	63
Figure 32 Etude de la thermostabilité de l'inulinase de <i>P. caribbica</i>	64
Figure 33 Quantité du gaz dégagé dans la cloche du Durham par <i>P. caribbica</i> sur milieu à base de l'artichaut.....	65
Figure 34 Présentation des équations sous MatLab.....	69
Figure 35 Evolution de la concentration de biomasse pendant le temps : ■, données expérimentales ; ●, données prédites par le modèle de Monod.....	72
Figure 36 Evolution de l'éthanol pendant le temps : ■, données expérimentales ; ●, données prédites par le modèle de Luedeking et Piret.....	73
Figure 37 Evolution de la consommation du substrat pendant le temps : ■, données expérimentales ; ●, données calculées par le modèle modifié de Luedeking- Piret	73

Liste des tableaux

Tableau 1 Souches de levures produisant l'éthanol comme produit majeur de fermentation	11
Tableau 2 Souches de bactéries productrices d'éthanol comme produit majeur de fermentation.....	12
Tableau 3 Plantes riches en inulines	14
Tableau 4 Principales sources microbiennes d'inulinase	16
Tableau 5 Classification taxonomique de <i>Pichia</i>	19
Tableau 6 Développement des microorganismes dans des milieux particuliers	25
Tableau 7 Cas de croissance limité par le substrat pour les levures	27
Tableau 8 Caractéristiques du site d'échantillonnage	32
Tableau 9 Composition de la galerie API 20 C AUX.....	36
Tableau 10 Données climatologiques de la région de Biskra durant la période d'échantillonnage.....	46
Tableau 11 Analyse du sol prélevé à partir d'une palmeraie de la région de Tolga	47
Tableau 12 Isolats levuriens obtenus à partir de différents échantillons du sol	47
Tableau 13 Sélection des isolats levuriens producteurs de l'éthanol sur les pentoses	49
Tableau 14 Sélection des isolats levuriens producteurs de l'éthanol sur les hexoses	49
Tableau 15 Sélection des isolats levuriens producteurs de l'éthanol sur les disaccharides	50
Tableau 16 Sélection des isolats levuriens producteurs de l'éthanol sur des polysaccharides... ..	50
Tableau 17 Paramètres des modèles.....	71

Introduction

1- Introduction

Dans un contexte de protection de l'environnement par la réduction des émissions de gaz à effet de serre et d'accroissement de l'indépendance énergétique, le monde est résolument engagé dans la promotion des énergies renouvelables, et plus particulièrement, des biocarburants (Martin *et al.*, 2002; Melvydas *et al.*, 2006). La production et l'utilisation de ces biocarburants ont donné le jour à de nombreuses critiques quant à la concurrence avec le secteur alimentaire et à l'utilisation des sols à des fins énergétiques (Bento, 2012).

Le bioéthanol est le principal biocarburant qui fait l'objet, aujourd'hui, d'un développement industriel impressionnant. Sa production dans le monde en 2000 a atteint 38 milliards de litre par an (Rosenberger, 2000). Selon les statistiques du RFA, 2011 (Renewable Fuels Association), les deux premiers producteurs de bioéthanol, en l'occurrence : les Etats Unis et le Brésil ont atteint en 2011, une production de 51 milliards de litres (48%) et de 29 milliards de litres (27%), respectivement. Il est à noter, que le continent Africain ne produit que 0.2% du bioéthanol versus 0.4% en Océanie et 5.2% en Europe. Vu la conjoncture économique actuelle et le prix du pétrole qui ne cesse d'augmenter, l'éthanol, produit à partir de la biomasse végétale, apparaît de plus en plus, attrayant et a connu un regain d'intérêt depuis les quinze dernières années (Martin *et al.*, 2002; Melvydas *et al.*, 2006). Les substrats utilisables pour la production d'éthanol sont très variés, le choix dépend du coût et de la rentabilité du procédé. Parmi ces substrats, l'inuline qui est un polysaccharide particulièrement abondant dans les racines de l'artichaut, de la chicorée, des topinambours ou des oignons de dahlias (Singh, 2010).

Une grande variété de microorganismes produit de l'éthanol à partir de polysaccharides (Yuan *et al.*, 2008 ; Sanchez et Cardona, 2008) . Cependant, peu sont, réellement, compétitifs en termes de rendement en éthanol par rapport au substrat consommé, de capacité fermentaire, de tolérance à l'éthanol élevée et d'adaptation aux conditions de fermentation. En revanche, l'originalité de cette étude, repose sur deux points importants, en l'occurrence : la réalisation d'un screening de levure du sol des régions arides et sahariennes qui peuvent développer des potentialités de production d'éthanol ; et la modélisation de la fermentation par l'utilisation des modèles mathématiques (modèle de **Monod**, de **Luedeking et Piret** et la forme modifiée de **Luedeking et Piret**).

À notre connaissance, le présent travail est le premier à avoir caractérisé des souches de levures isolées d'un milieu aride Algérien productrices d'éthanol à partir de l'inuline.

Pour ce faire, une synthèse des principaux événements scientifiques en relation avec les énergies renouvelables, le bioéthanol et la levure du genre *Pichia* a été développée (revue bibliographique). L'étude expérimentale et la partie résultats sont scindées en deux grandes parties ; la première est consacrée à l'isolement, à la sélection et à l'identification de la levure *Pichia caribbica*, la deuxième partie quant à elle, a concerné la modélisation mathématique de la production de la biomasse, la consommation du substrat et la formation du produit en utilisant la levure sélectionnée sur milieu opt. à bas de l'inuline d'origine végétale comme unique source de carbone. Dans cette partie la production en scale up est réalisée (fermenteur de 20 litres). Par conséquent, la capacité de la souche à sécréter de l'Inulinase a été évoquée. Les résultats ont fait l'objet d'une discussion approfondie qui a le mérite de comparer nos résultats à ceux, déjà, développés par des travaux antérieurs. La thèse se termine par une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

Revue
Bibliographique

2- Revue bibliographique

2.1- Sources d'énergie: Bref aperçu

L'énergie est un élément clef de la vie et des transformations qui y sont opérées. Sans énergie, la vie sera beaucoup moins confortable que la plupart de nous, l'imagine, on serait obligé d'aller chercher du bois pour nous chauffer et faire la cuisine, aller chercher de l'eau au puits et se déplacer à pied. Et bien entendu, il n'y aurait ni radios, ni téléviseurs, ni ordinateurs, ni téléphone. Prendre une douche nécessite de l'énergie, nos vêtements et nos chaussures ont, également, été fabriqués grâce à l'énergie, et le jour ne fait que commencer (Westra et Kuyvenhoven, 2002). Avant le 20^{ème} siècle, l'énergie était essentiellement utilisée à des fins domestiques et était fournie par le bois, alors que, les sources d'énergie, dites ressources fossiles ont vu le jour au cours du 20^{ème} siècle (Attar, 2013). Il s'agit des combustibles fossiles non renouvelables tels que le charbon, le pétrole, le gaz naturel et l'uranium. Ce sont les ressources dont les réserves disparaissent au fur et à mesure qu'on les utilise. Elles sont formées de substances qui mettent des millions d'années à se reconstituer (Anonyme1, 2006). Au cours des 150 dernières années, beaucoup de combustibles fossiles ont été brûlés, ce qui a dégagé d'énormes quantités de CO₂ dans l'atmosphère (Mons, 2005 ; Martin *et al.*, 2002; Melvydas *et al.*, 2006). En effet, la concentration de CO₂ dans l'air a augmenté de 35% depuis 1800. Cette augmentation rapide du CO₂ n'a pas donné une chance à l'écosystème de s'adapter, cela risquerait de mener à l'extinction de plusieurs espèces de plantes et d'animaux. Au cours du siècle dernier, la température moyenne sur terre a augmenté de 0,6°C et le niveau de la mer a monté de 10 à 25 cm. il paraît qu'une augmentation de la température de quelques degrés n'est pas dramatique, mais c'est en fait un véritable problème. Tout d'abord, la montée du niveau de la mer causée par quelques degrés provoque déjà des problèmes au niveau du littoral. Par ailleurs, les changements de température assisteront, plus souvent, à des manifestations météorologiques extrêmes: inondations, sécheresses et ouragans (Westra et Kuyvenhoven, 2002). Depuis une vingtaine d'années, tous les pays du monde, surtout, ceux fortement dépendants de l'énergie ont pris conscience des dangers provoqués par la consommation des énergies fossiles et leur épuisement à moyen ou à long terme, et cherchent à développer des ressources de substitution à travers les énergies renouvelables (Attar, 2013). Comme leur nom l'indique, ces énergies se renouvellent constamment et ne s'épuiseront donc jamais. Les énergies renouvelables sont issues de plusieurs sources, en l'occurrence : le soleil (énergie solaire), le vent (énergie éolienne), l'eau (énergie hydraulique), les sources chaudes (énergie géothermique) et la biomasse (Walker et Jenkins, 1997 ; Robyns et Bastard, 2004).

Les sources d'énergies renouvelables ont, fortement, augmenté pour représenter, selon les estimations, 16,7 % de la consommation énergétique finale mondiale en 2010, et ont continué de progresser sensiblement durant 2011, dans l'ensemble des secteurs de la consommation: l'électricité, le chauffage, le refroidissement, et le transport (Anonyme 2, 2012).

2.2- La biomasse : une énergie en plein essor

La biomasse désigne l'ensemble de la matière organique d'origine végétale et animale. Elle fut la source d'énergie la plus exploitée par l'homme. Son utilisation remonte à la maîtrise du feu, il y a environ 450 000 ans. La biomasse a été définie dans la Directive 2009/28/CE du Parlement européen et du Conseil relative à l'énergie produite à partir de sources renouvelables comme suit : « la fraction biodégradable des produits, des déchets et des résidus d'origine biologique provenant de l'agriculture (y compris les substances végétales et animales), de la sylviculture et des industries connexes, y compris la pêche et l'aquaculture, ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et municipaux » (Barchmann *et al.*, 2012). Le principe d'obtenir de l'énergie à partir de la biomasse consiste à transformer des matières ou déchets renouvelables d'origine végétale ou animale en énergie en les brûlant, en les laissant pourrir (fermentation), ou en les transformant chimiquement.

L'incinération en tant que combustible du bois, des déchets agricoles, domestiques, ou industriels, est largement utilisée à travers tous les pays, pour produire de la chaleur essentiellement dans la mesure où une tonne de déchets organiques secs équivaut à une tonne de charbon. Par ailleurs, la digestion anaérobie de la biomasse produit du méthane, appelé fort justement « biogaz » et la fermentation microbienne des sucres contenus dans les plantes riches en sucre (betteraves, topinambours, canne à sucre, etc.) ou en amidon (pomme de terre, maïs, manioc) ou encore dans les plantes ligneuses (bois, paille, etc.) produit de l'alcool, dit « bioéthanol » (Mogg, 2004). En outre, les huiles végétales carburants (colza, tournesol, coprah, palme, arachide, etc.) peuvent être utilisées après avoir été pressées à froid. Elles sont utilisées à 100 % comme biocarburant pour tous les moteurs diesel (inventé à l'origine pour ce type de carburant), avec quelques modifications mineures visant à réchauffer le carburant en question, ou, sans modification, en les mélangeant avec du gazole ordinaire (30 % sur tous les véhicules, et jusqu'à 50 % selon les cas). Enfin, les esters sont issus du mélange d'huile de graines oléagineuses (soja et colza par exemple) avec alcool, en effet, diester communément connu sous la nomination « biodiesel » est, en fait, issu de la transformation des huiles

végétales en question, selon une réaction physico-chimique appelée trans estérification (Attar, 2013).

2.3- Energies renouvelables, une priorité en Algérie

Il est certain qu'au même titre que toutes les autres régions du monde, seules les énergies renouvelables pourront assurer les besoins futurs d'Algérie qui seront, certainement, trois à quatre fois supérieurs par rapport à aujourd'hui du fait du développement économique et démographique, en plus, des besoins en ressources d'eau qu'elle connaît ces dernières années.

La consommation Algérienne en produits énergétiques est, actuellement, d'une tonne équivalent pétrole par an et par habitant. Le marché intérieur de gaz naturel (tout compris) consomme actuellement environ 26 milliards de M³ par an et croît de 6 à 7% par an. Par ailleurs, la consommation globale d'électricité est prévue d'être doublée d'ici l'an 2020. Il s'agit là, par conséquent, d'un véritable défi à relever, et l'Algérie possède, non seulement, les moyens humains et financiers pour s'y préparer mais aussi, les ressources naturelles renouvelables nécessaires. L'Algérie dispose de 3000 heures d'ensoleillement par an, soit un potentiel d'environ 170.000 Tera Watta heures (TWh), par an, ce qui est l'équivalent de 5000 fois la consommation algérienne en électricité. Les vitesses moyennes de 3 à 6 mètres par seconde enregistrées au sud d'Algérie sont considérées un potentiel appréciable pouvant alimenter des besoins domestiques dans les sites isolés. En matière d'énergie géothermique, l'Algérie dispose aussi d'un potentiel de 200 sources chaudes dans la partie Nord du pays (45°C à 98°C) et 1500 GWH d'énergie hydraulique, soit 6% des capacités de production d'électricité actuelles. (Attar, 2013). En matière de biomasse, l'Algérie est un pays semi-désertique qui ne dispose pas non plus de grandes exploitations forestières ou agricoles de type industriel. En revanche, selon le président de l'Organisation de l'Agriculture du Sahara par l'intégration et la distribution (Oasis), Brahim Zitouni, l'Algérie a de fortes potentialités qui lui permettent de devenir parmi les plus grands pays producteurs de bioéthanol à partir de dattes.

2.4- Bioéthanol

2.4.1- Production du bioéthanol dans le monde

Plusieurs éléments ont contribué à une extension et à une généralisation de la production agricole du bioéthanol dans le monde, en particulier, dans les pays industrialisés, à partir de 2000, parmi lesquels on cite : la hausse des prix du pétrole, l'approche du pic de la production de pétrole, la lutte contre le changement climatique et la surproduction agricole.

La production du bioéthanol a augmenté dans le monde, durant la période de 2007 à 2011, avec une production, demeurant, faible dans l'UE27 par rapport à la production au Brésil et surtout aux Etats-Unis. La production mondiale est, selon Hanne, (2012), en constante augmentation sur cette période, de 72 milliards de litres en 2007 à 106 milliards de litres environ en 2011, soit une augmentation de 47% en 5 ans. Les deux premiers producteurs de bioéthanol sont, en l'occurrence : les Etats Unis et le Brésil. En effet, la production a atteint en 2011, 51 milliards de litres (48%) et 29 milliards de litres (27%), respectivement (figure 1). Il est à noter que le continent Africain ne produit que 0.2% du bioéthanol versus 0.4% en Océanie et 5.2% en Europe, selon les statistiques du RFA, 2011 (Renewable Fuels Association).

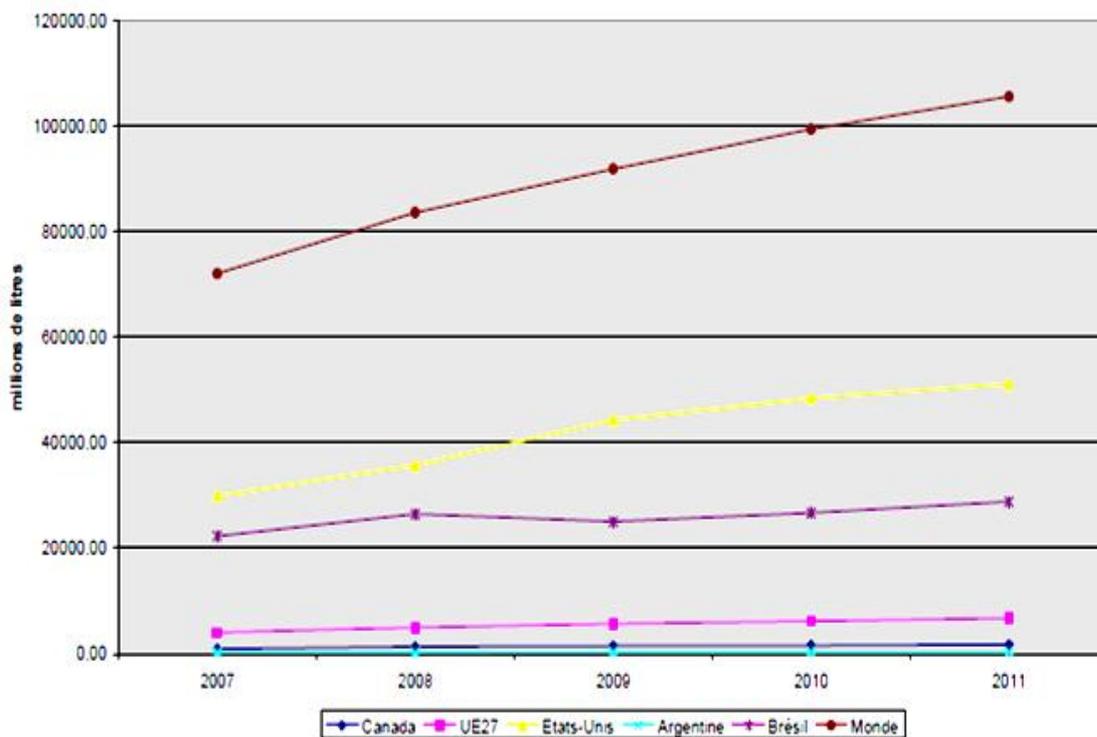


Figure 1 Evolution de la production du bioéthanol en millions de litres par région du monde (Source OCDE, 2012).

2.4.2- Utilisation du bioéthanol

Le bioéthanol peut être utilisé, sous certaines conditions, comme carburant dans les moteurs à essence, soit de 5 à 20% dans les moteurs à essence sans modification et/ou de 85 à 100% dans des moteurs à essence spécifiquement adaptés. En outre, l'éthanol peut être converti en divers produits de base de l'industrie chimique, tels, l'éthylène et l'éther éthyle tertio-butyle (ETBE), conventionnellement, produits à partir du pétrole (figure 2). Il est à signaler que le plastique résulte de la polymérisation de l'éthylène et de l'ETBE mélangé à raison de 15% à l'essence, permet d'augmenter l'indice d'octane du carburant, contrairement à l'éthanol, il ne favorise pas l'évaporation des carburants et n'absorbe pas l'humidité de l'air (Escobar *et al.*, 2009).

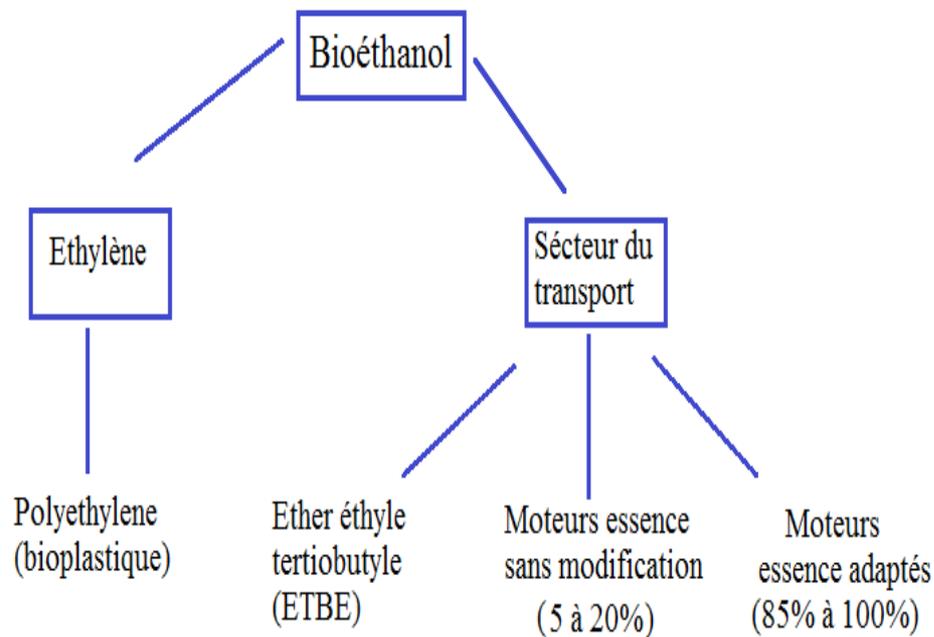


Figure 2 Utilisation potentielle du bioéthanol (Demirbas, 2008).

2.4.3- Procèdes de Production du bioéthanol

2.4.3.1- Matières premières utilisées

L'éthanol est un alcool éthylique qui peut être produit par synthèse à partir des hydrocarbures et/ou à partir de biomasse. Seulement, la transformation de cette dernière par voie microbienne peut produire ce qu'on appelle le « bioéthanol ». L'éthanol est obtenu après fermentation des plantes riches en sucres à l'aide de microorganismes (levures, bactéries, etc.) (Koga, 2008).

A- Matières riches en polysaccharides

Actuellement, il y a une légère prédominance de la production de bioéthanol, à base de matériaux amylacés (53% du total), comme le maïs, le blé et d'autres céréales et grains. Dans ces cas, la technologie de conversion commence généralement par la séparation, le nettoyage et la mouture du grain. Ensuite, l'amidon est converti typiquement en sucres au moyen d'un processus enzymatique à haute température (Ohta *et al.*, 2007). Les sucres libérés seront alors, fermentés par des levures et le liquide résultant sera distillé pour la séparation du bioéthanol (figure 3). Il est intéressant, de signaler que les matières premières riches en inuline (polymère de fructose) constituent une source importante de fructose obtenu sous l'action de l'inulinase (Jose, 1999) produite par divers microorganismes. Comme l'objectif principal de cette thèse est de caractériser la production d'éthanol à partir d'inuline par une souche de levure isolée d'écosystèmes locaux, les informations concernant l'inuline, l'inulinase et les microorganismes producteurs de cette enzyme seront évoquées plus loin dans ce manuscrit

B- Matières riches en sucres simples

La canne et la betterave, sont des végétaux qui englobent énormément de sucre simples. Ils sont obtenus par un processus se basant sur l'extraction au moyen de la mouture ou de la diffusion, et qui pourront être soumis directement à une fermentation. Après la fermentation, le liquide est distillé (figure 3). Il est à noter que le bioéthanol dit « de première génération » est issu de la fermentation des matières premières qui peuvent être utilisées dans une chaîne alimentaire animale ou humaine. En revanche, l'éthanol issu de la fermentation des matières cellulosiques telles que le bois, les feuilles et les tiges des plantes ou celles issues de déchets est qualifié de la deuxième génération (Fujita *et al.*, 2003).

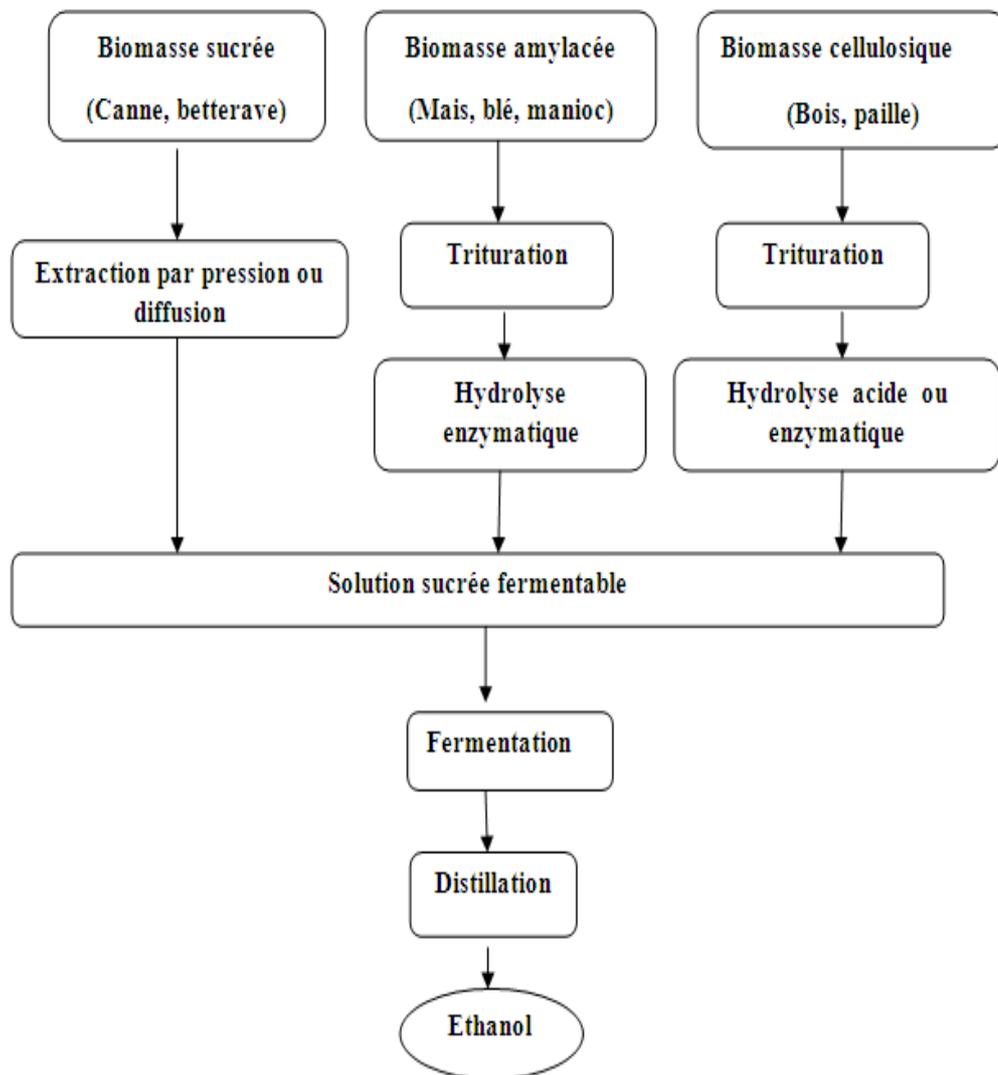


Figure 3 Schéma explicatif de production du bioéthanol à partir de plusieurs sources de sucres. Source : Élaboration de Luiz Augusto Horta Nogueira.

2.4.3.2- Microorganismes utilisés

Deux types de microorganismes interviennent lors du processus de production d'éthanol, en l'occurrence : ceux qui catalysent l'hydrolyse des polysaccharides en sucres fermentescibles et ceux qui convertissent ces derniers en éthanol (Ohta *et al.*, 1993 ; Nakamura *et al.*, 1996). Par ailleurs, il est à signaler, que certains microorganismes ont la capacité d'effectuer les deux types de réactions en même temps (Yuan *et al.*, 2008).

A- Microorganismes hydrolysant les polysaccharides

Etant donné que la biomasse renferme des sources complexes tels que ; les feuillus et les résineux, les résidus agricoles comme la canne de maïs et les déchets des papiers non recyclable, le développement d'un prétraitement idéal, dans ce cas, reste compliqué et difficile. Ces diverses matières premières ont mené les chercheurs à tester de nombreux procédés allant de l'usage de l'eau chaude et les traitements d'explosion à la vapeur, au prétraitement aux acides, aux bases et aux solvants (Sun et Cheng, 2002). Toutefois, la désintoxication de la lignine hydrolysée à l'acide présente des coûts supplémentaires pour le processus d'hydrolyse en comparaison aux procédés enzymatiques.

L'amidon a été toujours hydrolysé en dextrines et glucoses en utilisant les acides, cependant les enzymes s'avèrent présenter beaucoup plus d'avantages. En effet, la spécificité des réactions enzymatiques permet l'obtention de sucres ayant des propriétés physicochimiques bien définies et l'hydrolyse enzymatique est douce et engendre moins de brunissement (Hsu, 1996).

La capacité des levures à produire l' α -amylase et la glucoamylase a été abordée dans plusieurs rapports. Celles-ci incluent *Candida tsukubaensis* CBS 6389, *Filobasidium capsuligenum* (Aktinson et Mavituna, 1991), *Lipomyces kononenkoae* (de Mot et Verachtert, 1985), *Lipomyces starkeyi* (Spencer- Martins et Van Uden, 1979), *Saccharomycopsis bispora* (Kelly et al., 1985), *Saccharomycopsis capsularis*, *Saccharomycopsis fibuligera* (Ebertova, 1966; Stepanov et al., 1975), *Schwanniomyces castelli* (Simoës-Mendes, 1984), et *Trichosporon pullulans* (Silla et al., 1984). Par ailleurs, les enzymes cellulolytiques indispensables à l'hydrolyse de la lignocellulose sont produites par *Trichoderma reesei*. Ce champignon est apte à métaboliser les pentoses et les hexoses, de plus, il est insensible aux molécules inhibitrices générées dans les matériaux lignocellulosiques (Sharma, 2000).

B- Microorganisme producteurs d'éthanol

Plusieurs rapports et articles de revue ont été publiés sur la fermentation alcoolique effectuée par les levures (tableau 1). Cependant, *Saccharomyces cerevisiae* qui se développe sur des milieux à base de sucres simples et/ou disaccharides, est reconnu comme un agent qui ne représente aucun risque sur la santé humaine. En plus, cette espèce reste la première à être exploitée en industrie à travers le monde, grâce à sa résistance aux conditions de production et aux conditionnements industriels.

Tableau 1 Souches de levures produisant l'éthanol comme produit majeur de fermentation (Lin et Tanaka, 2006)

Levures	Source de carbone (g/L)	Source d'azote (g/L)	Concentration de l'éthanol (g/L)	Références
27817 <i>S. cerevisiae</i>	Glucose (50- 200)	Peptone (2), sulfate d'ammonium (4)	(5,1-91,8)	Vallet <i>et al.</i> , (1996)
30017 <i>K.fragilis</i>	Glucose (20- 120)	Peptone (2), sulfate d'ammonium (4)	48,96 (max)	Vallet <i>et al.</i> , (1996)
30016 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Glucose (100)	Peptone (2), sulfate d'ammonium (4)	44,4 (max)	Vallet <i>et al.</i> , (1996)
30091- <i>Candida utilis</i>	Glucose (100)	Peptone (2), sulfate d'ammonium (4)	44,4 (max)	Vallet <i>et al.</i> , (1996)
27774- <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Glucose (20- 120)	Peptone (2), sulfate d'ammonium (4)	48,96(max)	Vallet <i>et al.</i> , (1996)
30017- <i>Kluyveromyces fragilis</i>	Glucose (20- 120)	Peptone (2), sulfate d'ammonium (4)	48,96(max)	Vallet <i>et al.</i> , (1996)
<i>S. cerevisiae</i>	Sucre (150-300)	--	53 (max)	Roukas, (1996)
<i>S. cerevisiae</i>	Saccharose (220)	Peptone(5), dihydrogène phosphate d'ammonium (1,5)	96,71	Caylak et Vardar, (1996)
L-041- <i>S. cerevisiae</i>	Saccharose (100)	Sulfate d'ammonium (24)	50 (max)	Leticia <i>et al.</i> , (1997)
ATCC-32691 <i>Pachysolen tannophilus</i>	Glucose(0-25), xylose (0-25)	Peptone(3,6), sulfate d'ammonium (3)	7,8 (max)	Sanchez <i>et al.</i> , (1999)
ATCC-24860 <i>S.cerevisiae</i> (aérobie)	Molasse (1,6- 5)	sulfate d'ammonium (0,72- 2)	(5-18,4)	Ergun et mutlu, (2000)
CMI237- <i>S. cerevisiae</i>	Sucre (160)	sulfate d'ammonium (0,5)	70(max)	Navarro <i>et al.</i> , (2000)
V5- <i>S. cerevisiae</i>	Glucose (250)	--	--	Virginnie <i>et al.</i> , (2001)
181 <i>S.cerevisiae</i> (aérobie)	Glucose (10)	Peptone (5)	--	Todor et Tsonka, (2002)
A3- <i>S.cerevisiae</i>	Galactose (20- 150)	Peptone,Sulfate d'ammonium, casamino acide (10)	(4,8- 36,8)	Da Cruz <i>et al.</i> , (2003)
L52- <i>S.cerevisiae</i>	Galactose (20- 150)	Peptone,Sulfate d'ammonium, casamino acide (10)	(2,4- 32)	Da Cruz <i>et al.</i> , (2003)
GCB-K5- <i>S.cerevisiae</i>	Saccharose (30)	Peptone (5)	27	Kiran <i>et al.</i> , (2003)
GCA-II- <i>S.cerevisiae</i>	Saccharose (30)	Peptone (5)	42	Kiran <i>et al.</i> , (2003)
KR- ₁₈ <i>S.cerevisiae</i>	Saccharose (30)	Peptone (5)	22,5	Kiran <i>et al.</i> , (2003)
2399- <i>S.cerevisiae</i>	Glucose (31,6)	Urée (6,4)	13,7 (max)	Yu et Zhang, (2004)

Par ailleurs, la production de l'éthanol à partir du glucose peut être effectuée par diverses bactéries (tableau 2). En effet, la bactérie *Zymomonas mobilis*, vue sa sensibilité aux conditions de fermentation, est beaucoup moins exploitée en plus, elle ne fermente que le glucose, le fructose et le sucrose. En revanche, *E. coli* est très exploitée car, elle présente plusieurs avantages incluant la capacité de fermenter un large spectre de sucres, l'indépendance de point de vue de facteurs de croissance complexes et l'adaptation aux conditions industrielles (exemple, son utilisation dans la production des protéines recombinantes). Cependant, certains inconvénients déclassent cette bactérie au profit des levures, dans le domaine de bioindustrie, en particulier, sa résistance insignifiante et la perception du public pour son danger imminent (Lin et Tanaka, 2006).

Tableau 2 Souches de bactéries productrices d'éthanol comme produit majeur de fermentation (Lin et Tanaka, 2006)

Bactéries	Concentration de l'éthanol (Mmol éthanol/Mmol glucose)	Références
<i>Clostridiumindoli</i> (pathogène)	1,96	Miyamoto,(1997)
<i>Clostridium sphenoides</i>	1,8	Miyamoto,(1997)
<i>Clostridium sordelli</i> (pathogène)	1,7	Miyamoto,(1997)
<i>Zymomonas mobilis</i>	1,9	Miyamoto,(1997)
<i>Zymomonas mobilis</i> <i>subsp.pomaceas</i>	1,7	Miyamoto,(1997)
<i>Spirochaetaaurantia</i>	1,5	Miyamoto,(1997)
<i>Spirochaetastenostrepta</i>	0,84	Miyamoto,(1997)
<i>Spirochaetalitoralis</i>	1,1	Miyamoto,(1997)
<i>Erwiniaamylovora</i>	1,2	Miyamoto,(1997)
<i>Leuconostocmesenteroides</i>	1,1	Miyamoto,(1997)
<i>Streptococcus lactis</i>	1,0	Miyamoto,(1997)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	24 g /L	Ingram <i>et al.</i> ,(1998)
<i>Escherichia coli</i> LY01	40-50 g /L	Dienet <i>al.</i> ,(2003)
<i>Escherichia coli</i> KO11	0,7-0,1	Dienet <i>al.</i> ,(2003)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,94-0,98	Matthew <i>et al.</i> , (2005)

En revanche, la production de l'éthanol à partir de la cellulose peut être effectuée par certaines moisissures incluant *Monilia sp.* (Saddler et Chan, 1982), *Neurospora crassa* (Gong *et al.*, 1981), *Neurospora sp.* (Yamauchi *et al.*, 1989), *Trichoderma viride* (Ito *et al.*, 1990), *Paecilomyces sp.* (Gervais et Sarrette, 1990), *Zygosaccharomyces rouxii* (Pastore *et al.*, 1994) et *Aspergillus sp.* (Sugawara *et al.*, 1994),

2.5- Inuline

2.5.1- Généralités

L'inuline est un polysaccharide linéaire qui contient des résidus de fructose liés par des liaisons O-glycosidiques en β (2 \rightarrow 1), souvent avec une molécule de glucose à l'extrémité de chacune de chaînes de fructose, attaché par une liaison α (1-2), comme montré dans la figure 4. Le degré de polymérisation de l'inuline varie entre 2 et 70 unités fructose en fonction des conditions climatiques (Waterhouse et Chatterton, 1993).

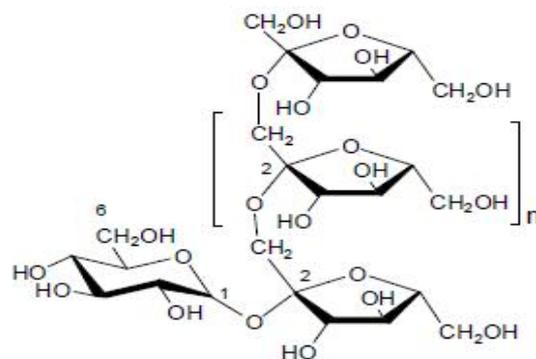


Figure 4 Structure chimique de l'inuline (Blecker *et al.*, 2001).

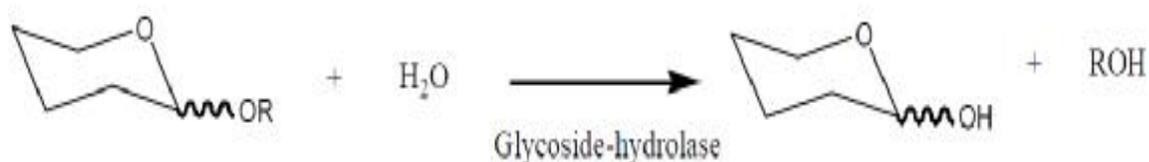
L'inuline est présent dans les racines, les tubercules, les grains et les parties de la tige de certaines plantes (Van Laere et Van den Ende, 2002; Ritsema et Smeekens, 2003). Dans les monocotylédones, l'inuline est largement présents dans les herbes (Gramineae) (Ritsema et Smeekens, 2003) et les *Liliaceae*, comme, l'ail, l'oignon, le poireau, etc. (Shiomi, 1989). Par ailleurs, l'inuline dans les dicotylédones est présent à une teneur élevée dans les (Asteraceae), incluant, la chicorée, le topinambour, l'artichaut, et autres (Shiomi, 1989 ; Wilson *et al.*, 2004, Orthen et Wehrmeyer, 2004 ; Shiomi *et al.*, 2006). L'ensemble de plantes contenant de l'inuline sont résumées dans le tableau 3

Tableau 3 Plantes riches en inulines (Singh, 2010)

Nom botanique	Nom commun	Parties riches en inuline (% matière sèche)
<i>Agave americana</i>	Agave américain	lobes 7–10
<i>Allium cepa</i>	Oignon	bulbe 2–6
<i>Allium sativum</i>	Ail	bulbe 9–16
<i>Arctium</i> sp.	Bardanes	racines 3.5–4
<i>Asparagus officinalis</i>	Safed Musli / shatavari	racines tubercules 10–15
<i>Asparagus racemosus</i>	Safed Musli / shatavari	racines tubercules 12–22
<i>Cichorium intybus</i>	Chicorée	racines 3–10
<i>Cynara cardunculus</i>	Artichaut	feuilles 15–20
<i>Dahlia</i> sp.	<i>Dahlia</i>	racines tubercules 14–19
<i>Helianthus tuberosus</i>	Artichaut de Jérusalem	tubercules 0.5–1.5
<i>Hordeum vulgare</i>	Orge	grains 8–13
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	Poire de terre	feuilles 12–15
<i>Taraxacum officinale</i>	Pissenlit	racines 15–20
<i>Scorzonera hispanica</i>	Spanish salsify	racines 18–20
<i>Saussurea lappa</i>	<i>Saussurea</i>	racines 7–10

2.5.2- Enzymes de dégradation d'inuline

La dégradation des fructanes est réalisée par des enzymes de type fructane exohydrolases (FEHs, EC 3.2.1.80). Ces dernières sont des glycoprotéines solubles appartenant à la famille 32 des glycosides hydrolases (GH 32), enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons O- des glycosides, produisant un sucre hémiacétal avec son aglycone correspondant, comme mentionné dans la figure 5 (Ritsema et Smeekens, 2003).

**Figure 5** Réaction générale des enzymes de type glycoside hydrolase (Arrizon, 2001).

En fonction du site d'hydrolyse, les glycosides hydrolases sont classés dans le groupe des exo-hydrolases ou des endo-hydrolases (figure 6).

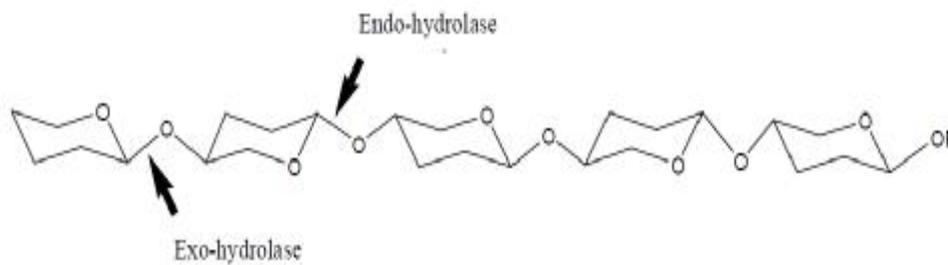


Figure 6 Sites de coupure des exo-hydrolase et des endo-hydrolase (Arrizon, 2001).

Les exo-inulinase et les endo-inulinases (E.C. 3.2.1.80 et E.C. 3.2.1.7) appartiennent à la famille des glycosides hydrolases. Elles sont responsables de l'hydrolyse des fructanes et elles sont, également, nommées fructanases.

2.5.2.1- Endo-inulinase

L'endo-inulinase est spécifique à l'inuline et hydrolyse les liens internes β -(2,1) fructofurannosidique (figure 7) pour donner des inulotriose, inulotetraose et inulopentaose comme produits principaux (Kim *et al.*, 1999)

2.5.2.2- Exo-inulinase

L'exo-inulinase quant à elle, libère les unités de fructose terminales dans l'inuline (figure 7) (Vandamme et Deryeke, 1983 ; Ritsema et Smeekens, 2003).

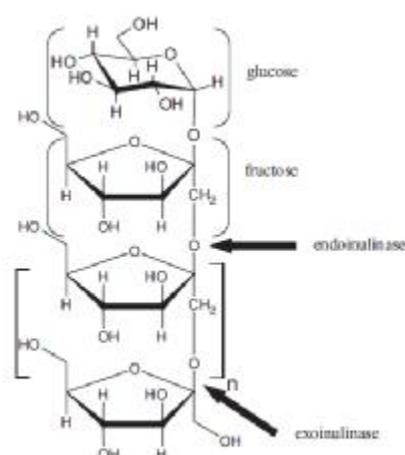


Figure 7 Sites de coupures des endo et des exo-inulinase (Singh, 2010).

2.5.3- Principales sources microbienne d'inulinase

L'inulinase est généralement thermostable et commercialement disponible pour des applications industrielles (Ettalibi et Baratti, 2001). Dans les dernières décennies, un grand nombre de champignons, de levures et de souches bactériennes ont été utilisés pour sa production (tableau 4).

Tableau 4 Principales sources microbiennes d'inulinase

Sources		Types d'inulinase	Références
Champignons	<i>Aspergillus awamori</i>	Exoinulinase	Arand <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Aspergillus ficuum</i>	Endoinulinase	Uhm <i>et al.</i> , (1998)
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Endoinulinase	Ongen <i>et al.</i> , (1996)
	<i>Aspergillus niger</i>	Endoinulinase	Ohta <i>et al.</i> , (1998)
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Exoinulinase	Gupta <i>et al.</i> , (1998)
	<i>Aspergillus versicolor</i>	Exoinulinase	Kochhar <i>et al.</i> , (1997)
	<i>Chrysosporium pannorum</i>	Exoinulinase	Xiao <i>et al.</i> , (1989)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Exoinulinase	Gupta <i>et al.</i> , (1992)
	<i>Panaeolus papillonaceus</i>	Exoinulinase	Mukherjee et Sengupta, (1987)
	<i>Penicillium purpurogenum</i>	Endoinulinase	Onodera <i>et al.</i> , (1996)
	<i>Penicillium</i> sp. TN-88	Exoinulinase	Moriyama <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Scytalidium acidophilum</i>	Exoinulinase	Kim <i>et al.</i> , (1994)
Levures	<i>Kluyveromyces cicerisporus</i>	Exoinulinase	Zhang <i>et al.</i> , (2012)
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Exoinulinase	Workman et Day, (1983)
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	Exoinulinase	Bergkamp <i>et al.</i> , (1993)
	<i>Kluyveromyces</i> sp Y-85	Exoinulinase	Parekh et Margaritis, (1985)
Bactéries	<i>Arthrobacter</i> sp. S37	Endoinulinase	Kang et Kim, (1999)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Exoinulinase	Rey <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Bacillus polyxyma</i> MGL21	Exoinulinase	Kwon <i>et al.</i> , (2003)
	<i>Bacillus</i> sp. Snu7	Exoinulinase	Uzunova <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Exoinulinase	Kato <i>et al.</i> , (1999)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Exoinulinase	Vullo <i>et al.</i> , (1991)
	<i>Bifidobacterium longum</i>	Exoinulinase	Schell <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Exoinulinase	Looten <i>et al.</i> , (1987)
	<i>Cryptococcus aureus</i>	Exoinulinase	Sheng <i>et al.</i> , (2008)
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Exoinulinase	Tsujimoto <i>et al.</i> , (2003)
	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	Endoinulinase	Yun <i>et al.</i> , (1997)
	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Exoinulinase	Cho et Yun, (2002)

2.5.4- Voie de dégradation de l'inuline

Le mécanisme moléculaire de la réaction d'hydrolyse des glycosides hydrolases est décrit dans la figure 11 avec l'exemple de l'exo-inulinase d'*Aspergillus awamari* (Nagem *et al.*, 2004). Au cours d'une première étape, le nucléophile attaque le carbone C₂ du résidu fructosyl terminal. Un intermédiaire covalent de type fructosyl-enzyme est formé et une molécule d'aglycone est libérée dans le milieu. Lors de la seconde étape, le résidu acide/base déprotoné joue le rôle de base pour activer une molécule d'eau venant attaquer l'intermédiaire fructosyl enzyme. La liaison fructosyl-enzyme intermédiaire se rompt et libère la molécule de fructose.

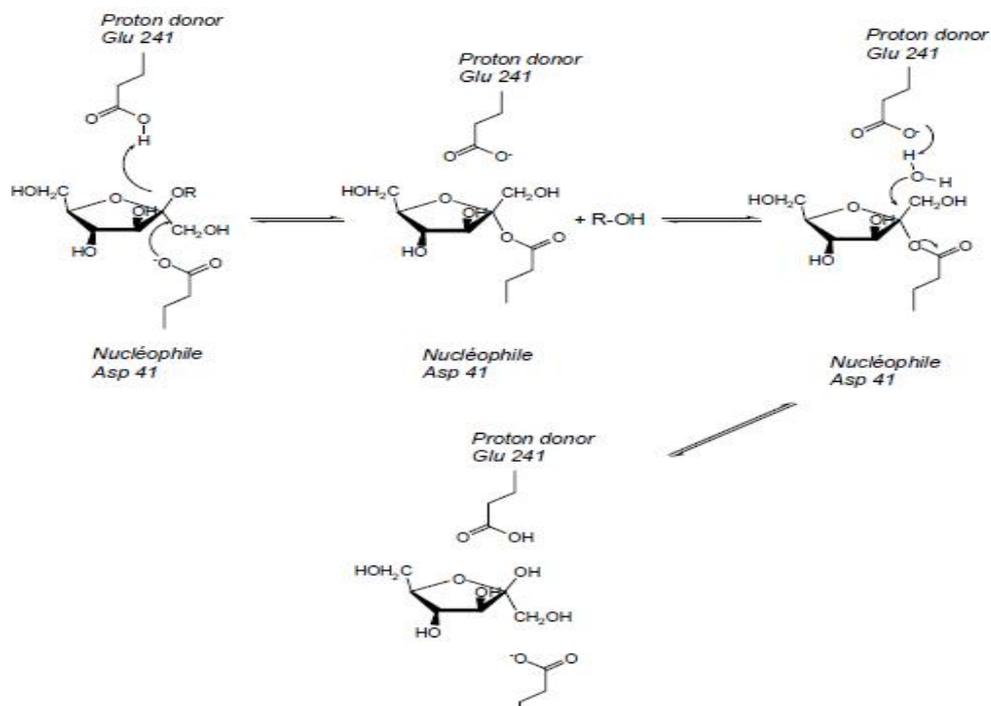


Figure 8 Schéma du mécanisme catalytique de l'exo-inulinase d'*Aspergillus awamori* (Nagem *et al.*, 2004).

L'exo-inulinase d'*Aspergillus awamori* a été cristallisée et la reconnaissance du substrat est caractérisée. Deux acides aminés, l'acide aspartique 41 et l'acide glutamique 214 du site actif de la protéine fonctionnent comme le nucléophile et le catalyseur acide/base respectivement (Nagem *et al.*, 2004). Pour la majorité des glycoside-hydrolases, les acides aminés glutamiques et aspartiques sont communément trouvés au niveau du site actif.

2.6- Le genre *Pichia*

Les travaux réalisés sur le genre *Pichia* peuvent être classés en trois catégories : les études sur le rôle de ces levures en élaboration d'alcool industriel (Fleet et Heard, 1993; Jeffries, 2006), la production de protéines hétérologue (Cereghino et Cregg, 2000 ; Loegering *et al.*, 2011) et les études sur les aspects métaboliques et cinétiques de la croissance. À ce jour, la plupart des recherches ont, principalement, porté sur les deux premiers points. Par contre, il y a peu de données bibliographiques sur les aspects cinétiques et métaboliques.

2.6.1- Caractéristiques et taxonomie

La morphologie de ces levures, sur divers milieux de culture, varie entre ovoïdes et allongées, selon la composition de ces derniers. Les levures du genre *Pichia* apparaissent sous microscope optique, en paire ou sous forme d'un pseudo-mycélium à courte chaîne. Les cellules sont plus petites que celles de *Saccharomyces sp.* et se reproduisent par bourgeonnement (figure 9).

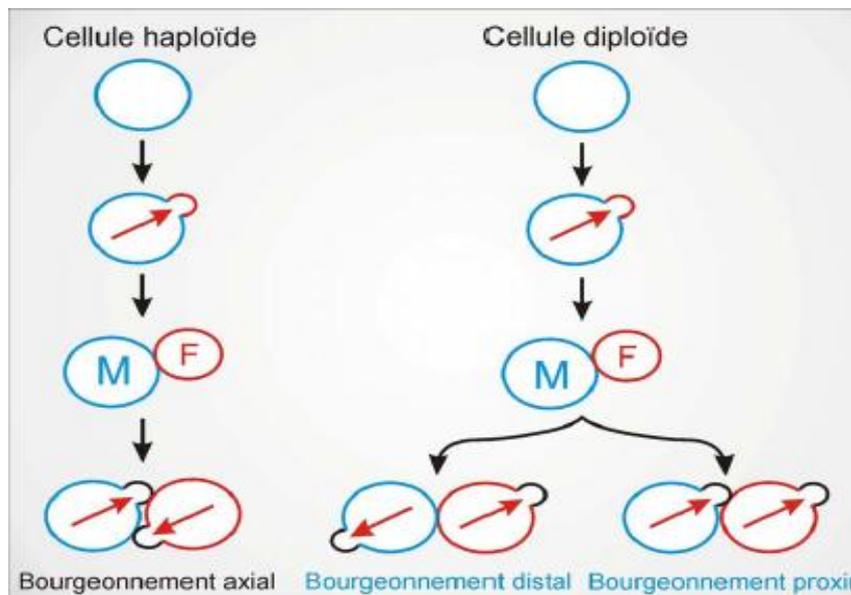


Figure 9 Division des levures par bourgeonnement (Leclerc *et al.*, 1995).

Par ailleurs, elles se reproduisent par voie sexuée en formant des asques contenant 1 à 4 ascospores (figure 10) (Kurtzman et Suzuki, 2010).

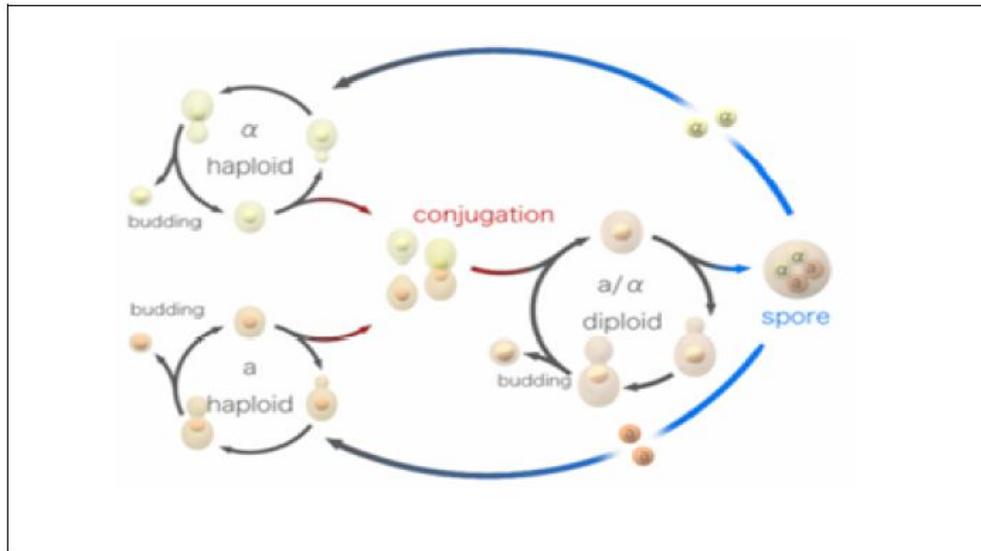


Figure 10 Cycle de reproduction de la levure (Leclerc *et al.*, 1995).

La taxonomie du genre *Pichia*, basée sur les techniques récentes de biologie moléculaire, est résumée dans le tableau 5.

Tableau 5 Classification taxonomique de *Pichia* (Kurtzman et Suzuki, 2010)

Règne	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
Famille	<i>Debaryomycetaceae</i>
Genre	<i>Pichia</i>

2.6.2- Besoins nutritionnels

2.6.2.1- Sources de carbone

Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques. etc (Botton, 1991). Les levures du genre *Pichia* peuvent fermenter le glucose, le saccharose, le maltose, le raffinose, le cellobiose et le

galactose et peuvent assimiler l'éthanol, l'acide lactique, l'acide citrique (Kurtzman et Suzuki, 2010).

2.6.2.2- Sources d'azote

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques pour la biosynthèse d'acides aminés, de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997 ; Guiraud, 1998). L'azote est utilisé par les levures sous plusieurs formes (inorganique ou organique). Les levures de genre *Pichia* ne sont pas capable d'utiliser les nitrates, la seule source d'azote inorganique assimilée est l'ion ammonium (Larpent, 1991).

2.6.2.3- Oligoéléments et facteurs de croissance

Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (Suzuki *et al.*, 1985). Les oligo-éléments sont essentiels pour la cellule, puisqu'ils réagissent comme cofacteurs de divers enzymes impliquées dans le métabolisme microbien. Ils sont nécessaires en très petites quantités mais un excès provoquera la dénaturation d'enzymes et une perturbation de la morphologie et de la physiologie cellulaire et de la vitesse de croissance (Blackwell et coll, 1995). Les oligo-éléments augmentent la production de l'éthanol de 20% par *Pichia stipitidis* (Guebel *et al.*, 1989). De plus, d'autres facteurs sont essentiels comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique), qui interviennent lors des réactions enzymatiques, comme des coenzymes (Botton *et al.*, 1990).

2.6.2- Mécanismes de production d'éthanol

Trois comportements métaboliques peuvent être distingués chez les levures selon la façon dont elles dégradent la source de carbone utilisée pour produire leur énergie: oxydatif, fermentaire et respiro-fermentaire (Kappeli, 1986 ; Botton *et al.*, 1991). Le type métabolique, lui-même, varie selon l'environnement (présence d'oxygène), la source de carbone et l'espèce de la levure considérée (Barnett, 1976). Les levures du genre *Pichia* ont un métabolisme varié (Toivola *et al.*, 1984; Bouix et Leveau, 1991 ; Fiaux *et al.*, 2003). Cependant, la production d'éthanol s'effectue grâce au métabolisme fermentaire et respiro-fermentaire.

2.6.2.1- Métabolisme fermentaire

Cette voie métabolique se déroule en anaérobiose. L'acide pyruvique produit à la fin de la glycolyse est décarboxylé en acétaldéhyde, lui-même réduit en éthanol grâce au NADH⁺ formé au cours de l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate (figure 11). Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (Guiraud et Rosec, 2004).

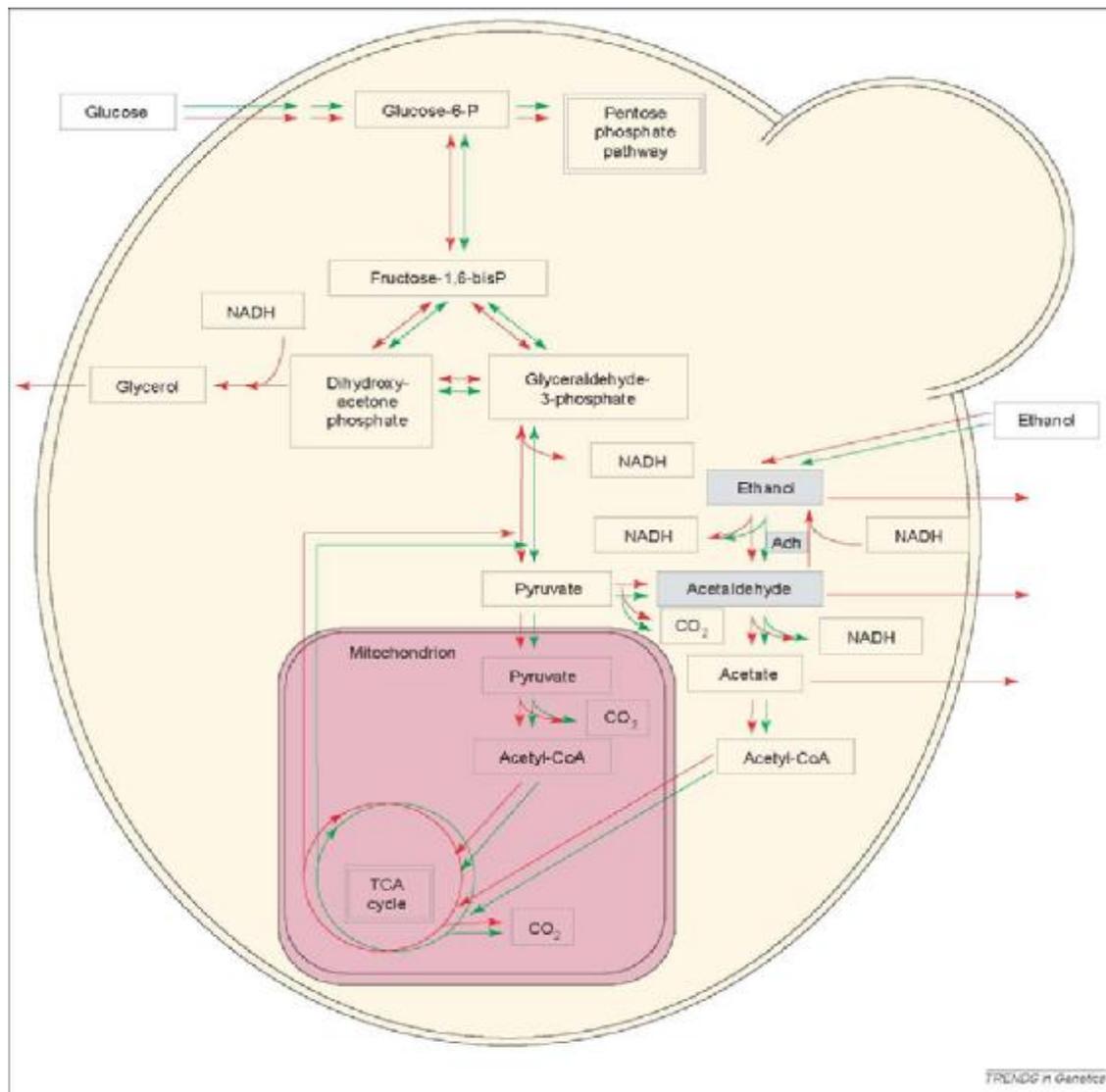


Figure 11 Voies métaboliques chez les levures (Oura, 1997).

2.6.2.2- Métabolisme respiro-fermentaire

Le métabolisme respiro-fermentaire est obtenu lorsqu'il existe une production d'éthanol simultanée à une activité respiratoire (production d'éthanol en présence d'oxygène). Lei *et al.*, (2001) ont fourni une interprétation du shift du métabolisme des levures basée sur le phénomène d'*overflow* au niveau des nœuds pyruvate et acétaldéhyde (figure 10). Au niveau du nœud pyruvate, l'enzyme pyruvate déshydrogénase a une affinité plus forte pour le pyruvate que l'enzyme pyruvate décarboxylase. Aux faibles flux glycolytiques, le pyruvate est converti via la pyruvate déshydrogénase vers le cycle de Krebs (figure 9). Quand le flux glycolytique dépasse une valeur critique, la pyruvate déshydrogénase est saturée et l'acétaldéhyde est formé et, préférentiellement, converti en acétate. En revanche, lorsque l'acétaldéhyde déshydrogénase est saturée, l'acétaldéhyde serait transformé en éthanol (Postma, Verduyn *et al.*, 1989; van Urk, Schipper *et al.*, 1989; Verduyn, Postma *et al.*, 1992; Feria-Gervasio *et al.*, 2008).

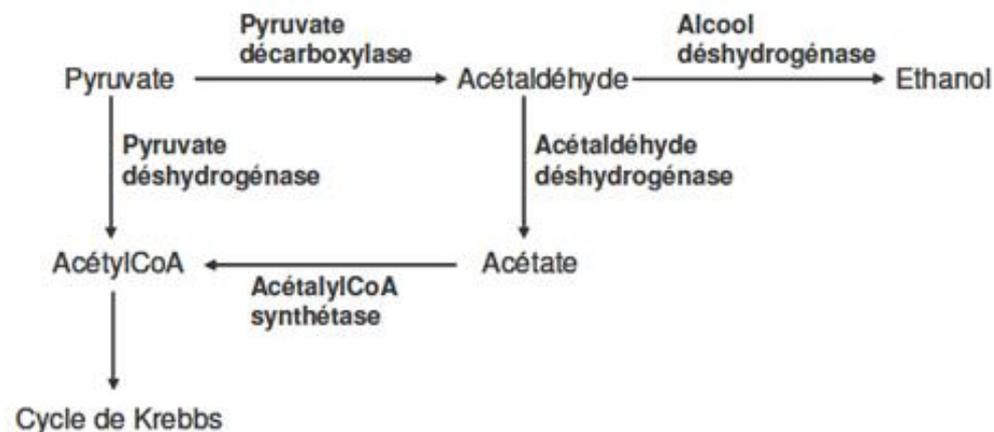


Figure 12 Nœud métabolique du pyruvate et de l'acétaldéhyde.

2.7- Le sol

2.7.1- Généralités sur le sol

Le sol est le milieu meuble où s'ancrent les racines et dans lequel puisent l'eau et les éléments minéraux nécessaires à la croissance et au développement des végétaux. Ce n'est qu'une infime pellicule à la surface de la croûte terrestre, formé au cours des temps géologiques par une lente transformation des roches mères initiales sous l'effet de phénomènes physiques, chimiques et biologiques dont l'action se poursuit de nos jours (LeClech, 2000). Le sol est un

complexe dynamique, caractérisé par une atmosphère interne, une économie de l'eau particulière, une flore et une faune déterminées, des éléments minéraux. Mais le sol est aussi, un milieu dynamique car ses propriétés s'acquièrent progressivement sous l'action combinée des facteurs du milieu (Dechaufour, 1979). Le sol est un milieu minéral poreux où gaz et liquide peuvent y circuler. On y distinguera donc, trois compartiments physiques : un compartiment solide, un compartiment liquide et un compartiment gazeux. Le sol n'est pas seulement un substrat physico-chimique, c'est aussi un support de vie, créateur de matière organique. Aux tris fractions précédentes, il nous faudra donc ajouter pour décrire le sol un compartiment organique vivant, transformant en continu, la matière organique morte (Davet, 1996).

2.7.2- Caractéristiques du sol aride

Les milieux arides sont des milieux fragiles, où les populations animales et végétales sont susceptibles de subir des variations brutales, en extension et en nombre. Le rythme de développement des populations animales et végétales en milieu désertique est aléatoire, étroitement dépendant des précipitations et une communauté importante de microorganismes sont liés à ces populations (Muzzolini, 2000 ; LeBerre et Ramousse, 2001). Le milieu aride se caractérise par des précipitations annuelles faibles, à distribution très irrégulière dans le temps comme dans l'espace et, notablement, inférieures à l'évaporation potentielle annuelle. En zone aride, il pourrait s'évaporer 10 à 20 fois plus d'eau qu'il n'en tombe chaque année (Margat, 1985). On note ainsi, en Algérie, des précipitations annuelles très faibles dans certaines localités : 33 mm à Béni Abbès ; 13 mm à Adrar ; 10 mm à In Salah (Mohamed et Hind, 1998). Le Sahara détient le record mondial de l'ensoleillement avec 3000 à 3500 heures par an contre 1600 à Paris. En saison sèche, le ciel est clair et lumineux tant que le vent ne le trouble pas, ce qui est rare. Au cours de la saison des pluies, il prend un aspect plombé et les nuages peuvent former une nappe continue d'autant plus impressionnante que les horizons sont vastes. Avec la chaleur de l'été, le vent est l'autre caractéristique permanente du Sahara. Par sa situation dans l'hémisphère boréal, le Sahara est soumis, au sol, à des vents dominants orientés du Nord-Est au Sud-Ouest. Mais, localement, le vent peut provenir de directions sensiblement différentes : du Sud ou du Sud-Ouest au Sahara central, de l'Est au Sahara méridional. Il est dirigé d'Est en Ouest sur la bande côtière atlantique où les courants marins froids s'opposent à la formation de vents marins en Mauritanie.

2.7.3- Zones aride en Algérie

Les zones arides, situées entre l'Atlas Tellien au Nord et l'atlas Saharien au Sud, couvrent une superficie globale de 20 millions d'hectares formant de grands ensembles :

- Ø 15 millions d'hectares sont occupés par une végétation steppique graminéenne et chamaephytique constituant les vrais zones de parcours ;
- Ø 5 millions sont occupés par les cultures, les forêts et le sol nu.

Les sols se présentent sous forme de mosaïque allant des sols anciens aux sols récents peu évolués (Djebaili *et al.*, 1983). Les régions arides se distinguent par les sols minéraux bruts (lithosols et régosols) localisés sur les sommets des djebels, les sols peuvent évoluer regroupant les sols d'origines colluviale des glacis, alluviale des lits d'oueds et des dayas et éolienne des formations sableuses fixées, les sols calcimagnésiques caractérisés par des rendzines sur les versants des djebels, les sols bruns calcaires à accumulations calcaires, très répandus, et les sols à encroûtement gypseux, plus rares et les sols iso humiques représentés par les glacis d'érosion et les sols halomorphes qui occupent les chotts et les sebkhas. Les sols sont caractérisés par la présence d'accumulation calcaire réduisant la profondeur de sol utile, la faible teneur en matière organique et en éléments biogènes et une forte sensibilité à l'érosion et à la dégradation.

2.7.4- Sol et microorganismes

Le sol est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres. Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matière organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark et Zarnoch, 1992 ; Madigan *et al.*, 1997 ; Subler et Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith *et al.*, 2000; Kattere et Andren, 2001). L'évaluation de la biomasse des microorganismes a montré que dans la plupart des sols, les mycètes sont le composant principale (Baath et Soderström, 1980 ; Schnürer *et al.*, 1985).

2.7.5- Microorganismes des zones arides

Les écosystèmes où vivent des microorganismes présentent des conditions environnementales qui peuvent varier largement. Variations de pH, de températures, de pressions, de salinité, de disponibilité en eau et de radiations ionisantes. De tels facteurs de stress ont des effets importants sur les populations et les communautés microbiennes, et peuvent constituer un environnement extrême. Ces facteurs environnementaux influencent fortement la survie de tout organisme déterminé et conduisent à une réduction de la diversité des types microbiens capable de survivre. Dans des conditions particulièrement restrictives, ce processus peut se poursuivre jusqu'à ce qu'il n'y ait plus qu'un seul type de microorganisme, essentiellement une monoculture.

De nombreux genres microbiens ont des exigences spécifiques pour survivre et se développer dans ces milieux (Prescott *et al.*, 2007) (tableau 6).

Tableau 6 Développement des microorganismes dans des milieux particuliers (Prescott *et al.*, 2007)

Facteurs	Conditions environnementales	Germes observés
Température	110- 115°C, abysses océaniques	<i>Methanopyrus kandleri</i> <i>Pyrodictium abyssi</i>
	85°C, Sources chaudes	<i>Thermus</i> <i>Sulfolobus</i>
	75°C , source chaudes	<i>Thermothrix thiopara</i>
pH acide	pH 3.0 ou inférieur	<i>Saccharomyces</i> <i>Thiobacillus</i>
pH basique	pH 10 ou supérieur	<i>Bacillus</i>
Faible disponibilité en eau	$a_w = 0,6- 0,65$	<i>Torulopsis</i> <i>Candida</i>
Température et pH faible	85°C, pH 1.0	<i>Cyanidium</i> <i>Sulfolobus acidocaldarium</i>
Pression	500-1.035atm	<i>Colwellia hadaliensis</i>

2.8- Modélisation

2.8.1- Définition et objectif

La modélisation consiste à créer une représentation simplifiée d'un problème : **le modèle**. Le modèle constitue une représentation possible du système pour un point de vue donné. Généralement, l'objectif de la modélisation est de répondre à trois besoins principaux: la compréhension des phénomènes, le contrôle et l'optimisation. En effet, le choix du modèle nécessite la définition de ces objectifs. La modélisation oblige le scientifique à mieux comprendre le procédé, puisque, lors de l'établissement du modèle, il est nécessaire de considérer les paramètres les plus importants du procédé, leurs effets et les traduire sous forme d'équation mathématiques. Après la formulation du modèle, celui-ci est résolu et les valeurs prédites sont comparées avec les valeurs expérimentales. Des données expérimentales sont nécessaires pour établir, ou valider le modèle. Cependant, La croissance microbienne est un phénomène globalement très complexe par le nombre et la variété des réactions mises en jeu au cours de son déroulement et par leur dépendance vis-à-vis des conditions extérieures. Les modèles biologiques modernes cherchent à identifier au-delà des corrélations, les liens de causalité susceptibles d'exister entre des phénomènes en apparence disjoints (Lei, 2001). La simulation de la croissance de la souche levurienne étudiée dans le présent travail (*Pichia carribica*), la formation du produit (éthanol) et la consommation du substrat (inuline) a été mise en place en utilisant les modèles non structurés. L'explication de tous ces modèles est montrée ci-dessous.

2.8.2- Les modèles non-structurés

Ces modèles s'appuient sur une vision globale de la cellule, sans détailler sa structure. Dans ce type de modèle, la variation de biomasse est exprimée par l'intermédiaire de variables extracellulaires distinctes (concentration en substrats, en produits du métabolisme et présence d'inhibiteurs de la croissance), ainsi que de certaines variables environnementales (pH, température, force ionique, etc.) (Pirt, 1988 ; Bideaux, 2000). Ces modèles sont employés dans le cas de la modélisation de la fermentation alcoolique (Lee *et al.*, 1983 ; Costa *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2011).

2.8.2.1- Modélisation de la croissance avec limitation par le substrat

La première étape de la modélisation du métabolisme levurien consiste à décrire l'évolution de la population microbienne en fonction du temps dans des conditions environnementales particulières (Augustin, 1996). De nombreux modèles non structurés ont été développés pour représenter les croissances de population microbienne (Costa *et al.*, 2001). Le modèle de Monod est le plus répandu.

2.8.2.1.1- Modèle de Monod

Le modèle de Monod représente la base en matière de modélisation de la croissance microbienne. Monod présente des résultats expérimentaux relatifs à la croissance d'*E. coli* pour trois types différents de substrat limitant : glucose, mannite et lactose. Pour ces résultats, il propose une relation entre la vitesse spécifique de croissance d'un microorganisme, μ , et la concentration en substrat limitant, S donnée par l'équation suivante (Monod, 1942).

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \dots (1)$$

Cette équation dépend de deux paramètres ; la vitesse spécifique de croissance maximale μ_{max} (1/h) et K_S (g/L) définie comme l'affinité que le micro-organisme a pour le substrat limitant. Sa valeur numérique correspond à la concentration en substrat nécessaire pour obtenir $1/2 \mu_{max}$. Beaucoup d'adaptations ont été faites, sur ce modèle, dont nous citons quelques-unes ci-dessous, où le taux de croissance dépend, uniquement, du substrat (tableau 7).

Tableau 7 Cas de croissance limité par le substrat pour les levures

Microorganismes	Expression cinétiques	Références
<i>S. cerevisiae</i>	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S+K_S}$	(Monod, 1942)
<i>S. cerevisiae</i>	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S+K_S} 1 - \exp(-t/T1)$	(Bergter et Knorre, 1972)
<i>S. cerevisiae</i>	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S+K_S} \frac{1}{1+bC_L}$	(Peringer <i>et al.</i> , 1974)
<i>Candida utilis</i>	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S+S+S^2/K_i}$	(Jackson et Edwards, 1975)

<i>S. cerevisiae</i>	$\mu = \mu_{\max} \frac{(1-P)^n}{P_m}$	(Levespiel, 1980)
<i>S. cerevisiae</i>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S^n}{S^n + K_S}$	(Moser, 1983)

2.8.2.2- Modélisation de la croissance en présence de produits

2.8.2.2.1- Modèle de Luedeking et Piret

L'intervention d'un produit dans l'équation de description de la croissance microbienne nécessite l'expression de la dynamique propre de ces constituants, Ainsi, il est nécessaire d'écrire un système différentiel dans lequel sont décrites les évolutions de toutes les variables d'état qu'interviennent dans l'équation de la vitesse de croissance. On obtient alors des systèmes dynamiques qui ont les formes suivantes :

$$\left. \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = F(X, P) \\ \frac{dP}{dt} = F(X, P) \end{array} \right\} \dots (2)$$

Où, X représente la concentration de biomasse (g/L) et P la concentration de produit formé au cours de la culture (g/L). En 1959, Luedeking et Piret ont proposé une expression mathématique pour décrire la cinétique de production de métabolites au cours de la croissance. La forme générale de cette expression est la suivante :

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \dots (3)$$

α : Constante associée à la vitesse de croissance (sans unité).

β : Constante associée à la concentration en biomasse (h^{-1}).

Si on se ramène à l'unité de biomasse on note :

$$\frac{dP}{dt} \frac{1}{X} = \alpha \frac{dX}{dt} \frac{1}{X} + \beta X \frac{1}{X} \dots (4) \quad \text{avec}$$

$$\frac{dP}{dt} \frac{1}{X} = v_p \quad \text{et} \quad \frac{dX}{dt} \frac{1}{X} = \mu$$

L'équation (3) est donc :

$$v_p = \alpha\mu + \beta \dots (5)$$

Les cinétiques de formation des produits microbiens peuvent être alors divisées en trois groupes (Schügerl, 1985), chacun correspond à un comportement métabolique différent. Ainsi, l'apparition d'un produit peut être :

A- Liée à la croissance quand le produit est formé simultanément avec la biomasse. Dans ce cas, les vitesses spécifiques de formation du produit et de croissance sont proportionnelles. Un exemple de ce type de cinétique est la production d'acide gluconique par *Gluconobacter oxydans* (Schügerl, 1985).

$$\frac{dP}{dt} \frac{1}{X} = v_p = \alpha\mu \dots (6)$$

B- Dissociée de la croissance quand un métabolite est produit lors de la phase stationnaire alors que la vitesse de croissance est nulle. Cette fois, la vitesse spécifique de formation du produit est constante.

$$\frac{dP}{dt} \frac{1}{X} = v_p = \beta \dots (7)$$

En particulier, les antibiotiques sont des exemples classiques de dissociation de ces deux activités métaboliques. Par exemple, la production de pristinamycines par *Streptomyces pristinaespiralis* (Maung, 1987).

C- Partiellement associée à la croissance quand la formation du produit est présente lors de la phase de croissance et lors de la phase stationnaire. Ainsi, la vitesse spécifique de production peut être exprimée selon le formalisme mathématique complet proposé par Luedeking et Piret, (1959) (équation 5).

$$v_p = \alpha\mu + \beta \dots (5)$$

La fermentation lactique par *Lactobacillus lactis* (Béal et al., 1994), la production de gomme xanthane par *Xanthomonas campestris* (Chin-Han et Shang-Tian, 1990), la production d'acides gras volatils par *Megasphaera elsdenii*, sont représentatifs de l'association partielle croissance-production (Soto-Cruz et al., 2002).

*Matériel et
Méthodes*

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'isolement de souches levuriennes à partir du sol des milieux arides (sol sahariens) et la sélection des isolats les plus performants pour la production d'éthanol sur diverses sources de carbone en se focalisant sur la caractérisation du processus de fermentation alcoolique de la meilleur souche sur l'inuline.

3.1- Echantillonnage

Les échantillons du sol utilisés pour cet objectif sont prélevés à partir de palmeraies de la région de Tolga située à l'Ouest de la wilaya de Biskra (figure 13). Cette région est connue, mondialement, pour la haute qualité de ses dattes, produites par plus de 500.000 palmiers, dont la plupart des récoltes sont destinées à l'exportation (Farhi, 2002).

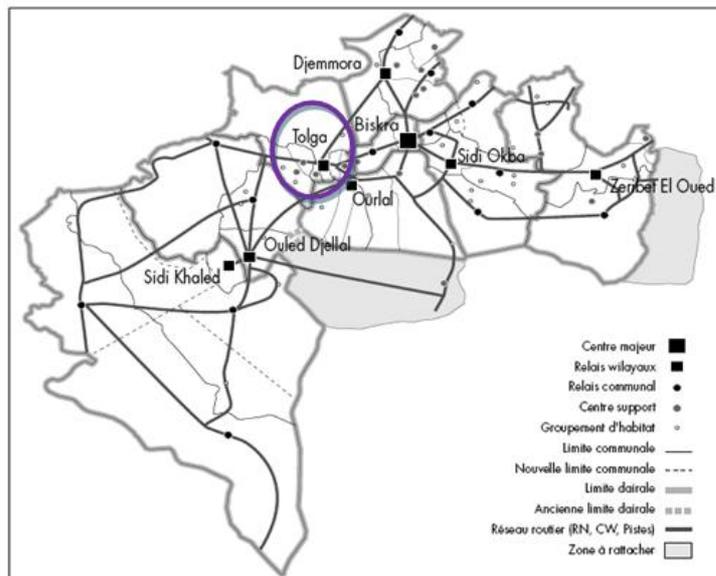


Figure 13 Localisation géographique de la région d'échantillonnage (TOLGA) (Farhi, 2002).

Les échantillons du sol prélevés englobent le sol humide des palmeraies (figure 14). Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol (Buhot, 1973 ; Mihail et Alcoren, 1987 ; Saadoune et Momani, 1997), une quantité de ce dernier est prélevée à partir de différentes profondeurs à l'aide d'une spatule stérile puis, introduite dans des seringues stériles afin de les transporter jusqu'au laboratoire (Rodriguez-Zaragoza *et al.*, 2005). Le tableau 8, illustre les caractéristiques des échantillons prélevés.



Figure 14 Site d'échantillonnage : sol humide de palmeraie.

Tableau 8 Caractéristiques du site d'échantillonnage

Site d'échantillonnage	Mois de prélèvement	Caractéristiques des lieux	Profondeur (cm)
TOLGA	Mars (2010)	Sol de Palmeraie de	25
		DEGLET NOUR	20
		(Sol humide)	10
		Sol de Palmeraie des	25
		DATTES GHERS	20
		(Sol humide)	10
Sol de Palmeraie de	25		
DAGLA BAYDA	20		
(Sol humide)	10		

3.2- Etude climatologique et pédologique

3.2.1- Etude climatologique

La région du prélèvement des échantillons est située à une altitude de 213 mètre, une latitude de 34° 43' 20" nord et à une longitude de 5° 22' 42" Est et se caractérisant par un climat sec (saharien). Le prélèvement des échantillons est effectué durant le mois de Mars (2010). Par ailleurs, les données climatologiques de la région pour toute l'année 2010 sont collectées (ONM, station de Constantine).

3.2.2- Etude pédologique

Les analyses physicochimiques des échantillons du sol prélevés dans cette étude, sont élaborées par le Laboratoire de Chimie des Sols, Agence Nationale des Ressources Hydrauliques, Antenne Régionale Est, Constantine (ANRH, Zone industrielle Palma,

Constantine). Les analyses effectuées concernent les paramètres suivant: le pH, la conductivité électrique et le taux de la matière organique.

3.3- Isolement des levures

Les levures sont parmi les microorganismes les plus faciles à isoler et à cultiver comme le montrent la diversité de leurs applications agro-alimentaires (Pol, 1996). L'isolement des levures nécessite l'emploi de milieux sélectifs dotés de propriétés antibactériennes et antifongiques (Guiraud, 1998). Les milieux de cultures utilisés sont des milieux à base d'extrait de levure ou de malt, en combinaison avec le glucose (YM, YPG) et aussi le milieu de Sabouraud (Annexe 1) (Guiraud et Rosec, 2004).

3.3.1- Dilutions

La préparation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère du sol en mettant 1g du sol dans 9 mL d'eau physiologique stérile, suivie d'une agitation pendant 3 min. Ensuite, la préparation est laissée se décanter. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1mL de la solution précédente à 9 mL d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-4} (Jerome *et al.*, 2004).

3.3.2- Ensemencement

Un volume de 0.1 mL de chacune des dilutions indiquées est déposée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé YPG, puis étalé uniformément avec un étaleur stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Enfin, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 heures, durée nécessaire pour l'apparition des colonies de souches levuriennes (Tortora *et al.*, 2003).

3.3.3- Purification des levures

Après développement des colonies, les levures isolées sont repiquées sur le même milieu de culture (YPG). La purification est effectuée par la méthode des stries, qui consiste à tracer des stries avec l'anse contenant la levure sur la surface d'une gélose neuve dans des boîtes de Pétri. La colonie parfaitement isolée, peut être ensuite, prélevée et transférée toujours au moyen d'une anse de repiquage sur le même milieu mais dans de nouvelles boîtes de Pétri. L'incubation de toutes les boîtes est effectuée à 30°C jusqu'à l'obtention de colonies apparentes (Michael et John, 2006).

3.3.4- Conservation des levures

La méthode de conservation des souches la plus utilisée et la plus simple consiste à repiquer les levures en tube sur gélose inclinée PDA ou MA (Annexe 1), les cultures sont incubées pendant 3 à 5 jours, pour permettre une croissance maximale, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (UI-Haq *et al.*, 2002).

3.4- Sélection des levures productrices d'éthanol

Les isolats de levures obtenus, sont testés sur un milieu de culture composé de différents sucres, en l'occurrence, les hexoses (le glucose, le fructose et le raffinose) ; les pentoses (le xylose, l'arabinose et le ribose) ; les disaccharides (le maltose, le lactose et le saccharose) et les polysaccharides (la cellulose, la chitine, l'amidon et l'inuline). Chaque substrat carboné est préparé à une concentration de 4% alors que la source d'azote (extrait de levure) est à 0.5%. Les tubes contenant 8mL du milieu sontensemencés avec 2mL d'une suspension levurienne (10^7 cellules/mL). Ces tubes sont menus d'une cloche de Durham, puis sont incubées à 30 °C, pendant 48 h. Le test est considéré positif, s'il y a dégagement de gaz dans la clochette, perçu par la bulle d'air, et négatif s'il n'y a pas dégagement de gaz (Wickerham, 1951).

3.5- Identification de l'isolat levurien sélectionné

L'identification de l'isolat levurien sélectionné (L5) est effectuée par l'ensemble de test préliminaires (observation macroscopique et microscopique, tests biochimiques via la galerie API AUX20), et moléculaires (analyses des séquences d'ADN- *18S* et *ITS*).

3.5.1- Observation macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique consiste en une observation à l'œil nu de la taille (petite, moyenne, grande), de la forme de la colonie (ronde, irrégulière, etc.), de la transparence, de l'élévation de la colonie, de type de la colonie et le relief (Camille, 2007).

3.5.2- Observation microscopique

3.5.2.1- Observation à l'état frais

Cette technique permet l'observation des levures vivantes et la détermination de leur morphologie. La technique consiste à déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur lame en verre propre, puis à l'aide d'une anse de platine stérile, un prélèvement de la colonie à

identifier est apporté et dissocié dans la goutte d'eau physiologique, ensuite, recouverte par une lamelle en évitant la formation de bulles d'air, l'observation est réalisée au microscope optique à l'objectif (X40) puis à immersion (X100) (Singleton, 2005).

3.5.2.2- Coloration au bleu de méthylène

Cet examen repose sur la méthode classique suivante ; les frottis utilisés sont étalés à l'aide d'une anse sur des lames en verre propres. Les lames sont ensuite séchées à l'air, à proximité d'un bec bunsen, puis fixées par la chaleur en les passant deux ou trois fois sur la flamme. Les frottis préparés sont colorés pendant 2 minutes au bleu de méthylène puis ils sont décolorés par lavage à l'eau du robinet, séchés par le papier filtre et examinés au microscope jusqu'à l'objectif à immersion (GX100) (Guiraud, 1998).

3.5.2.3- Aptitude à la filamentation

La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur lame microscopique. Pour ce faire, le milieu PDA fondu est déposé sur une lame microscopique préalablement stérile dans une boîte de Pétri. Quand le milieu est solidifié, la levure à examiner estensemencée en une strie longitudinale. La lame est incubée dans la boîte de Pétri contenant un peu d'eau stérile pour éviter la dessiccation du milieu. L'observation microscopique est faite après 72h d'incubation. La bordure de la culture est examinée, si la levure développe une filamentation. En outre, la nature du mycélium (pseudo mycélium ou vrai mycélium), son abondance et sa ramification sont notées (Wickerham, 1951).

3.5.3- Identification biochimique (galerie API 20 C AUX)

La galerie « API 20 C AUX » est constituée de 20 cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent d'effectuer 19 tests d'assimilation (tableau 9). Un volume de 100 µL de la suspension levurienne (10^7 cellules/ mL) est inoculé dans chaque cupule. La lecture de ces réactions se fait après 24- 72h, par comparaison à la cupule 0 (témoin négatif). Une cupule plus trouble que le témoin indique une réaction positive (assimilation des substrats par la levure). L'identification est obtenue à l'aide du logiciel d'identification.

Tableau 9 Composition de la galerie API 20 C AUX

TESTS	SUBSTRATS	QTE (mg/cup.)
0	Aucun	-
GLU	D-GLUcose	1,2
GLY	GLYcérol	1,2
2KG	calcium 2-céto-Gluconate	1,2
ARA	L-ARAbinose	1,2
XYL	D-XYLose	1,2
ADO	ADOnitol	1,2
XLT	XyLiTol	1,2
GAL	D-GALactose	1,9
INO	INOsitol	2,36
SOR	D-SORbitol	1,2
MDG	Méthyl- α D-Glucopyranoside	1,2
NAG	N-Acétyl-Glucosamine	1,2
CEL	D-CELlobiose	1,2
LAC	D-LACTose (origine bovine)	1,2
MAL	D-MALTose	1,2
SAC	D-SACcharose	1,2
TRE	D-TREhalose	1,2
MLZ	D-MÉLÉZitose	1,2
RAF	D-RAFFinose	1,9

3.5.4- Identification moléculaire

La confirmation de l'identification de l'isolat levurien sélectionné est réalisée par analyse de d'*ADN-18S* et *ITS*. Cette analyse est effectuée au centre wallon de Biologie Industrielle (CWBI), université de liège-Belgique. La détermination de l'identité d'un microorganisme nécessite la réalisation de plusieurs étapes, à savoir : L'extraction d'ADN ; l'amplification du gène désiré par PCR ; purification du produit de la PCR ; le séquençage du gène étudié et le traitement des séquences.

3.5.4.1- Extraction d'ADN

L'ADN génomique est extrait à partir d'une culture liquide de isolat levurien, par le kit «Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)», selon le protocole suivant: un millilitre de la culture levurienne est d'abord centrifugé à 13.000x g pendant 3 minutes et le surnageant obtenu est éliminé. Ensuite, le culot cellulaire récupéré est suspendu dans 293 μ L d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA 50mM). Après, 7,5 μ l de l'enzyme lytique (lyticase) sont rajoutés et le mélange obtenu, est incubé à 37°C pendant 30 à 60 minutes. De plus, 300 μ L de «nuclei lysis solution» sont rajoutés et mélangés par pipetage. Les protéines sont éliminées par précipitation en rajoutant 100 μ L de «protein precipitation solution», le mélange obtenu est incubé dans la glace pendant 5 minutes puis centrifugé à 13.000x g pendant 3 minutes et le surnageant obtenu est récupéré. Par ailleurs, la précipitation et la réhydratation de l'ADN sont effectuées par le transfert du surnageant dans des tubes propres contenant 300 μ L d'isopropanol et les mélanger par inversion jusqu'à l'apparition des filaments d'ADN. Le mélange obtenu est centrifugé à 13.000-16.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant est éliminé. Ensuite, 300 μ L d'éthanol 70% sont rajoutés et la préparation est centrifugée à 13.000-16.000 x g pendant 2 minutes et le surnageant est éliminé. Après, l'éthanol est aspiré et le culot est séché (tube ouvert). L'ADN extrait est réhydraté dans 50 μ L de «DNA

rehydratation solution» puis 1,5µL de RNase sont rajoutés, l'incubation est faite à 37°C pendant 15 minutes. Enfin, L'ADN extrait est réhydraté une heure, à 65°C ou à 4°C pendant toute la nuit.

3.5.4.2- Amplification des gènes étudiés par PCR

L'amplification des gènes étudiés est réalisée par utilisation des amorces P1 (5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') et P2 (5'-GATCCTTCCGCAGGTTACC-3') pour *ADN-18S* (Thanh *et al.* 2002) et ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') pour l'*ITS* (Josefa *et al.*, 2004). Le mélange réactionnel de PCR utilisé pour amplifier les deux gènes étudiés contenait : 10X taq buffer (2,5µl), 25M. MgCl₂ (1,5µl), 10M-DNTP (0,4µl). Primer- P1 (1,25µl), primer- P 2 (1,25µl), taq polymérase (0,25µl), eau (42.85µl). Le programme PCR, utilisé pour l'amplification de l'*ADN-18S* est le suivant: 94°C pendant 10 min, puis 32 cycles de «94°C pendant 1 min, 53°C pendant 1 min, 72°C pendant 2 min» et enfin 72°C pendant 10 min. Par ailleurs, le programme d'amplification de l'*ITS* est le suivant : 94°C pendant 4min, puis 36 cycles de « 94°C pendant 1 min, 55°C pendant 1 min, 72°C pendant 2min », et enfin 72°C pendant 10 min.

3.5.4.3- Purification de l'ADN

Les produits de PCR sont purifiés par le kit «GFX PCR DNA and Gel Band Purification», suivant les instructions mentionnés. D'abord, 500 µl de «capture buffer type 2» sont rajoutés à 100 µl d'ADN extrait et mixer soigneusement. Ensuite, ce mélange est mis dans la petite colonne du kit, puis toute la préparation, dans les grands épendorfs du kit, est centrifugée à 16.000 x g pendant 30s et le surnageant obtenu est éliminé. 500 µl de «wash buffer type 1» sont rajoutés à la colonne, centrifugés à 16.000 x g pendant 30s et le liquide obtenu est jeté. Enfin, 50 µl de «elution buffer» sont rajoutés à la colonne, centrifugés à 16.000 x g pendant 30s et le surnageant contenant l'ADN purifié est récupéré dans des petits épendorfs.

3.5.4.4- Séquençage des gènes amplifiés et traitement des séquences

Le bon déroulement de l'extraction d'ADN et de l'amplification des deux gènes étudiés est vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). Le séquençage des gènes étudiés est réalisé en utilisant les mêmes amorces décrites ci-dessus. Les séquences obtenues sont corrigées par le programme bioedit (version 7.0.8.0). Les séquences corrigées et contiguées sont déposées dans la banque de donnée « Genbank » et le numéro d'accession est obtenu. L'identification

définitive de l'isolat levurien est obtenue par comparaison des séquences des gènes étudiés aux séquences précédemment publiées dans GenBank, en utilisant le programme Blast N.

3.6- Méthode de fermentation

3.6.1- Production d'éthanol en fiole

3.6.1.1- Préparation de la pré-culture

La pré-culture de la souche levurienne (L₅) est obtenue par inoculation des fioles de 250 mL, contenant 100 mL du milieu YPG. Cette préparation est incubée à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 24h, la pré-culture obtenue est utilisée comme inoculum pour la production de l'éthanol.

3.6.1.2- Préparation du milieu de fermentation

Afin d'étudier la production d'éthanol par la levure identifiée, un milieu de culture de base, composé, essentiellement, d'inuline est utilisé (Annexe 1). Le pH du milieu est ajusté à 5. Le milieu est réparti dans des fioles de 250 mL contenant 100 mL de milieu, puis stérilisé à 121°C pendant 20 min.

3.6.1.3- Conduite de fermentation

La méthode de Yuan *et al.*, (2008) est utilisé pour la production d'éthanol avec quelques modifications. Les fioles sont inoculées avec 11ml de la suspension levurienne (10⁷ cellules/mL) et sont incubées à 37°C pendant 5 jours, sous agitation de 170 rpm. Les concentrations de la biomasse, du fructose et de l'éthanol sont mesurées toutes les 24h.

3.6.2- Sélection de conditions physico-chimiques optimales de production d'éthanol à partir d'inuline

3.6.2.1- Température

Afin de déterminer la température optimale de la production de l'éthanol, des flacons contenant le milieu de fermentation à pH 5 sont préparés et incubés pendant 5 jours à des différentes valeurs de température, en l'occurrence : 30°C, 35°C, 37°C et 40°C.

3.6.2.2- pH

Pour déterminer le pH optimum de la production de l'éthanol, des flacons contenant le milieu de fermentation sont préparés et incubés pendant 5 jours à 37 °C et à des différentes valeurs de pH (3, 4, 5 et 6).

3.6.3- Sélection de la concentration optimale d'inuline pour la meilleure production d'éthanol

Différentes concentrations de l'inuline (allant de 10g/L jusqu'à 50 g/L) sont testées pour déterminer la concentration permettant l'obtention d'une meilleure production d'éthanol. Le milieu de fermentation est ajusté à pH 5. La culture est maintenue sous une incubation agitée durant 5 jours à 37°C et à 150 rpm.

3.6.4- Production d'éthanol en fermenteur de 20 litres

3.6.4.1- Préparation de l'inoculum

La pré-culture de la souche levurienne est obtenue par inoculation des erlenmeyers de 250 mL, contenant 100 mL du milieu YPG. Cette préparation est incubée à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 24h. La pré-culture obtenue est, ensuite, transférée dans un erlenmeyer de 1000 mL contenant 400 ml du milieu YPG pour assurer un volume de 500 mL et l'incubation est réalisée dans les mêmes conditions. Cette dernière, sert à ensemercer un fermenteur contenant 8 litres de volume final du milieu de fermentation.

3.6.4.2- Préparation du fermenteur

La culture est effectuée dans un fermenteur de 20 litres avec un volume final de 8 litres suivant les conditions: température 37°C, pH 5, vitesse d'agitation 170 rpm et l'oxygène dissous (DO₂ 100%). La fermentation est arrêtée après 120h.

3.6.4.3-Évaluation des paramètres de croissance et de production du fructose et d'éthanol

À chaque 24 heures, le pH, la concentration de la biomasse, la concentration du fructose, et de l'éthanol sont mesurées. Toutes les expériences sont réalisées en trois répétitions.

a- Analyse de l'éthanol et du fructose

Après la fermentation, 5 mL de la culture sont centrifugés pendant 5 minutes à (5,000 rpm, 4°C). Le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage du fructose et d'éthanol, par chromatographie liquide à haute performance sur l'ensemble Hewlett-Packard Agilent 1100 Series (France). Les échantillons obtenus sont, d'abord, filtrés (sur filtre 0,2 µm) et conservés par ajout de l'azide de sodium (NaN₃, bactériostatique) à 0,5%.

La séparation est réalisée sur une colonne échangeuse d'ions de type Supelcogel C-610H (Supelco) précédée d'une pré-colonne de type Supelguard H (Supelco, copolymère de styrène et de divinylbenzène). Les sucres et les métabolites sont détectés par un détecteur réfractométrique différentiel ou détecteur à indice de réfraction (Agilent 1100 Series). Pour effectuer les analyses, le débit d'élution est ajusté à 0.5 ml/min d'une solution d'acide phosphorique 0.1 % filtrée sous vide et préparée avec de l'acide de qualité analytique et de l'eau milli-Q. Le logiciel HP Chemstation permet l'automatisation de l'analyse et le traitement des résultats.

Les concentrations de fructose et d'éthanol sont déterminées par rapport à des étalons dont les concentrations vont de 0,125 à 4 g/L. Les droites d'étalonnages (Annexe 2) établies pour le fructose et l'éthanol, permettent de réaliser une analyse quantitative. Ces droites représentent l'aire du pic d'élution en fonction de la concentration des étalons, chacune des mesures est réalisée à trois reprises, les écarts-types sont indiqués sur le graphique (Annexe 2).

b- Détermination de la concentration cellulaire

- Mesure de la densité optique

La croissance cellulaire est suivie par mesure de la densité cellulaire par spectrophotométrie à 600 nm (spectrophotomètre HITACHI® U-1100) dans une cuve en verre de 2 mm de trajet optique. La suspension cellulaire est diluée de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,05 et 0,8 unité d'absorbance, ce qui place la valeur dans la zone de linéarité de la méthode.

- Détermination de la matière sèche

La biomasse sèche, exprimée en g/L, est déterminée par une méthode gravimétrique. Un volume connu de culture est filtré sous vide sur une membrane Sartolon polyamide 0,45 µm (SARTORIUS®), préalablement, séchée et pesée. Après filtration, la biomasse est, ensuite, séchée à 75 °C jusqu'à la stagnation du poids. La différence de masse avec et sans la membrane donne le poids sec de la concentration cellulaire (g/L).

c- Détermination de l'activité inulinase

Un volume de 100µl de l'extrait enzymatique est additionné de 400µl de substrat contenant 5% d'inuline dans du tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5 (mélange réactionnel) (Annexe 4), l'incubation est opérée dans un bain marie à 37°C pendant 15 minutes. La réaction est arrêtée en plaçant les échantillons à 100°C pendant 5 minutes. Le dosage des sucres réducteurs libérés sont effectués suivant la méthode de Miller, (1959); 3mL de solution d'acide dinitrosolicylique (DNS) (Annexe 3) contenant 0,05% de sulfite de sodium sont ajoutés à 1ml de tampon citrate 0,05M à pH 5 (Annexe 3) et à la solution enzymatique (0,5mL), la coloration est obtenue en chauffant à 100°C pendant 5min, la réaction est arrêtée par l'ajout de 1 ml du sel de Rochelle 40% et de 15 mL d'eau, la densité optique est mesurée à 550 nm. La quantité des sucres réducteurs est déterminée sur une droite d'étalonnage préparée avec des solutions de D-fructose de différentes concentrations (Annexe 2).

Une unité d'activité enzymatique (U) est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une micromole de sucres réducteurs en une minute à pH 5 et à 37°C.

- Influence du pH du mélange réactionnel sur l'activité enzymatique de l'inulinase

Pour déterminer l'influence du pH sur l'activité enzymatique de l'inulinase, des tubes contenant le milieu réactionnel sont préparés et incubés pendant 15minutes à 37°C à des différentes valeurs du pH (3.3, 3.4, 3.5, 4, 4.5 et 5).

-Influence de la température du mélange réactionnel sur l'activité enzymatique de l'inulinase

L'influence de la température sur l'activité enzymatique de l'inulinase à été étudiée dans des tubes contenant le milieu réactionnel et incubés pendant 15 minutes à pH 3,4 à des différentes températures (37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C et 65°C).

- Etude de thermostabilité de l'inulinase de la souche levurienne

Cette étude a pour but la détermination de la stabilité thermique de l'inulase. Des tubes contenant le milieu réactionnel sont préparés et incubés à des différentes températures (45 °C, 50°C, 55, et 60°C) et ce, pendant une heure de temps.

3.7- Production d'éthanol sur milieu à base de l'artichaut

L'artichaut (*Cynara scolymus*) est une plante potagère riche en inuline, elle est largement cultivée dans plusieurs régions d'Algérie, en l'occurrence : Setif, Oran, Relizane, Sidi bel abbès, Chlef, Blida et Tlemcen. En effet, ce légume est utilisé comme substrat pour la production d'éthanol par la souche levurienne sélectionnée. Pour ce faire, 100g de feuilles et tiges de ce dernier sont lavés, pelés et placés dans 500mL de l'eau distillée puis stérilisé à 100°C pendant 3 minutes. Le jus obtenu est filtré à travers la mousseline, l'extrait obtenu est réparti dans des flacons et stérilisé à 120°C pendant 20minutes (Sébastien *et al.*, 2007).

Le test des cloches de Durham décrit précédemment est utilisé pour détecter la capacité de production d'éthanol dans les conditions exhibées dans cette partie.

3.8- Modélisation

Des modèles mathématiques correspondant au processus biotechnologique de production d'éthanol, sont implémentés pour simuler le processus de la fermentation ; le modèle de **Monod** pour la production de la biomasse, le modèle de **Luedeking et Piret** pour la production de l'éthanol et la forme modifiée de modèle de Luedeking et Piret pour la consommation du substrat.

3. 8.1- Equations des modèles

Pour un système *batch*, le modèle mathématique s'exprime sous la forme d'un système d'équations différentielles couplées du premier ordre de la forme ; dx/dt , dp/dt , ds/dt .

3. 8.1.1- Croissance de la biomasse

La croissance de la biomasse suit une cinétique de Monod:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \dots (1)$$

où μ_{max} , représente le taux de croissance maximal (h^{-1}) et K_S (g/L) , la constante de demi saturation

S = concentration en substrat limitant (g/L)

X = concentration en biomasse (g/L), avec une évolution de X_0 à X_f

La vitesse de croissance (g/L.h) est donc :

$$\frac{dx}{dt} = r_X = \mu X \dots (8)$$

Le remplacement de (1) dans (2) donne l'équation (3)

$$r_X = X \cdot \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \dots (9)$$

3. 8.1.2- Formation du produit

La formation du produit (éthanol) suit une cinétique de **Leudeking et Piret** (équation 3)

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \dots (3) \text{ Où}$$

X : représente la concentration de biomasse (g/L).

P : la concentration du produit formé au cours de la culture (g/L).

α : valeur liée à la croissance quand le produit est formé simultanément à la biomasse.

β : valeur dissociée de la croissance quand un métabolite est produit lors de la phase stationnaire alors que la vitesse de croissance est nulle (1/h).

3. 8.1.3- Consommation du substrat : (forme modifiée du modèle de Leudeking et Piret)

La consommation de substrat dépend de l'importance de trois termes, le taux de croissance des cellules, le taux instantané de formation de produit et d'une fonction d'entretien de la masse de cellules. La cinétique d'utilisation de substrat est une combinaison linéaire de ces termes :

$$\frac{dS}{dt} = \gamma S = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} - m_S X \dots (10) \text{ où}$$

$Y_{X/S}$: Rendement de bioconversion (g de biomasse formée par g de substrat consommé).

$Y_{P/S}$: Rendement de bioconversion (g de produit formé par g de substrat consommé).

m_S : constante de maintenance (g de substrat / g de cellules .H)

3. 9.2- Simulation des systèmes dynamiques

3. 9.2.1- Logiciel de simulation MatLab

Le logiciel utilisé pour la simulation des données dans le présent travail est MatLab (*matrix laboratory*), ce logiciel, est un langage de programmation de quatrième génération, trouve son application dans la manipulation des matrices, l'obtention des courbes exprimant les données expérimentales, la mise en œuvre des algorithmes, la création des interfaces et il peut s'interfacer avec d'autres langages comme le Java, et le Fortran.

3. 9.2.2- Résolution numérique des modèles

Le système d'équations différentielles du premier ordre contient 6 paramètres qui interviennent soit, μ_{\max} , K_S , α , β , γ , λ . Pour résoudre le système d'équations différentielles, il faut fournir les conditions initiales, qui sont alors les concentrations initiales du substrat (fructose), du produit (éthanol) et de la biomasse au démarrage de la fermentation, soit: S_0 , X_0 , P_0

3. 9.2.3- Discrétisation des équations par la méthode FDTD

Les trois équations différentielles sont discrétisés par la méthode FDTD (Finite different time domain), l'obtention d'expressions programmables passe par la discrétisation des

formulations considérées. Les dérivées partielles spatiales et temporelles du modèle dérive-diffusion peuvent être traitées par la technique des différences finies (figure 15).

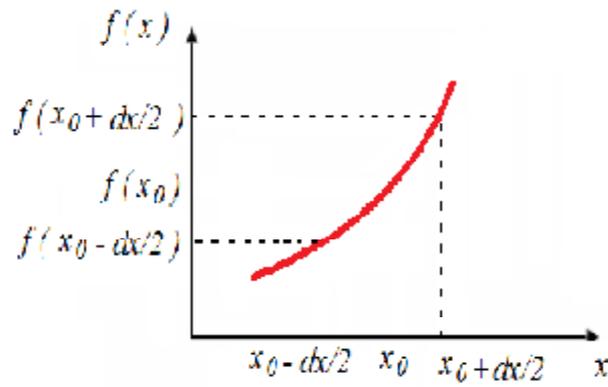


Figure 15 Evaluation d'une dérivée (Kane, 1966).

Résultats

4- Résultats

Le présent travail porte sur l'isolement de souches levuriennes à partir du sol des milieux arides (sol sahariens) et la sélection des isolats les plus performants pour la production d'éthanol sur diverses sources de carbone, en se focalisant sur la caractérisation du processus de fermentation alcoolique de la meilleur souche sur l'inuline, ainsi que la simulation du déroulement de ce phénomène par l'utilisation de modèles mathématiques en rapport avec le processus, enfin, la validation de ces modèles par l'expérimentation en utilisant le fermenteur de 20 litres.

4.1- Etude climatologique et pédologique du site d'échantillonnage

4.1.1- Etude climatologique de la région de Biskra

La période de prélèvement des échantillons a connu une précipitation totale de **24,7** mm, une température moyenne maximale de **23,7°C**, une température moyenne minimale de **12,8°C**, une température moyenne totale de **18,3°C** et une humidité moyenne de **46,4** % (tableau 10).

Tableau 10 Données climatologiques de la région de Biskra durant la période d'échantillonnage

Paramètres	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jun	Jul	Aut	Sep	Oct	Nov	Déc
Précipitation totales (mm)	15,9	17,5	24,7	22,6	5,7	23,6	0,0	3,7	10,7	16,3	44,8	0,3
Température Moyennes min (°C)	7,1	9,0	12,8	15,9	18,3	24,5	28,4	28,1	23,2	16,7	12,0	7,5
Température Moyennes max (°C)	18,1	20,2	23,7	28,0	30,4	37,5	41,4	40,7	34,5	28,3	21,9	18,1
Température Moyennes totale (°C)	12,6	14,5	18,3	22,0	24,2	30,8	35,1	34,4	28,6	22,3	16,6	12,4
Humidité R Moyenne (%)	57,1	54,0	46,4	48,9	35,7	34,7	27,9	33,3	40,7	45,8	59,0	49,6

4.1.2- Etude pédologique

Les résultats de l'analyse du sol montrés dans le tableau (11) révèlent que le sol de Tolga est pauvre en matière organique (1,307%) et par conséquent en carbone et en azote. Par ailleurs, le pH est relativement basique (7,64) et la conductivité électrique (CE), facteur indiquant le degré de la salinité, est supérieure à 10, ce qui signifie que la concentration en sel dans le sol exploré est très poussée (forte de salinité).

Tableau 11 Analyse du sol prélevé à partir d'une palmeraie de la région de Tolga*

Paramètres analysés	Valeurs
Matière organique (%)	1,307
pH	7,64
CE (salinité) mS/cm	11,43

*Résultats fournis par le Laboratoire de Chimie des Sols, Agence Nationale des Ressources Hydrauliques, Antenne Régionale Est, Constantine (ANRH, Zone industrielle Palma, Constantine).

4.2- Isolement des levures

L'isolement des levures, à partir des échantillons du sol prélevés, sur milieu YPG a permis l'obtention de 9 isolats codés : **L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, L₆, L₇, L₈ et L₉**. Les isolats **L₆, L₇** sont obtenus de la profondeur de **10 cm**, alors que, de la profondeur de **20 cm**, les levures (**L₁, L₂, L₄, L₅, L₈, L₉**) sont isolées et enfin, l'isolat **L₃** est le seul à être obtenu de la profondeur de **25 cm**. L'analyse des résultats montre que la profondeur de 20 cm est la plus peuplée en levures, par comparaison aux autres profondeurs (tableau 12).

Le développement des isolats sur milieu gélosé en boîtes (YPG), a abouti à des colonies de diverses formes et de tailles (grandes, moyennes, petites), de reliefs variés (planes, élevées) et de couleurs multiples (blanches, jaunes, oranges, roses) (figure 16).

Tableau 12 Isolats levuriens obtenus à partir de différents échantillons du sol

Site d'échantillonnage	Mois de prélèvement	Caractéristiques des lieux	Profondeur (cm)	Isolats
Tolga	Mars (2010)	Sol de Palmeraie de DEGLET NOUR (Sol humide)	10	L ₆
			20	L ₂ , L ₅ , L ₈ , L ₉
			25	Absence
		Sol de Palmeraie des dattes GHERS (Sol humide)	10	L ₇
			20	L ₁
			25	L ₃
		Sol de Palmeraie de DAGLA BAYDA (Sol humide)	10	Absence
			20	L ₄
			25	Absence

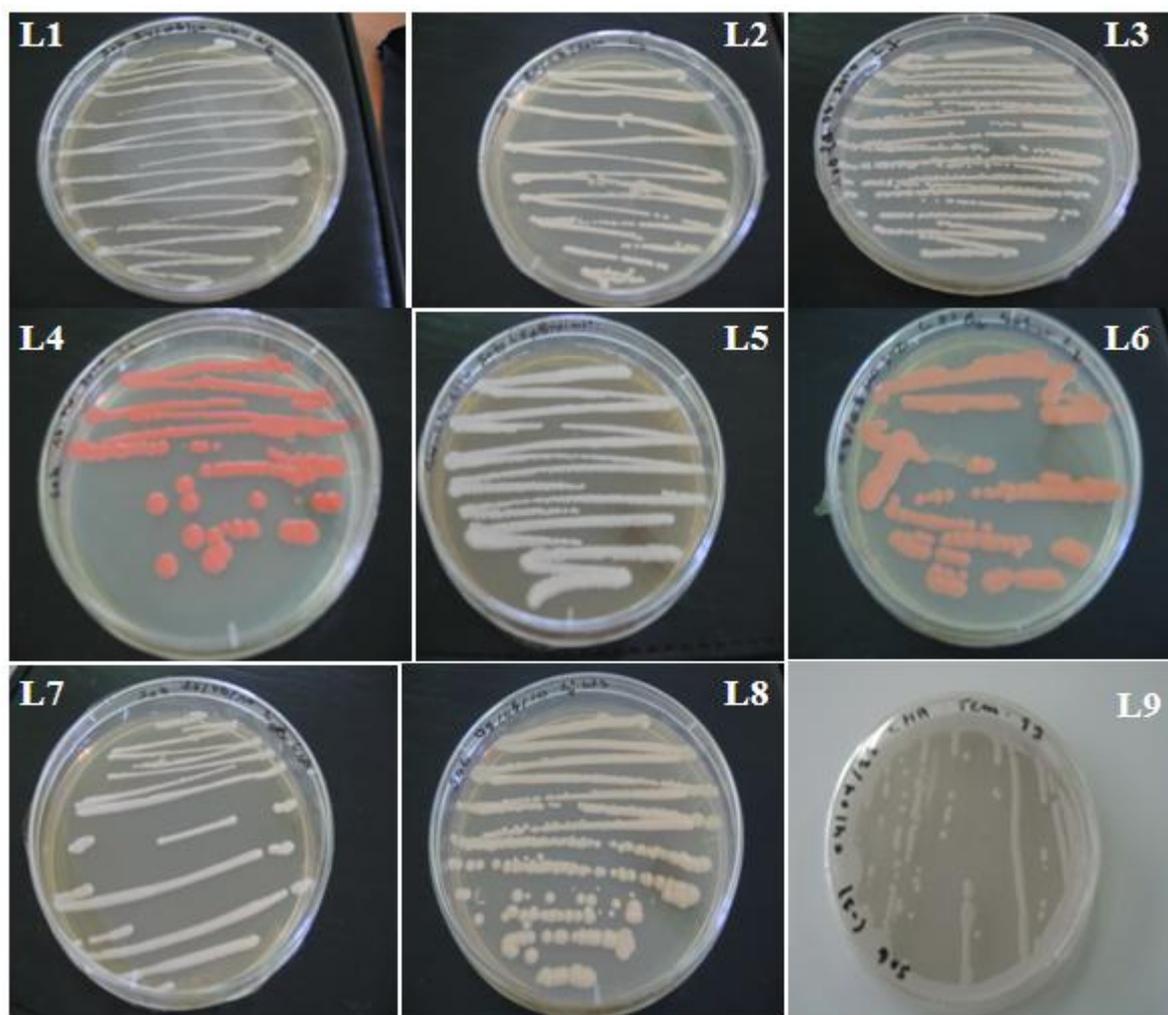


Figure 16 Aspect macroscopique des 9 isolats levuriens obtenus à partir du sol de palmeraie.

4.3- Sélection des isolats levuriens producteurs de l'éthanol sur divers sucres

Les isolats de levures obtenus, sont testés sur des milieux de cultures composés de différents sucres, en l'occurrence, les hexoses (le glucose, le fructose et le raffinose) ; les pentoses (le xylose, l'arabinose et le ribose) ; les disaccharides (le maltose, le lactose et le saccharose) et les polysaccharides (la cellulose, la chitine, l'amidon et l'inuline), il est à rappeler que l'estimation qualitative de l'éthanol produit se fait par la détection du gaz collecté dans la cloche de Durham, comme mentionné en détail dans la partie « Matériel et méthodes ».

4.3.1- Les pentoses

Les résultats du test de sélection des levures productrices d'éthanol (exprimé par le volume du

gaz collecté dans le tube de Durham) sur des pentoses (Xylose, Ribose et Arabinose) ont montré l'absence de toute activité chez les isolats étudiés (tableau 13). De ce fait, il apparaît que ces isolats ne possèdent pas la capacité de fermenter ces substrats.

Tableau 13 Sélection des isolats levuriens producteurs de l'éthanol sur les pentoses

Sucres Isolats	Xylose	Ribose	Arabinose
L1	-	-	-
L2	-	-	-
L3	-	-	-
L4	-	-	-
L5	-	-	-
L6	-	-	-
L7	-	-	-
L8	-	-	-
L9	-	-	-

(-) Absence du gaz

4.3.2- Les hexoses

Les isolats de levure (L₃, L₄, L₅, L₆, L₇, L₈ et L₉) ont la capacité de dégager du gaz dans la cloche de Durham en fermentant le glucose et le fructose. En revanche, le dégagement du gaz à partir du raffinose n'est détecté que chez la levure « L₅ ». Il est à noter, que le taux de production d'éthanol (volume du gaz collecté dans le tube de Durham) varie d'un isolat à un autre avec une meilleure production observée chez L₅ sur le fructose (tableau 14).

Tableau 14 Sélection des isolats levuriens producteurs de l'éthanol sur les hexoses

Sucres Isolats	Glucose	Fructose	Raffinose
L ₁	--	--	--
L ₂	--	--	--
L ₃	+	++	--
L ₄	+	++	--
L ₅	+	+++	+
L ₆	+	++	--
L ₇	+	++	--
L ₈	+	++	--
L ₉	+	++	--

(+) Dégagement du gaz ; (++) dégagement d'une quantité importante du gaz ; (+++) dégagement d'une quantité très importante du gaz.

4.3.3- Les disaccharides

Il est remarquable que la fermentation des disaccharides par les isolats de levure est très rare, En effet, la fermentation est, exclusivement, détectée chez l'isolat L₃ sur du maltose et des isolats L₄ L₅ L₇ sur du saccharose (tableau 15).

Tableau 15 Sélection des isolats levuriens producteurs de l'éthanol sur les disaccharides

Sucres Isolats	Maltose	Lactose	Saccharose
L1	-	-	-
L2	--	-	-
L3	+	-	-
L4	-	-	+
L5	-	-	+
L6	-	-	-
L7	-	-	+
L8	-	-	-
L9	-	-	-

4.3.4- Les polysaccharides

Les résultats de sélection de la production de l'éthanol sur les différents polysaccharides ont montré que seule la levure (L₅), isolée à partir du sol de palmerai de DAGLET NOUR d'une profondeur de 20 cm, est capable de fermenter l'inuline (tableau 16).

Tableau 16 Sélection des isolats levuriens producteurs de l'éthanol sur des polysaccharides

Sucres Isolats	Inuline	Amidon	cellulose	Chitine
L1	--	--	--	--
L2	--	--	--	--
L3	--	--	--	--
L4	-	--	--	--
L5	++	--	--	--
L6	-	--	--	--
L7	---	--	--	--
L8	-	--	--	--
L9	-	--	--	--

Les résultats des différents tests de sélection effectués montrent, que la meilleure production du gaz par la levure (L₅) est observée dans le cas de fermentation du fructose (hexose) suivi

de l'inuline (polysaccharide), composé, lui-même, de N- unités de fructose. Par ailleurs, comme il a été largement montré dans la littérature, seulement, un nombre très limité de microorganismes sont capables de produire de l'éthanol à partir de polysaccharides, de ce fait, il est, fortement, intéressant d'exploiter la capacité de l'isolat sélectionné (L5) à fermenter l'inuline (polysaccharides) pour la production d'éthanol. Pour ce faire, les expérimentations de caractérisation de production d'éthanol dans ce travail sont développées en tenant compte des conditions du processus: dégradation de l'inuline, production du fructose durant la première étape, et enfin la fermentation du fructose pour la production de l'éthanol. À partir des résultats préliminaires, il ressort que l'isolat L5 a la capacité d'effectuer la fermentation de l'inuline jusqu'à l'éthanol, chose absente chez la plupart des microorganismes. La figure 17 montre la quantité du gaz dégagé pour les différentes catégories de sucre fermenté par l'isolat L5.

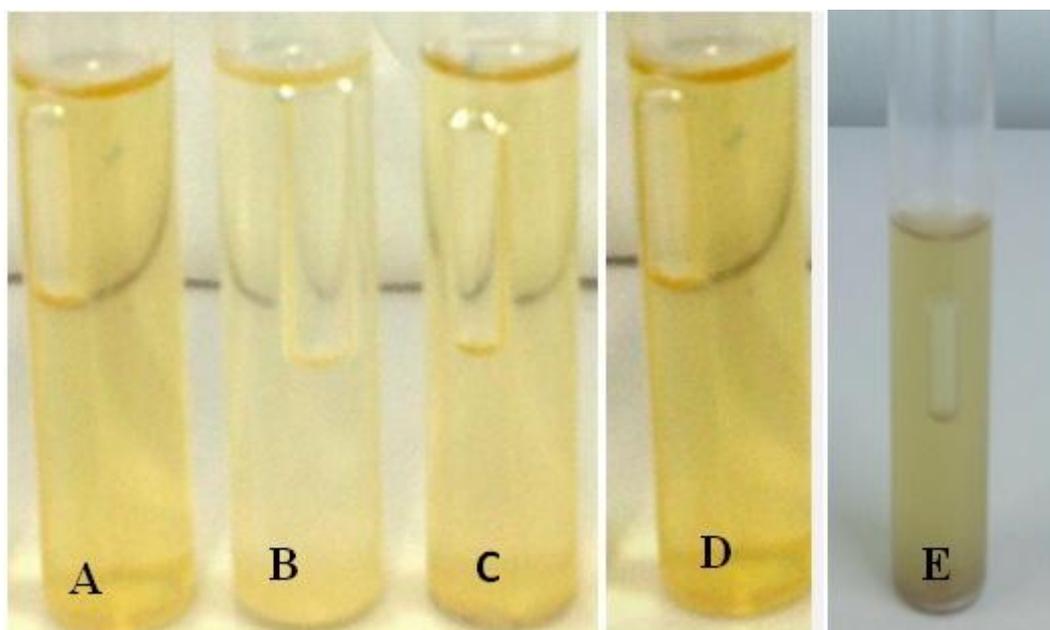


Figure 17 Quantité du gaz dégagé par l'isolat L₅ sur : (A) Glucose; (B) fructose; (C) Inuline ; (D) Saccharose ; (E) Raffinose.

Il est clair que la quantité du gaz dégagé est plus importante dans les tubes **B** et **C** en **comparaison avec les autres tubes**, ce qui montre que la souche sélectionnée fermente fortement le fructose et les sucres qui se compose de ce dernier.

4.4- Identification de l'isolat sélectionné

4.4.1- Identification macroscopique

Les caractères macroscopiques de l'isolat sélectionné L₅ sont étudiés sur le milieu YPGA, le plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). Les colonies sont de forme circulaire, de taille moyenne, et de couleur blanche (figure18).



Figure 18 Aspect macroscopique de l'isolat L₅.

4.4.2- Identification microscopique

L'observation microscopique effectuée sous microscope optique aux grossissements GX40 et GX100, en utilisant le bleu de méthylène, a permis de déterminer la morphologie, le mode de reproduction (bourgeonnement) et la filamentation (développement de pseudo-mycélium dans certaines conditions environnementales), comme mentionné dans la figure 19, A, B et C, respectivement.

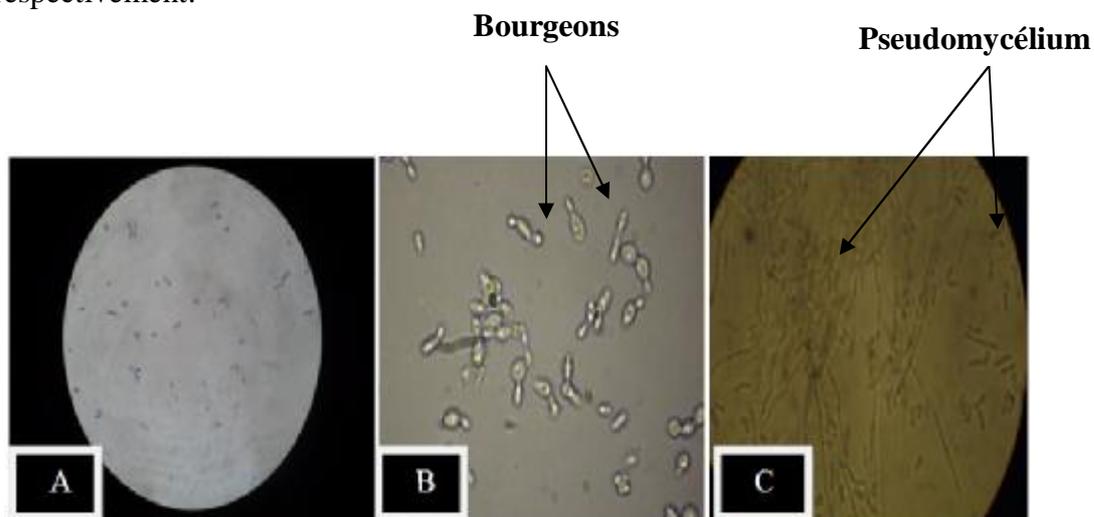


Figure 19 Observation microscopique de l'isolat L₅: (A), Coloration au bleu de méthylène ; (B), bourgeon et (C), Pseudo-mycélium.

Ces résultats montrent clairement que le mode de reproduction de cet isolat est le bourgeonnement et dans certaines conditions il développe un pseudomycélium, ce qui lui procure le caractère dimorphe.

4.4.3- Identification biochimique

4.4.3.1- Test d'assimilation (galerie API 20 C AUX)

L'isolat L₅ présente l'aptitude d'assimiler le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose, le cellobiose, le tréhalose, le raffinose, le L-arabose et le D-xylose, en revanche, il n'assimile pas l'inositole et le lactose. Il est à signaler, que les nitrates et les vitamines ne sont pas nécessaires pour sa croissance (figure 20).

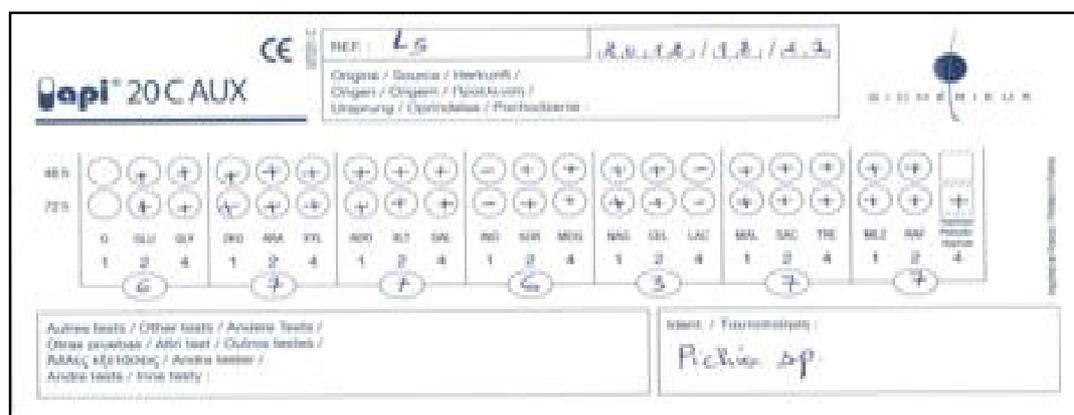


Figure 20 Test d'assimilation des substrats carbonés par l'isolat L₅.

La détermination du genre est effectuée selon la clef, dichotomique simplifiée, proposée par Lodder, (1971); Kreger Van, (1984) et Guiraud, (1998). Cette méthode est basée sur l'observation macroscopique sur des milieux ordinaire, l'étude des caractères réalisée à l'aide des préparations microscopiques et les résultats des tests d'assimilations des substrats carbonés. L'analyse de ces résultats montre que l'isolat L₅ correspond, probablement, au Genre *Pichia*.

4.4.4- Identification moléculaire

L'identification moléculaire de l'isolat sélectionné est réalisée au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire, au Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI), Université de Liège (Ulg), Belgique.

4.4.4.1- Extraction d'ADN

Le bon déroulement de l'extraction d'ADN de l'isolat levurien L₅ est vérifié sur gel d'agarose. Les résultats obtenus ont révélé une bonne migration de l'ADN, ce qui a permis de passer à son amplification.

4.4.4.2- Amplification de séquences d'ADN-18S et ITS

Le profil de la séquence amplifiée de l'ADN-18S et de l'ITS sont illustrés dans la figure 21. La bande d'ADN amplifiée de l'ADN-18S migre pour atteindre une distance équivalente à celle d'une séquence de 1500 pb, alors que la bande d'ADN amplifiée de l'ITS migre plus loin atteignant une distance équivalente à 750 pb.

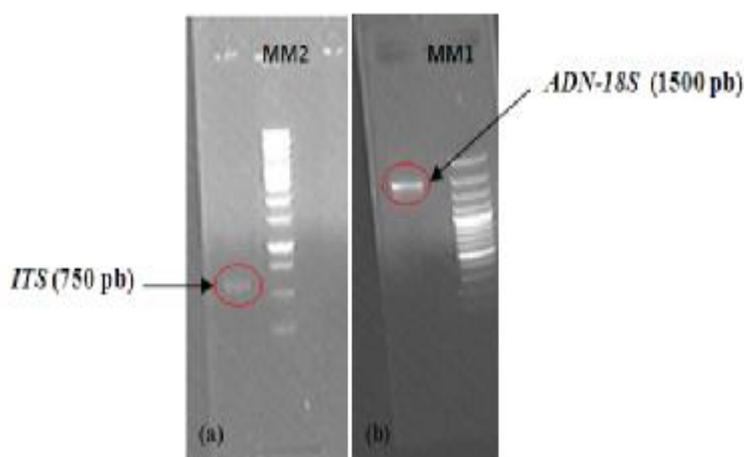


Figure 21 Migration des bandes d'ADN de l'isolat L₅ sur gel d'agarose : (a) ITS ; (b) ADN-18S (MM Marqueurs moléculaires).

4.4.4.3- Séquençage

Les séquences d'ADN-18S, après avoir été traité avec le programme « Bioedit », ont montré que la souche est étroitement liée à deux espèces du genre *Pichia*, à savoir : ***P. guilliermondii***, et ***P. caribbica***. Cependant, le blast des séquences de l'ITS corrigés (figure 22), a permis de déterminer, définitivement, l'isolat L₅, il s'agit, en effet, du *Pichia caribbica* et son numéro d'accèsion fournis par GenBank est **KC977491**.

TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATTTGAGGTCAAACCTTGTTGGTTG
 TTGTAAGGCCGGGCCAACCAATACCAGAAATATCCCGCCACACCATTCAACGAGTT
 GGATAAACCTAATACATTGAGAGGTTCGACAGCACTATCCAGTACTACCCATGCCA
 ATACTTTTCAAGCAAACGCCTAGTTCGACTAAGAGTATCACTCAATACCAAACCC
 GGGGGTTTGAGAGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTCTGGAATACCAGA
 GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATATT
 ACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
 GAAAGTTTTGAAGATTAATTCAAATTTGACTATCAATAAAAATAATTAATTGT
 GTTTTGTTAAACCTCTGGCCCAACCTATCTCTAGGCCAAACCAAAGCAAGAGTTC
 TGTATCAAAAAGACACTGTGTGTAAGGTTTTTCGCCGCGCAGTTAAGCGCTGGCA
 AAAGAATACTGTAATGATCCTTC.

Figure 22 Séquences finales du gène *ITS* après avoir été corrigé à l'aide du programme « Bioedit »

Il est très intéressant de signaler, que la caractérisation d'une souche de *Pichia caribbica* à partir du sol aride et la capacité de cette souche à produire de l'éthanol en fermentant l'inuline sont décrits pour la première fois dans le présent travail.

4.5- Production d'éthanol par *Pichia caribbica*

4.5.1- Production d'éthanol en fiole de 250mL

Dans le but de s'assurer du développement du *P. caribbica* sur milieu submergé et de confirmer sa production d'éthanol, des cultures en fioles de 250 mL, contenant 100mL de milieu de culture de base, composé, essentiellement, d'inuline comme source de carbone, sont lancées. Il est à rappeler que cette production, est effectuée en deux étapes; la saccharification de l'inuline en fructose et la fermentation de ce sucre en éthanol.

La croissance, la concentration du fructose et la production de l'éthanol par *P. caribbica* sont des éléments mesurables informatifs de la cinétique de la fermentation. Les résultats de l'évolution de ces éléments lors de la fermentation en fiole de 250 mL, sont illustrés par la figure 15. Il apparait que la concentration du fructose dans le milieu de fermentation augmente progressivement pendant les premières 24h de fermentation, après cette période, la concentration du fructose régresse, en revanche, la biomasse et la production de l'éthanol augmentent. Cet état signifie qu'il y a eu transformation du fructose en biomasse (bioconversion) via le processus de respiration d'un coté, et la transformation du fructose en éthanol via la fermentation alcoolique d'un autre coté. Après 72 h de fermentation, le fructose est complètement consommé, le maximum de production de l'éthanol (12.6 g/L) et de la

biomasse (DO=8) sont enregistrés. Au-delà de cette période, la concentration d'éthanol diminue et la concentration des cellules continue à augmenter (figure 23). Dans ces conditions, le rendement de production d'éthanol par *P. caribbica* à partir d'inuline ($Y_{ETH/I}$) est de 0,31g d'éthanol/g d'inuline.

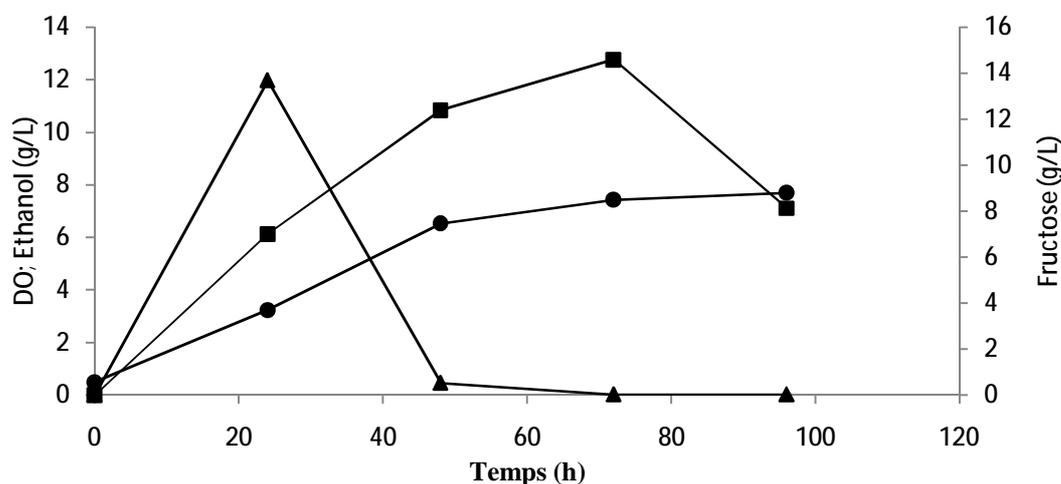


Figure 23 Évolution de la concentration de la biomasse, de la concentration du fructose et de la production d'éthanol par *P. caribbica* en fiole de 250mL: (●) Concentration de la biomasse; (■) Concentration d'éthanol et (▶) Concentration du fructose.

4.5.2 - Sélection des paramètres physico-chimiques optimaux de production d'éthanol

La croissance microbienne est influencée par les constituants du milieu de culture et par les facteurs physico-chimiques en particulier, la température et le pH. En effet, la vérification de ces facteurs environnementaux, pour une levure donnée, permet de connaître sa distribution écologique.

4.5.2.1 - Température

La température est l'un des paramètres importants de la fermentation alcoolique. Elle peut en effet, modifier les profils cinétiques de consommation du substrat, de production de métabolite, de croissance, mais aussi, du métabolisme de la levure. L'étude de l'effet de température sur la production d'éthanol, permet de déterminer sa valeur optimale de production. Les résultats montrés par la figure 24 révèlent que *P. caribbica* se développe dans un intervalle de température allant de 30 à 40°C avec une meilleure production obtenue lorsque, *Pichia caribbica* est incubé à 37°C.

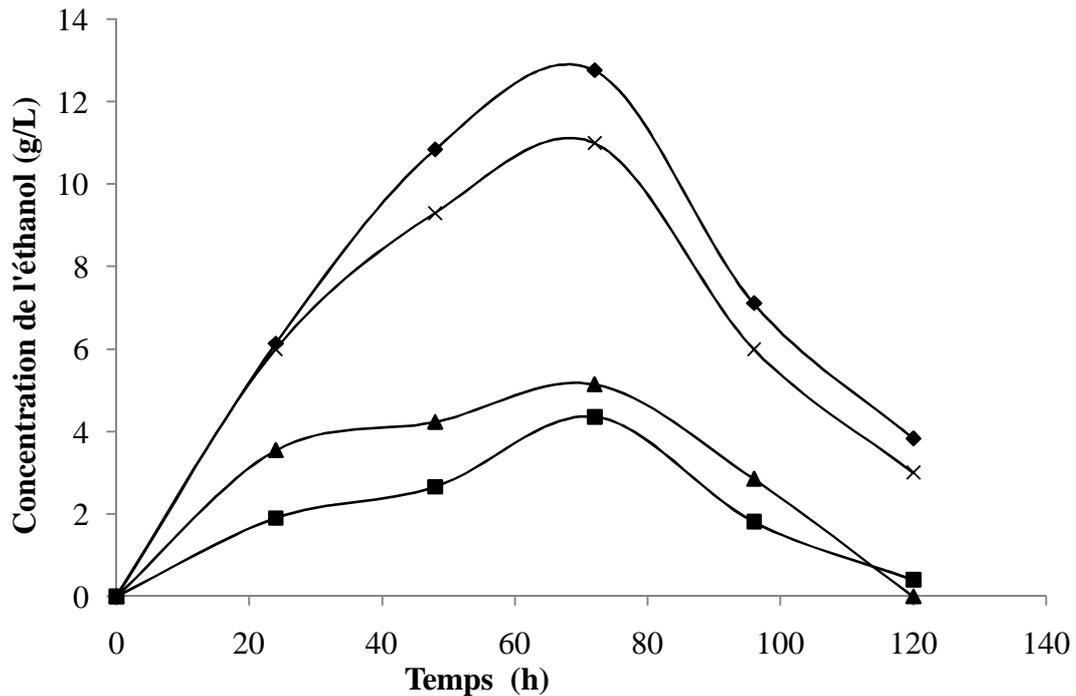


Figure 24 Effet de la température sur la production d'éthanol: —◆— à 37°C ; —■— à 35°C ; —▲— à 30°C ; —×— à 40°C.

Il a été constaté que la concentration maximale d'éthanol à température 37°C correspond à 12.6 g/L, cette valeur diminue jusqu'à 4,36 à 40°C.

4.5.2.2 - Le pH

L'étude de l'effet du pH initial du milieu de culture sur la production de l'éthanol par *P. caribbica* a révélé que cette levure se développe dans une zone de pH située entre 3 et 6, (figure 25). La production de l'éthanol par *P. caribbica* augmente progressivement jusqu'à pH 5 où la production devient maximale (12,6g/L), une baisse de la production d'éthanol (2,68 g/L) est observée à pH 3. Cette constatation démontre que cette souche produit de l'éthanol à pH légèrement acide.

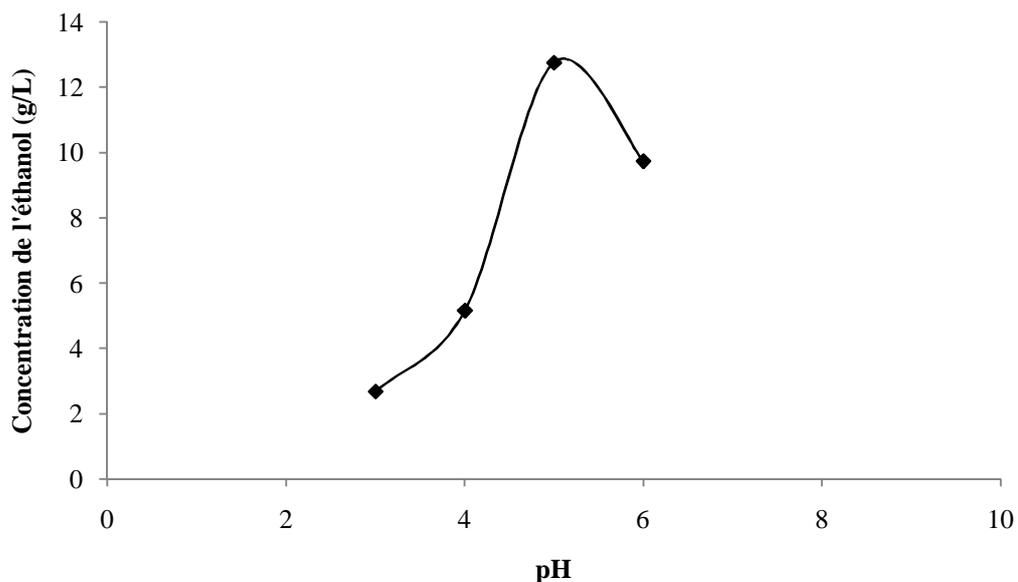


Figure 25 Effet du pH sur la production d'éthanol.

4.5.3- Sélection de la concentration optimale d'inuline pour la production d'éthanol

Différentes concentrations d'inuline allant de 10 g/L à 40g/L sont testées pour déterminer la meilleure production de l'éthanol par *P. caribbica*, à 37°C et à pH 5 (figure 26).

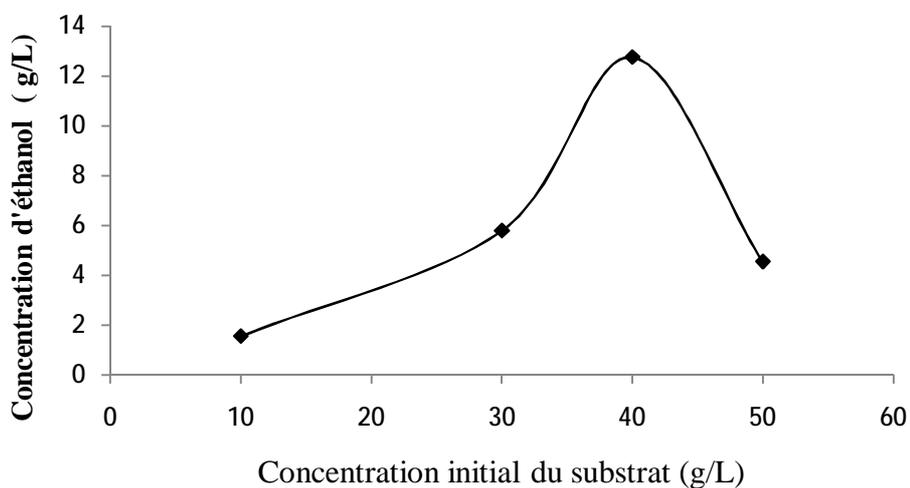


Figure 26 Influence de la concentration initiale du substrat sur la production d'éthanol.

Les résultats obtenus montrent que 40 g/L d'inuline est la meilleure concentration pour la production de l'éthanol, une baisse de production de l'éthanol (1,57g/L) est observée lorsque la concentration initiale de l'inuline utilisée est de 10g/L.

L'ensemble des résultats de la sélection des conditions physicochimiques et de la sélection de la concentration de l'inuline montrent que la température de 37°C, le pH 5 et la concentration de 40 g/L d'inuline, représentent les conditions optimales de la production de l'éthanol par *P. caribbica*.

4.5.4- Production d'éthanol en fermenteur de 20 litres

Pour tester la capacité de *P. caribbica* à s'adapter aux conditions de scale-up (production en volume progressant), la souche est cultivée en fermenteur de 20 litres pour évaluer les paramètres suivants ; la croissance, consommation du substrat et la production d'éthanol.

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 27. Il ressort de cette figure, que l'éthanol est excrété pendant les premières 24h de fermentation et progresse pour atteindre un maximum de 14 g/L à 72h. À cet instant, tout le fructose est, complètement, consommé, aboutant à un rendement de 0,35g d'éthanol/g d'inuline ce qui enregistre une légère amélioration en comparaison à la culture en fioles. Après cette période, l'éthanol chute brusquement. L'évolution de la biomasse, pendant la période de production, passe également par deux phases majeures: la phase exponentielle, où la majorité de la quantité d'éthanol est produite, suivie d'une phase de ralentissement où le maximum de biomasse (18g/L) est atteint à 120 heures.

La cinétique globale de la production de l'éthanol dans le fermenteur de 20 litres révèle des valeurs supérieures à celles observées dans les fioles de 250 mL, en outre, ces résultats démontrent que *P. caribbica* s'adapte parfaitement aux conditions industrielles.

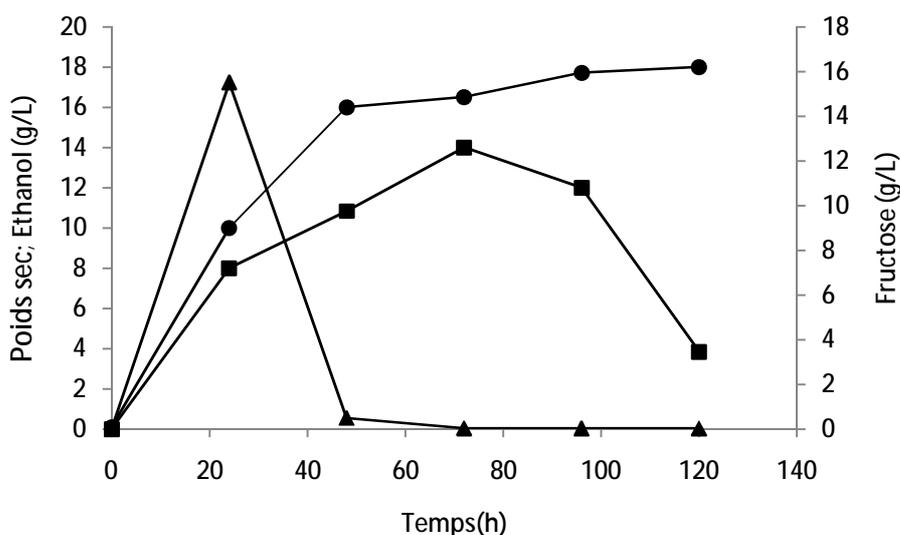


Figure 27 Évolution de la concentration de la biomasse, de la concentration du fructose et de la production d'éthanol par *P. caribbica* en fermenteur de 20 litres: (●) Concentration de la biomasse; (■) Concentration d'éthanol et (▲) Concentration du fructose.

L'analyse globale des différentes fermentations (en fioles et en fermenteur) montre qu'il y ait une corrélation partielle entre la production de l'éthanol et la production de la biomasse. En effet, la concentration de l'éthanol diminue, après la phase de ralentissement par contre, la biomasse demeure en légère augmentation après cette phase, ceci est expliqué par l'utilisation de l'éthanol par *P. caribbica* comme second substrat (phénomène de **Diauxie**).

4.6- Méthode d'analyse

4.6.1- Détermination de l'activité inulinasique en fiole

L'objectif de la recherche de l'activité enzymatique exoinulinasique dans le milieu de fermentation est de déceler le pouvoir de dégradation de l'inuline par *P. caribbica*, étant donné que cette enzyme catalyse la dégradation de ce substrat. Les résultats obtenus durant la fermentation révèlent que l'enzyme est secrétée dans le milieu dès le démarrage de la fermentation, se coïncidant avec la libération de la plus grande quantité du fructose (figure 28).

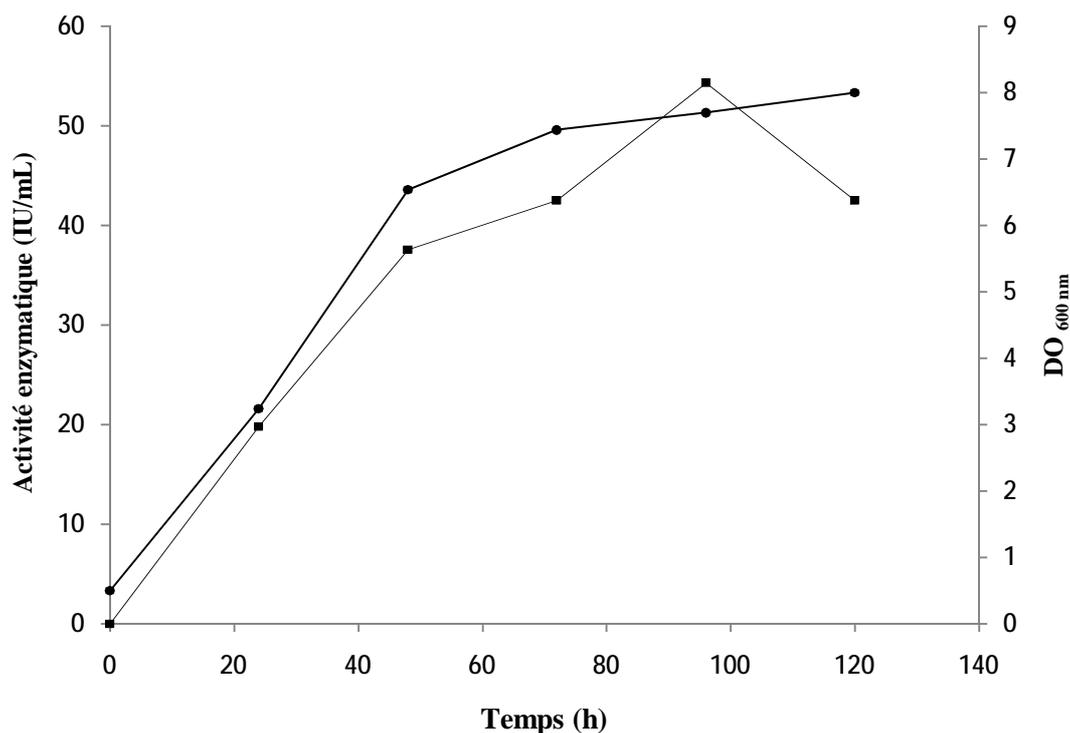


Figure 28 Evolution de l'activité inulinase (■) et la concentration de la biomasse (●) pendant la période d'incubation.

Au début de la fermentation, la production de l'inulinase augmente progressivement avec la croissance cellulaire, atteignant 54.27 IU/ mL et DO 8, respectivement à 96h de fermentation. En revanche, la diminution de l'activité de l'inulinase est observée après 96 heure de fermentation et continue de régresser pour atteindre la valeur de 42,49 IU/ml à la fin de fermentation (120 heures). Cette diminution peut être expliquée par la lyse des cellules et la libération des protéases qui réagissent avec les protéines, entre autres, l'inulinase.

4.6.2- Détermination de l'activité enzymatique en fermenteur de 20 litres

La figure 29 décrit l'évolution de l'activité exoinulinasique en fermenteur de 20litres. Au début de la fermentation, la production de l'inulinase augmente progressivement avec la croissance cellulaire, pour atteindre 55.47 IU/mL et 18g/L respectivement à 96h de fermentation, après cette période, l'activité de inulinase commence à diminuer pour atteindre la valeur de 43 IU/ ml au bout de 120 heures (à la fin de fermentation).

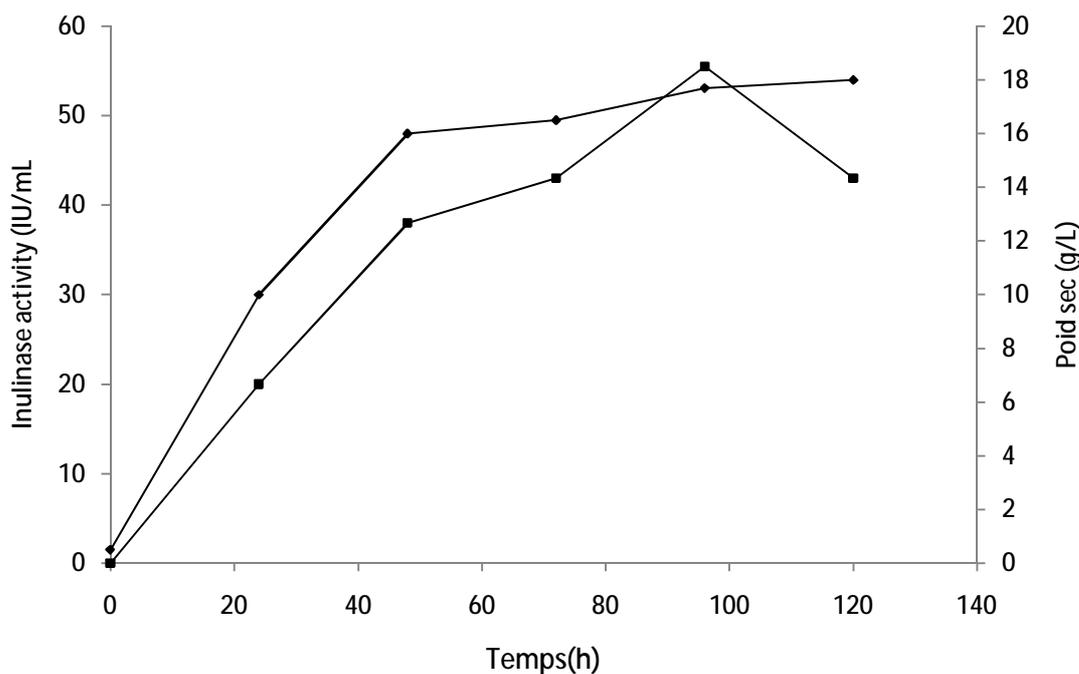


Figure 29 Evolution de l'activité inulinase en fermenteur de 20 litres (■) et la concentration de la biomasse (◆) pendant la période d'incubation.

Par comparaison entre la fermentation en fioles et en fermenteur, il ressort que les valeurs obtenues en fermenteur enregistrent une légère amélioration par rapport à celles développées en fioles ce qui procure à la souche le caractère industriel.

4.6.3- Caractérisation partielle de l'inulinase

A- Influence du pH du mélange réactionnel sur l'activité enzymatique de l'Inulinase

L'objectif de ce test est de déterminer l'effet du pH du mélange réactionnel sur l'activité enzymatique de l'Inulinase. Les mesures du pH sont prises lorsque le mélange réactionnel est incubé à 37°C. Pour ce faire, plusieurs valeurs du pH comprises entre 3,3 et 5 sont testées. Les résultats obtenus montrent que la meilleure activité enzymatique de l'inulinase (80,21 IU/mL) est enregistrée à pH 3,4, cependant la valeur minimale de l'activité inulinase est de 31,57 IU/mL notée à pH 3,3 (figure 30)

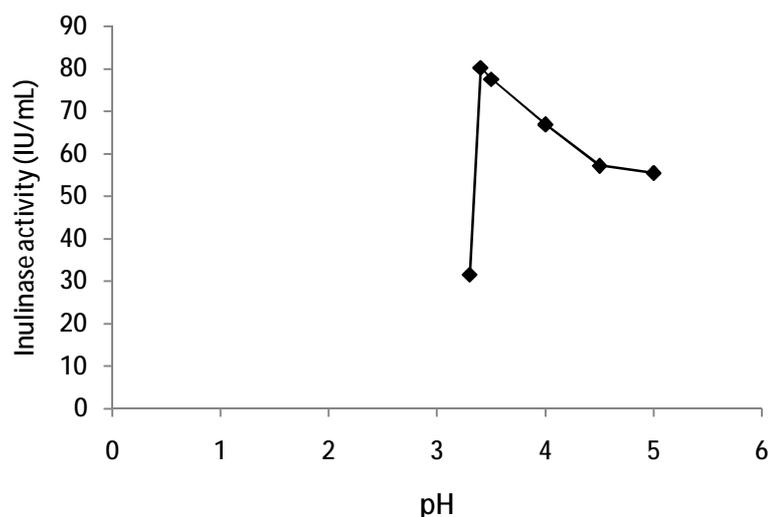


Figure 30 Influence du pH sur l'activité d'inulase

B- Influence de la température du mélange réactionnel sur l'activité enzymatique de l'inulase

Pour déterminer l'effet de la température sur l'activité enzymatique de l'inulase, plusieurs valeurs sont testées, comprises entre 37°C et 65°C à pH 3,4.

Il est remarquable que l'activité maximale de l'inulase (108,72 IU/mL) est enregistrée à température 55°C, en revanche, la plus faible activité (80,21 IU/mL) est notée à 37°C (figure 31).

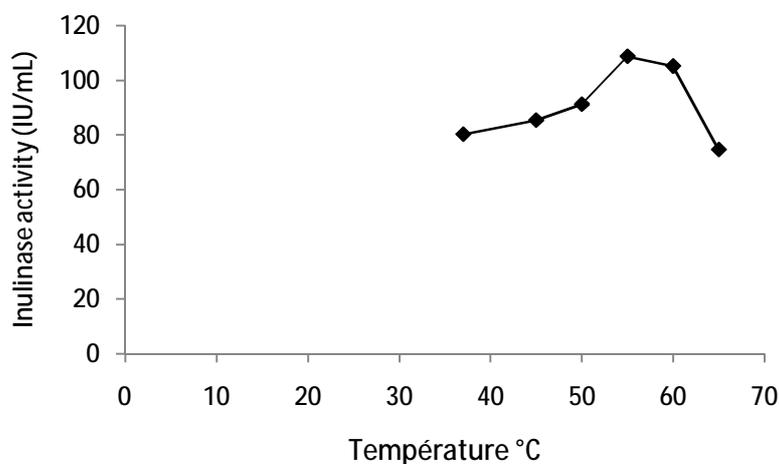


Figure 31 Influence de la température sur l'activité d'inulase.

C- Étude de thermostabilité de l'inulinase de *P. caribbica*

Pour déterminer la stabilité thermique de l'inulinase, des tubes contenant le mélange réactionnel sont préparés et incubés à de différentes températures (45 °C, 50°C, 55, et 60°C) et ce, pendant **une heure** du temps (temps de réaction prolongé).

Les résultats obtenus montrent que la meilleure stabilité de l'Inulinase (74,58U/mL) est enregistrée à 55°C (figure 32).

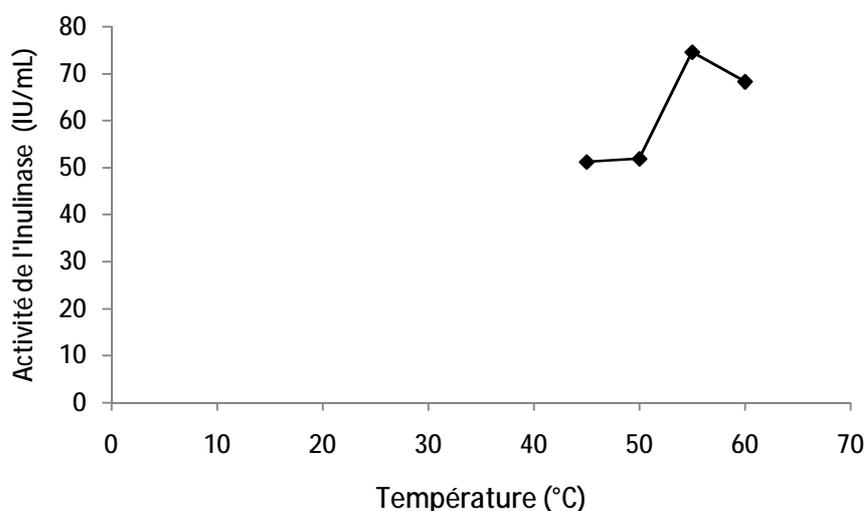


Figure 32 Etude de la thermostabilité de l'inulinase de *P. caribbica*.

4.7- Production d'éthanol sur milieu à base de l'artichaut

L'utilisation de l'artichaut dans cette étude est motivée par sa richesse en inuline. En effet, la production d'éthanol par *P. caribbica* sur milieu de culture préparé à base d'artichaut comme seule source de carbone et d'azote est détectée par la présence de quantité très appréciable de gaz dans la cloche de Durham (+++) (figure 33). En terme de quantité, la production d'éthanol sur ce substrat est supérieure à 14g/L dépassant la quantité produite par la souche sur milieu à base d'inuline pure. Ce résultat, considéré préliminaire, ouvre la voie sur l'exploitation ultérieure de l'artichaut comme substrat du milieu de fermentation pour la production de bioéthanol par *P. caribbica*.



Figure 33 Quantité du gaz dégagé dans la cloche du Durham par *P. caribbica* sur milieu à base de l'artichaut.

4.7- Modélisation

Des modèles mathématiques correspondant au processus biotechnologique de la fermentation par *P. caribbica* sont implémentés pour simuler le fonctionnement de ce phénomène. Les modèles utilisés permettant d'appréhender la dégradation du substrat, l'évolution de la biomasse (croissance) et la production de l'éthanol.

Dans le présent travail, l'objectif principal de la modélisation est la validation des modèles obtenus en comparaison avec les résultats de l'expérimentation en utilisant le fermenteur de 20 litres. En effet, une bonne adéquation des profils montre que ces modèles sont acceptables pour prédire le processus de la fermentation par *P. caribbica*.

4.7.1- Résolution des équations

4.7.1.1- Modèle de Monod

La première étape de la modélisation du métabolisme levurien consiste à décrire l'évolution de la population microbienne en fonction du temps dans des conditions environnementales particulières. Dans le présent travail, le modèle de **Monod** est appliqué pour simuler la croissance de *P. caribbica*, (le modèle le plus répondu). Il est, intéressant, de noter que ce modèle prend en considération la phase où la concentration des cellules est —maximale

(exponentielle), néanmoins, les phases de latence et de déclin ne sont pas considérées par ce modèle. La résolution des équations décrites ci-dessous est effectuée selon la méthode FDTD :

Selon l'équation 1 de **Monod** :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S+K_S} \dots \dots (1)$$

La discrétisation de l'équation (1) développe

$$\mu = \mu_{max} \frac{S^t}{S^t+K_S} \dots \dots (11)$$

L'évolution de la croissance pendant le temps est présentée comme suit (Équation 8) :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \dots \dots (8)$$

la discrétisation de l'équation (8) développe

$$\frac{X^{t+1} - X^t}{dt} = \mu^t X^t \dots \dots (12)$$

$$X^{t+1} = (dt \cdot \mu^t) X^t + X^t \dots \dots (13)$$

$$X^{t+1} = (dt\mu^t + 1) X^t \dots \dots (14)$$

4.7.1.2- Modèle de Luderking et Piret

L'intervention d'une expression mathématique pour décrire la cinétique de production de métabolites au cours de la croissance est indispensable, cette cinétique de formation des produits microbiens, peut être alors divisée, en trois groupes qui correspondent chacun à un comportement métabolique différent en l'occurrence: *liée à la croissance*, quand le produit est formé simultanément avec la biomasse, dans ce cas, les vitesses spécifiques de formation du produit et de croissance sont proportionnelles; *dissociée de la croissance*, quand un métabolite est produit lors de la phase stationnaire alors que la vitesse de croissance est nulle. Cette fois, la vitesse spécifique de formation du produit est constante; *partiellement associée*

à la *croissance*, quand la formation du produit est présente lors de la phase de croissance et lors de la phase stationnaire. C'est le cas du modèle de *Luderking* et *Piret* qui est appliqué dans le présent travail pour simuler l'évolution de l'éthanol au cours du temps est *partiellement associée à la croissance* « notre expérience ».

Selon *Luderking* et *Piret* (Équation 3):

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \dots (3)$$

La discrétisation de l'équation (3) développe

$$\frac{P^{t+1} - P^t}{dt} = \alpha \frac{X^{t+1} - X^t}{dt} + \beta X^t \dots (15)$$

$$\frac{P^{t+1} - P^t}{dt} = \alpha \mu^t X^t + \beta X^t \dots (16)$$

$$P^{t+1} - P^t = (\alpha \mu^t X^t + \beta X^t) dt \dots (17)$$

$$P^{t+1} = (\alpha \mu^t X^t + \beta X^t) dt + P^t \dots (18)$$

$$P^{t+1} = \alpha \mu^t X^t dt + \beta X^t dt + P^t \dots (19)$$

$$P^{t+1} = (\alpha \mu^t + \beta) dt X^t + P^t \dots (20)$$

4.7.1.3- La forme modifiée de Luderking et Piret

Les deux premiers modèles sont incomplets pour modéliser le comportement du métabolisme levurien, pour cela, l'intégration de modèle de consommation du substrat est indispensable. La forme modifiée de *Luderking* et *Piret* est appliquée pour simuler la consommation du substrat qui est dans notre cas le **fructose** car *P. caribbica* est capable de convertir uniquement une quantité d'inuline en fructose, qui est transformé, ensuite, en éthanol, et d'après la littérature, il n'existe pas de relations analytiques reliant les substrats inuline et le fructose.

Selon la forme modifiée de *Luderking* et *Piret*

$$\frac{dS}{dt} = \gamma_S = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} - m_S X \dots (21)$$

En combinant les équations (3) et (21), on obtient

$$\frac{ds}{dt} = -\gamma \frac{dX}{dt} - \lambda X \dots (22) \text{ avec}$$

$$\gamma = \left\{ \frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{\alpha}{Y_{P/S}} \right\} \quad \lambda = \left\{ \frac{\beta}{Y_{P/S}} + m_S \right\}$$

La discrétisation de l'équation (22) développe

$$\frac{S^{t+1} - S^t}{dt} = -\gamma \mu^t X^t - \lambda X^t \dots (23)$$

$$S^{t+1} - S^t = (-\gamma \mu^t X^t - \lambda X^t) dt \dots (24)$$

$$S^{t+1} = -(\gamma \mu^t X^t + \lambda X^t) dt + S^t \dots (25)$$

$$S^{t+1} = -(\gamma \mu^t + \lambda) X^t dt + S^t \dots (26)$$

Les équations résolues sont présentées sous MatLab comme suit (figure 34)

```

clear all
% Déclaration des constantes
dt=0.01;
mu_max=0.05;
ks=5;
alpha=33.04;
beta=0.0001;
gamma=3;
lamda=0.1;
%===== Initialisation temporelle des variables =====
x=zeros(1,280);
s=zeros(1,280);
p=zeros(1,280);
x(1)=0.1;
s(1)=15,5;
p(1)=0;
%=====
n=round(120/dt);
for t=1:n
    t
    mu=mu_max*(s(t)/(s(t)+ks));
    x(t+1)=(mu*dt+1)*x(t);
    p(t+1)=(gamma*mu+beta)*dt*x(t)+p(t);
    s(t+1)=-((gamma*mu)+lamda)*dt*x(t)+s(t);
    %
    muu(t)=mu;
end
t1=0:n;
tt=t1*dt;
plot(tt,x)

```

Figure 34 Présentation des équations sous MatLab.

4.7.2- Estimation des paramètres

4.7.2.1- Estimation de μ_m et de K_s

La méthode utilisée pour estimer ces paramètres est celle de **Lineweaver-Burke**. Elle consiste à transformer l'équation de Monod de manière à obtenir l'équation d'une droite, plus facile à interpréter,

Selon Monod :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S+K_S} \dots \dots (1)$$

L'inverse de l'équation de Monod donne :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} \cdot \frac{S + K_S}{S} \dots (27)$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \dots (28)$$

La relation (5) est l'équation d'une droite de type $\frac{1}{\mu} = F \left(\frac{1}{S} \right)$ dont la pente est égale à

$$\frac{K_S}{\mu_{max}}, \text{ et l'ordonnée à l'origine } \frac{1}{\mu_{max}}$$

4.7.2.2- Estimation de γ et de λ

Pour estimer les paramètres γ et λ , l'équation (15) est divisée sur X :

On obtient

$$\frac{r_S}{X} = \gamma \frac{r_X}{X} + \frac{\lambda X}{X} \dots (29) \text{ avec } \frac{dS}{dt} = r_S$$

$$\frac{r_S}{X} = \gamma \mu + \lambda \dots (30)$$

La relation (9) est l'équation d'une droite de type $\frac{r_S}{X} = F(\mu)$ dont la pente est égale à γ et l'ordonnée à l'origine λ .

Une analyse extensive de la littérature bibliographique a montré que très peu de travaux ont fourni une estimation de quelques uns des paramètres de ces modèles on l'occurrence ; α et β . Les paramètres alpha et bêta sont identifiés pour l'expérience en ajustant le modèle aux données expérimentales. Dans notre simulation, les différents paramètres sont évalués par les valeurs suivantes (tableau 18).

Tableau 18 Paramètres des modèles

Les modèles	Paramètres du modèle	Valeurs
Modèle de Monod	X_0	0,1g/L
	P_0	0
	S_0	15,5
	μ_{max}	0,05 1/h
	K_S	5 (g/L)
Modèle de Leudeking et Piret)	λ	0,1 (1/h)
	γ	3
	α	33,04
	β	0,0001(1/h)

4.7.3- Validation des modèles

4.7.3.1- Modèle de Monod

La comparaison de données expérimentales avec les valeurs prédites par le modèle de Monod pour la croissance de la biomasse est présentée dans la figure 35.

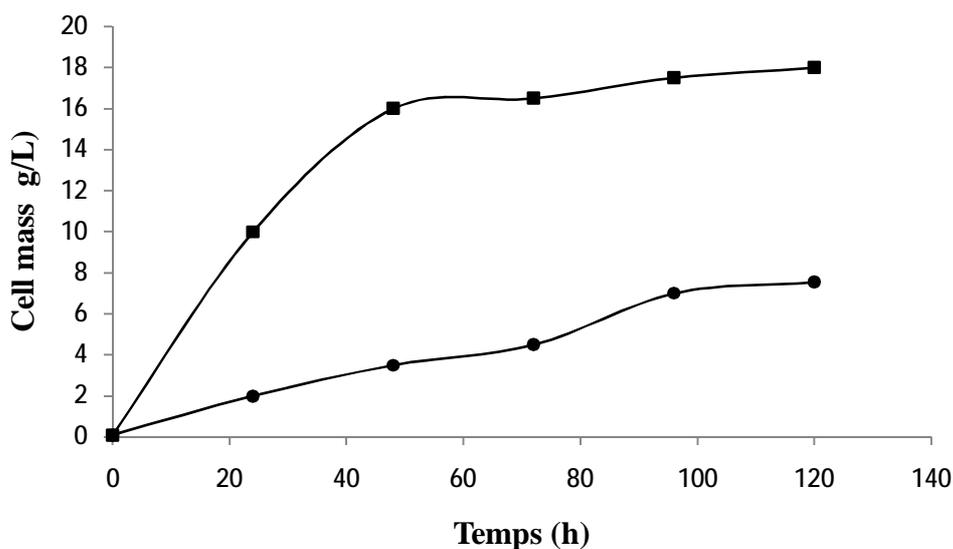


Figure 35 Evolution de la concentration de biomasse pendant le temps : ■, données expérimentales ; ●, données prédites par le modèle de Monod.

Ces résultats montrent une bonne correspondance qualitative des profils obtenus par notre simulation en comparaison avec les résultats expérimentaux. Il est donc possible de prédire le développement de *Pichia caribbica* en utilisant le modèle de **Monod**.

4.7.3.2- Modèle de Luedeking et Piret

Le résultat de simulation permettant de visualiser graphiquement l'évolution du produit (éthanol) pour l'expérience et la prédiction par l'utilisation du modèle de Luedeking et Piret, est présenté dans la figure 36.

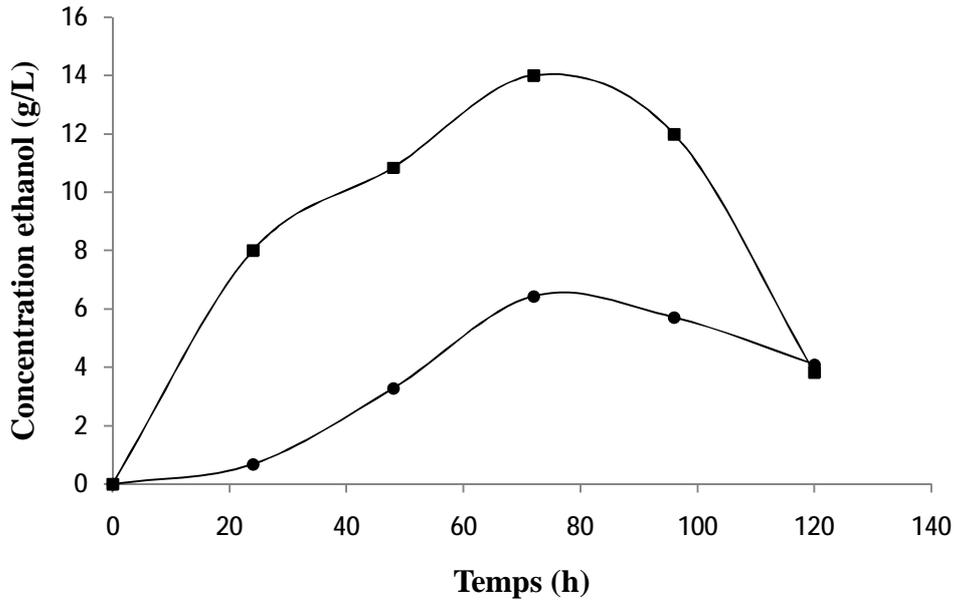


Figure 36 Evolution de l'éthanol pendant le temps : ■, données expérimentales ; ●, données prédites par le modèle de Luedeking et Piret.

L'analyse des résultats montrent qu'il existe une adéquation qualitative entre les données expérimentales et les données calculées par le modèle de **Luedeking et Piret**.

4.7.3.3- La forme modifiée de Luedeking et Piret

La figure 37 montre la comparaison entre la consommation du fructose par *P. caribbica* après les 24 heures pour l'expérience et la prédiction par l'utilisation de la forme modifiée de modèle du **Luedeking et Piret**

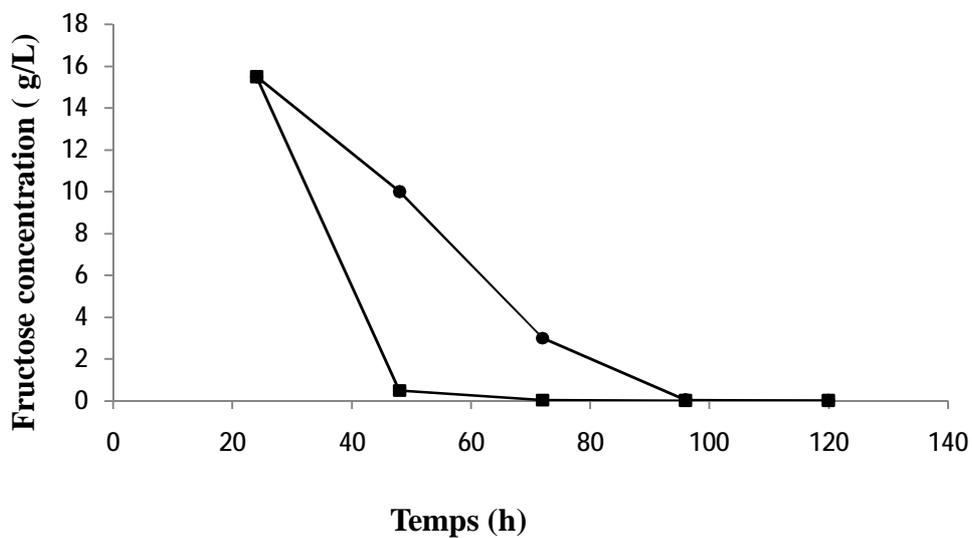


Figure 37 Evolution de la consommation du substrat pendant le temps : ■, données expérimentales ; ●, données calculées par le modèle modifié de **Luedeking- Piret** .

Il a été constaté, du fait, une bonne correspondance **qualitative** des profils obtenus par notre simulation en comparaison avec les résultats expérimentaux. Il est donc, possible de prédire la consommation du substrat par *P. caribbica* en utilisant la forme modifiée du modèle de **Luedeking- Piret**.

Enfin, les modèles prédictifs de l'évolution du processus de la fermentation par la levure *P. caribbica* dans un milieu contenant l'inuline comme seule source de carbone sont proposés. Ces modèles peuvent constituer un outil pour évaluer le processus de fermentation par *P. caribbica*. Toutefois, il est intéressant de souligner, qui' il faut rester prudent dans l'utilisation de ces modèles en travaillant dans ses limites d'application.

Discussions

5- Discussion

Le monde doit faire face à trois problèmes majeurs qui sont, l'augmentation de la population, la diminution des ressources naturelles et le changement climatique. Il est très vraisemblable, que la croissance démographique est la cause capitale de l'augmentation des besoins en consommation, qui exerce une pression, de plus en plus, grandissante, sur les ressources naturelles en particulier, les diverses sources d'énergie (Black *et al.*, 2011). Actuellement, les sources d'énergie exploités, en l'occurrence, le pétrole ; le gaz ; le charbon et l'uranium, sont le moteur de déroulement de tous les domaines et le socle, sur lequel, repose l'activité humaine. Néanmoins, toutes ces formes d'énergies sont épuisables et disparaissent au fur et à mesure qu'elles sont utilisées. Pour palier à ce problème qui risque de nuire à la vie humaine, l'homme a entamé, durant ces dernières vingtaine d'années, la mise en production des énergie alternatives, dites nouvelles ou renouvelables (énergie solaire, éolienne et hydraulique, biocarburants) (Drapcho *et al.*, 2008). Cependant, les biocarburants demeurent les seul à êtres utilisés dans le secteur du transport atteignant, dans certains pays, 50% de la consommation totale annuelle (Escobar *et al.*, 2009 ; Black *et al.*, 2011).

Les biocarburants utilisés actuellement de manière commerciale sont ceux issus des technologies dites de « première génération » utilisant des cultures alimentaires où seule une partie de la plante est transformée. Deux filières coexistent à savoir ; la filière des huiles et la filière des sucres, la première permet l'obtention du biodiesel, sous la forme d'ester méthylique des huiles végétales. Alors que la seconde repose sur la production du bioéthanol par voie fermentaire, en utilisant des microorganismes (Martin *et al.*, 2002; Melvydas *et al.*, 2006). C'est dans cette dernière optique que s'inscrit l'objectif de notre travail qui est amorcé par les points de recherche suivant :

1. Sélection des isolats levuriens, à partir de milieu aride, producteurs de l'éthanol sur divers sucres ;
2. Identification des isolats performants et sélection de facteurs physico-chimiques optimums de production d'éthanol à partir de l'inuline, par la proposition d'un modèle de production de biomasse, de consommation du substrat et de la formation du produit pour prédire le processus de fermentation.

Les données climatologiques de la région de Biskra (milieu aride et source d'échantillons) collectées durant la période d'échantillonnage (2010), montrent une précipitation annuelle faible de l'ordre de 15.38 mm, confirmant, que la région prospectée est une zone aride qui constitue un milieu naturel presque extrême (Mohamed et Hind, 1998; Margat, 1985). Par ailleurs, l'analyse chimique des échantillons du sol de palmeraie du même site révèle que ce dernier est pauvre en matière organique (1,307%) et riche en sel (11,43 mS/cm), ce qui prouve, selon la classification de Richard, (1969), que l'échantillon exploré est extrêmement salé. Ces résultats corroborent ceux de Bryssin et Totain, (1970) et Bouzoura et Totain, (1970), qui rapportent que la richesse chimique des sols de palmeraies est très variable: les sols légers, sont pauvres en humus, en azote, en acide phosphorique et en potasse ; les sols moyens lourds (sols argileux, argilo-sableux, limoneux, argilo-limoneux) sont, en général, pauvres en humus, en azote et insuffisamment pourvus en acide phosphorique assimilable. D'un autre coté, Bedrani, (1995) a indiqué que les sols steppiques sont caractérisés par la présence d'une teneur faible en matières organiques, en azote et une forte sensibilité à l'érosion et à la dégradation (les ressources hydriques sont faibles).

L'exploration des échantillons du sol a abouti à l'isolement de 9 isolats levuriens. Ce nombre reste très négligeable par rapport à l'énorme diversité en souches levuriennes d'un écosystème où les conditions climatiques et physicochimiques sont optimales (Phaff et Starmer, 1987). Cette faible diversité, peut être liée au pH relativement basique (7,64) du sol, favorisant, plutôt, la croissance des populations bactériennes et pas celles des levures qui préfèrent le pH acide (Allen et Ahearn, 1987 ; Larpent et Gaurgaud, 1997). Par ailleurs, Il a été établi que les zones arides, en général, sont peu riches en espèces biotiques, néanmoins, elles abritent de nombreuses espèces indigènes animales, végétales et microbiennes, ayant élaborées des stratégies particulières pour s'adapter aux conditions environnementales extrêmes (LeBerre et Ramousse, 2001).

L'ensemble des isolats sont obtenus à des profondeurs différentes. En effet, les isolats **L₆** et **L₇** sont obtenus de la profondeur de **10 cm**, alors que, de la profondeur de **20 cm**, six souches sont isolées, en l'occurrence **L₁**, **L₂**, **L₄**, **L₅**, **L₈** et **L₉**, enfin, l'isolat **L₃** est le seul à être obtenu de la profondeur de **25 cm**. Ces résultats montrent, en outre, que les souches levuriennes isolées sont considérées autochtones du site selon Phaff et Starmer, (1987) et Calvet, (2003).

Le test de sélection effectué, sur différentes catégories de sucres, a permis de sélectionner l'isolat levurien (L₅) qui a pu dégager une quantité importante du gaz dans la cloche de Durham dans le cas du fructose et d'inuline. L'étude réalisée par Bonciu *et al.* (2010) a décrit la capacité de certaines souches levuriennes à fermenter ces sucres dans les mêmes conditions expérimentales empruntées dans ce travail.

L'identification macroscopique de l'isolat L₅ montre que la forme de ces colonies est ovale, de couleur blanche et de taille moyenne. L'observation microscopique a révélé que le mode de reproduction de cet isolat est le bourgeonnement pouvant, en outre, se trouver sous forme unicellulaire ou développant un pseudomycélium suivant les conditions environnementales, ce qui lui procure le caractère dimorphe. En plus, les tests biochimiques réalisés ont montré que cet isolat est capable de fermenter le fructose, le saccharose, le glucose et le raffinose, en revanche, il est incapables de fermenter le galactose, le maltose, le lactose et le mélibiose. Sur un autre profil, il est capable d'assimiler le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose, le céllbiose, le tréhalose, le raffinose, le L-arabose et le D-xylose, mais n'assimile pas l'inositole et le lactose. Enfin, les nitrates et les vitamines ne s'avèrent pas nécessaires pour sa croissance. Ces observations sont en parfaites concordance avec celles constatées par Kurtzman, (2000) qui a montré que ces caractères sont, généralement, développés par des souches du genre *Pichia*. L'identification moléculaire de l'isolat par des analyses d'ADN-18S s'avérait insuffisante car, elle montrait que la souche est liée à deux espèces du genre *Pichia*, à savoir : *P. guilliermondii* et *P. caribbica*. Cependant, la confirmation de l'identification est réalisée par l'analyse du gène *ITS* qui révèle que la souche en question est *Pichia caribbica*, avec une similarité de 100%. Vaughan-Martini *et al.*, (2005), ont utilisé plusieurs techniques moléculaires pour distinguer entre les deux espèces, comme l'hybridation, divergence des nucléotides dans les domaines D1/D1 du r-ADN (26S) et les différents profils électrophorétiques du caryotype.

Il est intéressant de noter, que la levure *Pichia caribbica*, selon les travaux de Vaughan-Martini *et al.*, (2005) et Kurtzman et Suzuki, (2010), a été isolée à partir d'une variété de substrats comprenant le sol, l'amidon de dérivés de maïs, de la canne à sucre et apparentes aussi, dans des infections humaine, ce qui suggère que *P. caribbica* est largement distribué géographiquement. **En revanche, cette souche n'a jamais été isolée à partir du sol des zones arides d'un côté, et elle n'a jamais été utilisée pour la production d'éthanol à partir d'inuline de l'autre côté et selon Kurtzman *et al.* (2011), l'utilisation de *P. caribbica* dans le domaine de biotechnologie, de l'agriculture et dans le domaine**

agroalimentaire est inconnue. De ce fait, ces résultats peuvent être considérés comme une avancée importante dans le domaine de la Biotechnologie.

La production d'éthanol par *Pichia caribbica* sur un milieu de culture de base, composé essentiellement, de l'inuline pure, est effectuée en deux étapes; la saccharification de l'inuline en fructose et la fermentation de ce dernier en éthanol. Cette souche est donc, parmi les rares microorganismes capables de réaliser les deux étapes de production d'éthanol comme il est le cas des souches microbiennes citées par Yuan *et al.*, (2008); Zhang *et al.*, (2010); Chi *et al.*, (2009) et Lim *et al.*, (2011). Par contre, d'autres travaux ont montré que la conversion de ce substrat en fructose pour la production d'éthanol nécessite l'intervention de deux types de microorganismes (Ohta *et al.*, 1993 ; Nakamura *et al.*, 1996 ; Neagu et Bahrim, 2012).

Dans le présent travail, *P. caribbica* empreinte une voie métabolique de la glycolyse qui se déroule entièrement dans le cytosol; le processus indispensable qui prépare à la dégradation de glucose, selon deux voies; oxydative et fermentaire (métabolisme oxydo-réductif). Il est à noter, que le métabolisme des autres sucres comme les polysaccharides, les disaccharides et les monosaccharides suit la même voie décrite ci-dessus, sauf qu'il passe, d'abord, par des réactions transformant le sucre concerné en 3- glycéraldéhyde phosphate avant de suivre les autres voies. Le métabolisme oxydo-réductif est expliqué par plusieurs auteurs, entre autre ; (Alexander et Jeffries, 1990 ; Fiechter et Seghezzi, 1992 et Lei *et al.*, 2001) qui ont fourni une interprétation du métabolisme des levures basée sur le phénomène d'*overflow* au niveau des nœuds pyruvate et acétaldéhyde. Au niveau du nœud pyruvate, l'enzyme pyruvate déshydrogénase a une affinité plus forte pour le pyruvate que l'enzyme pyruvate décarboxylase. Aux faibles flux glycolytiques, le pyruvate est converti via la pyruvate déshydrogénase vers le cycle de Krebs. Quand le flux glycolytique dépasse une valeur critique, la pyruvate déshydrogénase devient saturée et l'acétaldéhyde, dans ce cas, est formé et, préférentiellement, converti en acétate. En revanche, lorsque l'acétaldéhyde déshydrogénase est saturée, l'acétaldéhyde serait transformé en éthanol (Postma *et al.*, 1989; Schipper *et al.*, 1989; Fera-Gervasio *et al.*, 2008).

Sur un volet complémentaire, il ressort des résultats que, l'utilisation de l'éthanol comme source de carbone par *P. caribbica* ne se déclenche que, lorsque le fructose est fortement consommé dans le milieu de fermentation.

En effet, l'utilisation de l'éthanol comme source de carbone par les levures est un sujet déjà discuté. Il a été établi que la consommation de l'éthanol par les levures favorise

l'augmentation de la productivité cellulaire (Guiraud *et al.*, 1971). Par ailleurs, Sonnleitner et Kappeli, (1986) ont proposé un modèle sur le métabolisme de la cellule levurienne qui dépend du substrat (le glucose), lorsque le taux de glucose est égale à la capacité oxydative de la cellule, la cellule ne produit pas de l'éthanol et le glucose, dans ce cas, il n'est pas limitant, en revanche, si le flux du glucose est nul, la levure consomme les autres constituants de milieu. Dans ces deux cas la concentration des cellules est faible, ce qui aboutit à une faible biomasse. Dans le cas où la concentration en glucose dépasse la capacité oxydative de la levure, à ce moment, une partie du glucose est fermentée en éthanol. Ce phénomène est connu sous l'appellation d'effet Crabtree (Crabtree, 1929). Si la concentration en glucose est inférieure à la capacité d'oxydation des levures, ces dernières sont capables d'oxyder l'éthanol du milieu. Comme dans d'autres cas, les réactions d'oxydation de l'éthanol et du glucose peuvent avoir lieu simultanément (Fillon, 1996).

Dans cette étude, les résultats de la sélection de température optimale pour la production d'éthanol par *Pichia caribbica* à partir d'inuline comme seule source de carbone ont montré que cette souche, est capable de produire l'éthanol dans des températures élevées allant jusqu'à 40°C, avec un optimum dans 37°C. À cet effet, l'évaluation des températures optimales du processus de fermentation alcoolique de quelques souches de levures sur différents substrats dans l'étude réalisée par Torija *et al.*, (2002) a montré qu'elles varient entre 30°C et 40°C. Par ailleurs, des résultats semblables à ceux trouvés dans le présent travail ont été montrés auparavant par Zhang *et al.*, (2011), qui a travaillé sur la production d'éthanol par la souche *P. guilliermondii* à partir d'inuline. En outre, les travaux élaborés par Yuan *et al.*, (2008), ont montré que la température optimale de production d'éthanol à partir de *Jerusalem artichoke* par *Kluyveromyces* est de l'ordre de 35°C.

Le pH est un facteur qui influence significativement la production de l'éthanol par différents mycètes (Dumenil et Sanglier, 1989). De faibles variations de pH peuvent avoir des effets particuliers sur la productivité d'une souche (Hata *et al.*, 1971). Dans le présent travail, l'étude de l'effet du pH initial du milieu de culture sur la production de l'éthanol par *P. caribbica* a révélé que la levure se développe dans une zone de pH située entre 3 et 6 avec un optimum de 5. Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux des travaux de Yuan *et al.*, (2008) qui ont montré que la valeur optimale du pH requis pour la production d'éthanol par *Kluyveromyces marxianus* à partir d'inuline est égale à 5.

Plusieurs travaux ont montré que la concentration optimale initiale de l'inuline, utilisée pour la production d'éthanol par les levures est variable (Singh, 2010., Zhang *et al.*, 2010). Dans le présent travail, l'augmentation progressive de la concentration d'inuline a abouti à une augmentation de la concentration d'éthanol atteignant 12g/L pour 40g/L d'inuline. La diminution de la production d'éthanol, quand la concentration d'inuline est élevée (50g/L), peut être expliquée par la libération de grandes quantités de sucres réducteurs et de substrat inhibiteurs (Singh *et al.*, 2006).

Dans cette étude, les résultats de la cinétique de synthèse de l'inulinase par *P. caribbica* révèlent que l'enzyme est sécrétée dans le milieu dès le début de la fermentation, cette production augmente avec la croissance. En effet, la production de l'inulinase augmente progressivement pour atteindre, à 96h de fermentation, 54.27 IU/mL et 55.47 IU/ mL, en fioles et en fermenteur, respectivement. Après cette période l'activité inulinasique commence à diminuer pour atteindre une valeur de 42,49 IU/ mL et 43 IU/ mL au bout de 120 heures de culture (fin de fermentation). L'activité enzymatique estimée dans le présent travail, est considérée comme étant importante par comparaison aux résultats de la littérature, publiés dans le même domaine. La production de l'inulinase étudiée par Singh *et al.*, (2006) chez plusieurs souches de levures à savoir ; *Candida pseudotropicalis*, *C. kefyr*, *K. fragilis*, a montré que la meilleure activité (40.5 IU/ml) a été détectée chez *K. marxianus* var. *bulgaricus* sur un milieu optimisé (3.5% inuline, beef extract 0.5%, MnSO₄ 0.5 mM, CoCl₂ 0.05 mM, SDS 0.4 mM, pH 6.5) à 30°C et sous une agitation de 150 rpm pendant 60h. Cependant, en modifiant par l'insertion du gène inulinase *inuA1* prélevé à partir d'*Aspergillus niger* AF10. Ce gène s'est effectivement exprimé aboutant à une activité enzymatique très appréciable équivalente de 50.6 IU/mL sur un milieu de fermentation liquide après 72h de culture (Zhang *et al.*, 2003).

La caractérisation partielle de l'inulinase produite est basée essentiellement sur la vérification du pH et de la température du mélange réactionnel et la stabilité de l'enzyme à des températures hautes. Dans la présente étude, la meilleure activité inulinasique, estimée à 80,21IU/mL est obtenue à pH 3,4. Des résultats similaires décrits par Gong *et al.*, (2007) et Singh *et al.*, (2006) ont montré que l'activité inulinase optimale de *P. guilliermondii* et de *K. marxianus* se trouve à un pH 3,4. Cependant, d'autres travaux ont montré que les pH optima de l'activité inulinasique produite par différents microorganismes est moins acide variant de pH 4,5 à pH 6,0. En effet, les valeurs du pH optimal de l'activité inulinasique de l'enzyme produite par ; *A. niger*, *A. versicolor*, *Penicillium janczewskii* se situent à 4,4 ; à 5,5 et à 4,8

respectivement (Ge et Zhang, 2006). En revanche, le pH optimal de l'activité inulinasique de l'enzyme produite par *Arthrobacter spp.* et *Bacillus polymyxa* varient entre 7 et 7,5 (Kang *et al.*, 1998 ; Chi *et al.*, 2009). De ce fait, il est clair que la source de l'enzyme a un rôle imminent dans le pH de l'activité enzymatique.

Par ailleurs, dans la présente étude, la meilleure activité inulinasique de l'enzyme produite par *P. caribbica* (108,72 IU/mL) est obtenue à 55°C. Ce résultat corrobore ceux des travaux de Zhang, (2010), qui ont noté une activité inulinasique optimale dans un intervalle de températures variant entre 50 et 60°C. Apparemment, cette variation de température réactionnelle est en rapport avec l'origine de l'enzyme. En effet, les souches *Kluyveromyces spp.* produisent des inulinases dont l'activité optimale est observée dans des températures variant entre 50 et 55°C (Pandey *et al.*, 1999), tandis que, les inulinases provenant de *Pichia guilliermondii* (Gong *et al.*, 2007), d'*A. ochraceus* (Guimaraes *et al.*, 2007) et de *Streptomyces spp.*, (Sharma *et al.*, 2006) ont une activité optimale à 60°C.

Par rapport à la stabilité de l'enzyme, nos résultats révèlent que la meilleure stabilité de l'inulinase produite par *P. caribbica* est enregistrée à 55°C après une heure du temps de réaction. Ce résultat corrobore ceux des travaux de (Gong *et al.*, 2007), qui ont noté une bonne stabilité à cette température. Par contre, l'inulinase produite par *Fusarium oxysporum* (Pandey *et al.*, 1999), *Penicillium janczewskii* (Sharma *et al.*, 2006) et *A. niger* (Pandey *et al.*, 1999), développe une stabilité thermique optimale à des températures plus basses se situant entre 30 et 40°C.

La production de l'éthanol par *P. caribbica* sur un substrat naturel autre que l'inuline pure a été évoquée dans cette recherche. L'expérience a porté, en effet, sur l'utilisation de l'artichaut comme source de carbone et d'énergie. Il a été constaté que, à part les parties comestibles de l'artichaut, les sous-produits tels que, les feuilles, les bractées externes et les tiges, qui représentent environ 80%, du poids total de la plante peuvent être une source prometteuse et bon marché d'inuline, pour la production d'éthanol par l'isolat. Les résultats obtenus ont montré la capacité de cette souche à produire de l'éthanol dans nos conditions expérimentales et par conséquent, la possibilité de son exploitation ultérieure pour la production de bioéthanol à l'échelle industrielle. Plusieurs auteurs ont évoqué l'utilisation de l'artichaut comme source d'inuline pour la production d'éthanol par divers microorganismes (Sébastien *et al.*, 2009 ; Bajpai et margaritis, 1982), **cependant, et à notre connaissance, ce travail est le premier à avoir utilisé *P. caribbica* pour la production d'éthanol, et en plus, de**

produire une quantité importante sur l'artichaut comme seule source de carbone dans le milieu, dépassant, même, la quantité de l'éthanol produite sur l'inuline pure.

Pour rappel, un des **objectifs majeurs** de cette étude, est la simulation du déroulement de processus de fermentation alcoolique de la souche *P. caribbica* sur l'inuline, par l'utilisation des modèles mathématiques en rapport avec le processus, enfin, la validation de ces modèles par l'expérimentation en utilisant le fermenteur de 20 Litres.

Les résultats de simulation par des modèles non structurés, permettent d'appréhender la dégradation du substrat, la croissance de la biomasse et la production de l'éthanol. Pour un choix approprié des paramètres du modèle, une bonne correspondance qualitative des profils obtenus par notre simulation en comparaison aux résultats expérimentaux a été notée. En effet, beaucoup d'auteurs ont travaillé sur la modélisation par l'utilisation des modèles non structurés (Mulchandani et Luong, 1989 ; Shafaghat *et al.*, 2009) et ont développé des résultats qui montrent leurs efficacité, si les mécanismes intracellulaires sont en régime permanent vis-à-vis des conditions de l'environnement.

En effet, notre étude montre une légère correspondance quantitative entre les profils de l'expérience et les profils de simulation, ceci est expliqué par l'utilisation des modèles non structurés qui décrivent les caractéristiques des microorganismes, en terme de masse cellulaire (nombre de cellules), sans pour autant, expliquer les phénomènes intracellulaires ce qui donne une faible description des systèmes dynamiques (Nielson et Villadsen, 1994). Ce type de modèle a fait l'objet des travaux d'Esener *et al.*, (1981) qui ont examiné l'application du modèle de Monod pour simuler une fermentation en *fed-batch* de *Klebsiella pneumoniae*. Il ne leur a pas été possible d'obtenir une bonne concordance entre leur modèle non structuré et les données de concentration en biomasse durant la phase exponentielle de croissance et dans la phase de ralentissement. Par ailleurs, Barford, (1990) a montré, après certaines expériences, qu'il n'était pas possible de prévoir l'effet *crabtree* en utilisant les modèles non structurés.

La littérature fouillée a montré qu'un nombre considérable d'études mathématiques ont confectionné des modèles pour les cultures du type continu (*Chemostat*) avec recyclage du substrat (Fereedman *et al.*, 1989); (Beretta *et al.*, 1990); (Ruan, 1993); (Beretta et Takeuchi, 1994); (Jiang et Ma, 1998); (Ruan et He, 1998); (Jang, 2000); (Lu, 2004); (Teng *et al.*, 2009) et (Yuan *et al.*, 2009), en revanche, peu de travaux sont consacrés à des cultures en *batch* (Bo Zhao *et al.*, 2010; Shafaghat *et al.*, 2009). Ce phénomène admet une seule

explication possible, reposant sur le fait que, durant la phase exponentielle de la croissance, la mortalité des cellules et le recyclage de substrat peuvent être négligés. Ce développement est très apprécié pour des applications industrielles.

*Conclusion et
perspectives*

6- Conclusion et perspectives

Dans cette étude, une caractérisation des souches de levures isolées à partir du sol d'un milieu aride Algérien a été effectuée, dans le but de sélectionner des souches ayant la capacité de produire l'éthanol. Plusieurs sucres sont testés pour cet objectif en l'occurrence, des monosaccharides (Xylose, Ribose, Arabinose [Pentoses], Glucose, Fructose et Raffinose [hexoses]) ; des disaccharides (Maltose, Lactose et Saccharose) et enfin des polysaccharides (Amidon, chitine, cellulose et inuline). Les meilleurs taux de production d'éthanol ont été observés dans le cas du fructose et d'inuline chez l'isolat levurien (L5).

Il a été conclu de cette partie, que l'isolat sélectionné a la capacité de dégrader le fructose ou le polymère de ce dernier (inuline), ou à un degré moins, le sucre qui se compose partiellement du fructose (saccharose). L'identification de cet isolat, qui a fait l'objet de la suite de ce travail, a révélé qu'il s'agit de *Pichia caribbica*, attributaire d'un numéro d'accession ; **KC977491. Le peu de travaux publiés concernant cette souche ne révèlent pas son appartenance au sol salin. Ce travail est le premier à l'avoir mis en évidence dans ce milieu.**

Pichia caribbica possède la capacité de production d'éthanol à partir d'inuline dans des conditions de fiole (12.6 g/L) et de fermenteur de 20 Litres (14g/L). Cette production, considérée appréciable pour une souche non connue, se réalise en deux étapes à savoir: la saccharification de l'inuline en fructose et la fermentation de ce dernier en éthanol. Cette production est obtenue grâce à la capacité de l'isolat à sécréter de l'inulinase, enzyme responsable de la dégradation de l'inuline.

La caractérisation partielle de l'inulinase révèle que, la meilleure activité inulinasique produite par *P. caribbica*, estimée à 108,72 IU/mL est obtenue à pH 3,4 et à une température de 55°C, ainsi que la meilleure stabilité de l'inulinase est enregistrée à la même température (55°C) et ce, après une heure du temps de réaction. **Ces constatations prouvent que cette souche, et par conséquent ses enzymes sont capables de résister au processus industriel.**

Le test préliminaire de la production d'éthanol par *P. caribbica* sur milieu de culture préparé à base d'artichaut comme seule source de carbone et d'azote, montre que l'exploitation ultérieure de ce dernier, comme source de biomasse dans la production industrielle de l'éthanol est possible.

Au terme de ce travail, il a été conclu que *Pichia caribbica* joue un rôle très important dans le domaine de la biotechnologie, car il est capable de sécréter une grande quantité d'inulinase et de produire par conséquent, de l'éthanol à partir d'un produit agricole.

La modélisation dans ce travail, a permis d'appréhender la dégradation du substrat (**la forme modifiée de Luderking et Piret**), la croissance de la biomasse (**Modèle de Monod**) et la production de l'éthanol (**Modèle de Luderking et Piret**). Pour un choix approprié des paramètres du modèle, une bonne correspondance qualitative des profils obtenus par notre simulation a été notée en comparaison avec les résultats expérimentaux obtenus.

Il a été conclu de cette partie que, la modélisation mathématique par l'utilisation des modèles non structurés pour **prédire le processus de fermentation par la levure *P. caribbica*, est une première et son développement ouvre des applications intéressantes sur le plan biotechnologique.**

De nombreuses perspectives découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies nécessaires concernant plusieurs points, à savoir :

- 1- L'étude approfondie du complexe enzymatique de *P. caribbica* permettant de dégrader l'inuline jusqu'à la production de l'éthanol ;
- 2- L'optimisation du milieu de fermentation par l'utilisation de l'artichaut comme seule source de carbone et d'azote pour la production d'éthanol par *P. caribbica* ;
- 3- L'utilisation des modèles structurés qui sont généralement complexes et requièrent une connaissance précise du fonctionnement des différentes structures de la cellule afin de prédire le processus de fermentation par *P. caribbica* d'une façon quantitative ;
- 4- La recherche d'autres applications biotechnologiques de la levure *P. caribbica*.

Résumé

L'exploration des échantillons du sol prélevés de palmeraie de la région de Tolga (Nord Ouest de la wilaya de Biskra-Algérie) a permis d'obtenir neuf isolats levuriens. Un des isolats (L₅) a été sélectionné pour sa capacité de produire de l'éthanol à partir d'inuline comme seule source de carbone. L'identification préliminaire de l'isolat (L₅) basée sur l'étude macroscopique, microscopique et biochimique, en utilisant la galerie API AUX 20, a révélé son appartenance au genre *Pichia*. L'étude moléculaire effectuée par analyse d'ADN *18S* et *ITS*, a montré qu'il s'agit de *Pichia caribbica*, enregistré sous le code d'accension ; KC977491.

La dégradation de l'inuline pour la production de l'éthanol par *P. caribbica* est effectuée en deux étapes à savoir: la saccharification de l'inuline en fructose et la fermentation de ce dernier en éthanol. Dans des conditions optimales de production d'éthanol, en l'occurrence, 40 g/L d'inuline, pH 5 et 37°C, *P. caribbica* a produit, en fioles, après 72 h de culture, 12.6 g/L d'éthanol, enregistrant un rendement de 0,31g d'éthanol/g d'inuline. En revanche, cette souche a la capacité de produire 14g/L d'éthanol en fermenteur de 20 litres, atteignant un rendement de 0,35g d'éthanol/g d'inuline.

Les résultats de la cinétique de sécrétion de l'inulinase (l'enzyme qui catalyse la dégradation de l'inuline) par *P. caribbica* ont révélé que cette souche est capable de produire des quantités importantes d'inulinase, atteignant 54.27 IU/mL en fiole, et 55.47 IU/ mL en fermenteur de 20 Litres, et ce, après 96 h de culture. La caractérisation partielle de l'enzyme a permis de constater que l'activité maximale de l'inulinase (108,72 IU/mL) est enregistrée à 55°C et à pH 3,4 et une meilleure thermostabilité à la même température (55°C) après une heure de réaction.

L'utilisation de l'artichaut comme seule source de carbone et de l'azote , pour la production de l'éthanol par *P. caribbica* a abouti à l'obtention d'une quantité considérable de l'éthanol dépassant les 14g/L, ce qui ouvre, désormais, la voie sur l'exploitation industrielle de ce produit agricole.

La revue bibliographique fouillée a révélé que *P. caribbica* n'a jamais été isolé à partir du sol des zones arides et son utilisation dans le domaine de biotechnologie, de l'agriculture et de l'agroalimentaire reste inconnue; ce travail est le premier a avoir exhibé ces potentialités biotechnologiques.

Des modèles mathématiques correspondant au processus biotechnologique de la fermentation ont été implémentés pour simuler le fonctionnement de fermentation. Les résultats de simulation permettent d'appréhender la dégradation du substrat, la croissance et la production de l'éthanol. Pour un choix approprié des paramètres du modèle, une bonne correspondance qualitative est notée pour le modèle des profils obtenus par notre simulation en comparaison aux résultats expérimentaux.

Mot clés : Ethanol, *Pichia caribbica*, Inuline, Inulinase, Fructose, Sol des régions arides.

Abstract

The exploration of soil samples taken from the palmary of Tolga region (North West province of Biskra, Algeria) allowed the obtaining of nine yeast strains. One of the isolates (L5) was selected for its ability to produce ethanol from inulin as a sole carbon source. Preliminary identification of the isolate (L5) based on macroscopic, microscopic and biochemical study, using the API gallery API AUX 20, revealed its membership to *Pichia* genus. The molecular identification using *18S*- DNA and *ITS* analysis showed that L5 is closely related to *Pichia caribbica*, registered under accession number; KC977491. The degradation of inulin to produce ethanol by *P. caribbica* is performed in two steps, namely: the saccharification of inulin to fructose and fermentation this later to ethanol. Under optimal conditions of ethanol production, i.e., 40 g /L of inulin, pH 5 and 37 ° C, *P. caribbica* produced in flasks conditions, after 72 h of culture, 12.6 g / L ethanol, recording a yield of 0.31 g ethanol / g of inulin. However, this strain has the ability to produce 14 g / L of ethanol in a 20 liter fermentor, reaching a yield of 0.35 g ethanol / g inulin. The results of inulinase secretion kinetics (the enzyme that catalyzes the degradation of inulin) by *P. caribbica* revealed that this strain is able of producing important quantities of inulinase, reaching 54.27 IU / mL in flasks and 55.47 IU / mL in 20 L fermentor, this after 96 h of culture. The partial characterization of this enzyme revealed that its maximum activity of (108.72 IU / mL) is stored at 55 ° C and pH 3.4 and greater thermostability at the same temperature (55 ° C) after one hour of reaction. The use of artichoke as a sole source of carbon and nitrogen for the production of ethanol by *P. caribbica* allowed the obtaining of a considerable quantity of ethanol exceeding 14g / L, which opens now, the way to the industrial exploitation of this agricultural product. Mathematical models corresponding to biotechnological fermentation process have been implemented to simulate the fermentation phenomenon. Simulation results allow the understanding of substrate degradation, the growth and ethanol production. For an appropriate choice of model parameters, a good qualitative correspondence is noted for the model profiles obtained by our simulation compared to experimental results.

Keywords : Ethanol, *Pichia caribbica*, Inuline, Inulinase, Fructose, arid region soils

الملخص :

أسفر فحص العينات المأخوذة من منطقة طولقة (ولاية بسكرة بالجنوب الغربي الجزائري) والتمثلة في التربة المجاورة لشجر النخيل على الحصول عن 09 عزلات خميرة من بينها عزلة واحدة تم إختيارها لقدرتها على إنتاج الإيثانول من الإينيلين كمصدر وحيد للكربون. أظهرت الملاحظة الماكروسكوبية، الميكروسكوبية والدراسة البيوكيميائية للعزلة إنتمائها إلى جنس الـ *Pichia*، أثبتت الدراسة الجزيئية عن طريق تحاليل الجينات *ADN-18S* و الـ *ITS* أن العزلة من نوع الـ *Pichia Caribbica* ذات الرقم التسلسلي *KC 977491* الممنوح من طرف *GenBank*.

تم هدم الإينيلين من طرف *Pichia Caribbica* لإنتاج الإيثانول بمرحلتين : تحول الإينيلين إلى فريكتوز (سكر سداسي) ثم تم تخمر هذا الأخير إلى الإيثانول.

في ظروف مزرعية مناسبة لإنتاج الإيثانول نخص بالذكر 40 غ/ل إينيلين ، pH 5 و T 37°C ، *Pichia Caribbica* أنتجت في قارورة ذات حجم 250 مل بعد 72 ساعة: 12,6 غ/ل إيثانول مع تسجيل مردود يقدر بـ : 0,31 غ إيثانول / غ إينيلين في حين هذه الخميرة لها القدرة على إنتاج 14 غ/ل من الإيثانول في مخمر ذو سعة 20 ل بمردود يقدر بـ : 0,35 غ إيثانول / غ إينيلين.

النتائج المتحصل عليها لحركية إنتاج إنزيم *inulinase* (الإنزيم المسؤول عن تحليل الإينيلين) بالـ : *Pichia Caribbica* بينت بأن هذه الخميرة لها القدرة على إنتاج كميات معتبرة من هذا الإنزيم تصل إلى 54,27 IU/mL ، 55,47 IU/mL في القارورة و المخمر على التوالي.

التعريف الجزيئي للإنزيم سمح بملاحظة نشاط عالي (108,72 IU/mL) في درجة حرارة 55°C و pH3.4 وثبات حراري عالي في نفس درجة الحرارة وبعد ساعة من التفاعل.

استعمال الخرشوف كمصدر وحيد للكربون و الأزوت لإنتاج الإيثانول بواسطة الـ : *Pichia Caribbica* أدى إلى إعطاء كمية معتبرة من هذا الأخير تفوق 14 غ/ل مما يفتح مجالا لإستغلال الصناعي لهذا المنتج الزراعي مستقبلا.

الدراسة المرجعية بينت أن *Pichia Caribbica* لم يتم عزلها بتاتا من تربة الأراضي القاحلة ، واستعمالها في المجال البيوتكنولوجي الزراعي والغذائي يبقى غير معروف مما جعل هذه الدراسة الأولى من نوعها التي تعرف قدراتها البيوتكنولوجية.

أدمجت معادلات رياضية من أجل التنبؤ بظاهرة التخمر والنتائج المحصل عليها لهذه العملية سمحت بإظهار تفكيك السكر و إنتاج الإيثانول و نمو الخميرة.

الإختيار الأنسب لبعض القيم الرياضية أظهرت وجود علاقة نوعية جيدة بين هذه الاخيرة مقارنة مع النتائج التطبيقية المتحصل عليها.

كلمات المفتاح :

الإيثانول ، *Pichia Caribbica* ، الإينيلين ، الإينيليناز ، الفريكتوز ، تربة أراضي قاحلة.

Références
Bibliographiques

- Akkinson, B. et Mavituna, F. (1991). *Upstream processing*. In: Biochemical engineering and biotechnology. Stockton, New York. pp: 525.
- Ahmad, F., Jameel, A.T., Kamarudin, M.H. et Maizirwan Mel. (2011). Study of growth kinetic and modeling of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Afr J Biotechnol*.16 (81): 18842-18846.
- Alexander, M.A. et Jeffries, T.W. (1990). Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in Yeast. *Enzyme Microbial technol*. 12: 2-18.
- Allen, N.H. et Ahearn, D.G. (1987). *Ecology of Aquatic In: Rose A.H., Harrison J.S. (edn), the yeast, V1, Biology of yeast. (2nd edn) Academic Press. London. p: 123- 174.*
- Anonyme, 1. (2006). Renouvelable énergie. Source :http://www.edf.com/html/ecole_energie/impressions/PDF_jeux/jeux/PDFimprimer/EDE_renouvelable.
- Anonyme, 2. (2012). Rapport mondial sur les énergies renouvelables. Source : http://ren21.net/Portals/0/documents/activities/gsr/KeyFindings_fra_02a.
- Anonyme, 3. (2003). Sahara. Géographie du Sahara. Source : <http://membre.de.lycos.fr/fgeo2.html>.
- Arand, M. *et al.* (2002). Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. *Biochem J*. 362: 131–135.
- Attar, A. (2013). Energie renouvelables et non renouvelables source: http://www.petrochem2000.com/data/docs/ressources/dossiers_articles/doc_54.pdf.
- Augustin, J. C. (1996). Resistance of *Listeria monocytogenes* to physical exposure *Pathol Biology*. 44-9: 790-807.
- Bååthe, E. et Söderström, B.E. (1980). Comparaisons of the agar-film and membrane filter methods for the estimation of the hyphal lengths in soil, with particular reference to the effect of magnification. *Soil Biol Biochem*. 12: 385-387.
- Bajpai, R. et margaritis, S. (1982). A Ethanol Inhibition Kinetics of *Kluyveromyces marxianus* Grown on Artichoke Juice. *Appl enviro Microbiol*. 1: 1325-1329.
- Barchmann, H.J., Besaïh, M., Brincat, L., Sergio, P. F. S. (2012). Le potentiel de la biomasse dans les pays méditerranéens. Source : http://www.paufm.org/assembly/Docs/recommendations/Rabat2012/ENERGY_FR.
- Barford, J.P. (1990). A general model for aerobic yeast growth: Batch Growth. *Biotechnol Bioenerg*. 35: 907-920.
- Barnett, J.A. (1976). The utilization of sugars by yeasts. *Advan Carb Chem Biochemistry*. 32:125-234.
- Beal, C., Deschamps, N., Juillard, V., Roissart, H., Richard, J. et Saraux, B. (1994). Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Lorica (Ed) Uriage*. 1: 367-401.

- Bedrani, S. (1995). Une stratégie pour le développement des parcours en zones arides et semi arides. Rapp. Techn. Algérie. Doc. Banque mondiales. Tann.
- Bento, A., Kanbur, R. et Leard, B. (2012). Super- Additionality: A Neglected Force in Markets for Carbon Offsets. Discussion Paper. CEPR.
- Beretta, E. et Takeuchi, Y. (1994). Global stability for *chemostat* equations with delayed nutrient recycling. *Nonlinear World. 1*: 191–206.
- Beretta, E., Bischi, G. et Solimano, F. (1990). Stability in *chemostat* equations with delayed nutrient recycling. *J Math Biol.* 28(1): 99–111.
- Bergkamp, R.J., Bootsman, T.C., Toschka, H.Y., Mooren, A.T., Kox, L., Verbakel, J.M., Geerse, R.H et Planta, R.J. (1993). Expression of an alpha-galactosidase gene under control of the homologous inulinase promoter in *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 40: 309–317.
- Bergter, F. et Knorre, W. A. (1972). Computer simulation van Wachstum und Produktbildung bei *Saccharomyces cerevisiae*. *Z Allg Mikrobiol.* 12:613–629.
- Bideaux, C. (2000). Modélisation stoechiométrique des productions microbiennes par descripteur métabolique au moyen du calcul formel. Validation sur le modèle *Kluyveromyces marxianus*. Thèse INSA Toulouse.
- Black, M. J., Whittaker, C., Hosseini, S. A., Diaz-Chavez, R., Woods, J. et Murphy, R. J. (2011). Life Cycle Assessment and sustainability methodologies for assessing industrial crops, processes and end products. *Indus Crops Products.* 34(2): 1332-1339.
- Blackwell, K., Singleton, J et Tobin, J. M. (1995). Metal cation uptake by yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43(4): 579-584.
- Blecker, C., Chevalier, J.P., Van Herck, J.C., Fougny, C., Deroanne, C. et Paquot, M. (2001). Inulin: Its physicochemical properties and technological functionality. *Recent Res. Devel. Agricultural Food Chem.* pp: 126-131.
- Bo Zhao, A., Limin, I., Wang, L., Fengsong, L., Dongliang, B, Cuiqing, M, Yanhe Maa, Ping, X. (2010). Kinetics of D-lactic acid production by *Sporolactobacillus sp.* strain CAS Dusing repeated batch fermentation. *Biores Technol.* 101: 6499–6505.
- Botton, B. (1991). La physiologie des levures Ds : Larpent J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 97-127.
- Botton, B., Breton, A., Fever, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. et Veau, P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle.* (2^{ème} éd.). Masson. Collection Biotechnologies. p : 34-381.
- Bouix, M. et Leveau, J.Y. (1991). Les levures Ds : Bourgeois C.M., Leveau J.Y., *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*, (2^{ème} éd.) Lavoisier-Tec &Doc, Paris. 3. p : 206-229.

- Bouzoura, M. et Toutain, G. (1970). Contribution à l'étude de la fertilité des sols en palmeraie marocaines et de la fertilisation des cultures, (edn) Associe. Alawania.
- Bryssin, I. et Toutain, G. (1970). *Etude des sols des palmeraie par la culture et le fumure*, (edn) Associe. Alawania.
- Buhot, D. (1973). Echantillonnage de sols .Conservation et préparation des échantillons. Problème statistique. *Ann Phytopathol.* 5 : 296- 298.
- Calvet, R. (2003). *Le sol : propriétés et fonctions*. (1^{ère}edn). Paris.
- Camacho-Ruiz, L., Perez-Guerra, N. et Roses, R.P. (2003). Factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture and in solid sate fermentation. *Electron J Environ Agric Food Chem.* 2(5):531–542.
- Camille, D. (2007). *Microbiology pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition Lavoisier. p 128-129.
- Caylak, B. et Vardar, S.F.(1996). Comparison of different production processes for bioethanol. *Turk J Chem.* 22:351–359.
- Cereghino, J.L. et Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews.* 24 (1): 45-66.
- Chi Z., Chi Z., Zhang T., Liu G. et Yue L. (2009). Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 82: 211-220.
- Chin-Hana, S. et Shang-Tian, Y. (1990). Kinetic and modelling of temperature effects on batch xanthan gum fermentation. *Biotechnol Bioeng.* 37: 567-574.
- Cho, Y.J. et Yun, J.W. (2002). Purification and characterization of endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. *Process Biochem.* 37: 1325–1331.
- Costa, A.C., Daniel, I.P., Maugeri, F. et Maciel, R. (2001). Factorial design and simulation for the optimisation and determination of control structures for an extractive alcoholic fermentation. *Process Biochem.* 37:125 - 137.
- Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem Journal* 23: 536-545.
- da Cruz, S.H., Batistote, M. et Ernandes, J.R. (2003). Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of the nitrogen source on yeast growth and fermentation. *J Inst Brew* .109 (4):349–355.
- Davet, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétales*, (1^{ère} edn) INRA. Paris.
- de Mot R. et Verachttert, H. (1985). Purification and characterization of the extracellular amyolytic enzymes for the yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Appl Microbiol* .50:1474–1482.
- Dechauffour, P. (1979). *Pédologie T1 et T2*, (edn) Masson. Paris. NI°. (B.U).
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conver Manage.* 49(8): 2106-2116.

- Dien, B.S., Cotta, M.A. et Jeffries, T.W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production current status. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63:258–266.
- Djebaili, S. *et al.* (1983). Carte de l'occupation des terres, carte pastorale de l'Algérie, notice. *Biocénoses.* 2:1-2. p132.
- Dombek, K. M. et Ingram, L. O. (1987). Ethanol Production during Batch Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: Changes in Glycolytic Enzymes and Internal. *Appl Microbiol:* (1) 286-1291.
- Drapcho, C.M, Nhuan, N.P. et Walker, T.H. (2008). Biofuels Engineering *Process Technol.* USA: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Ebertova, H. (1966). Amylolytic enzymes of *Endomycopsis capsularis*. II. A study of properties of isolated α -amylase, amyloglucosidase and maltose trans glucosidase. *Folia Microbiol.* 11:422–438.
- Ergun, M. et Mutlu, S.F. (2000). Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol*,73:251–255.
- Escobar, J. C., Lora E. S., Venturini, O. J., Yanez, E. E., Castillo, E. F. et Almazan, O. (2009). Biofuels: Environment, technology and food security. *Renew Sust Energy Reviews.* 13(6-7): 1275-1287.
- Esener, A., Roels, J.A. et Kossen, G.W.F. (1981). Fed-batch culture: modeling and application in the study of microbial energetics. *Biotechnol Bioenerg.* 27:1851-1871.
- Ettalibi, M. et Baratti J.C. (1987). Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 26 :13 20.
- Farhi, A. (2002) Biskra : de l'oasis à la ville saharienne (Note). In: Méditerranée, Tome 99, 3 4-. Le sahara, cette «autre Méditerranée» (Fernand Braudel). pp. 77-82. doi : 10.3406/ medit. 2002.3264.
- Feria-Gervasio, D., Mouret, J.R., Gorret, N., Goma, G. et Guillouet, S. (2008) .Oleic acid delays and modulates the transition from respiratory to fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to glucose excess. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78(2):319-331.
- Fiaux, J., Cakar, Z.P., Sonderegger, M., Wuthrich, K., Szyperski, T. et Sauer, U. (2003). Metabolic-Flux Profiling of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Eukaryotic Cell.* 2(1):170-180.
- Fiechter, A. et Seghezzi, W. (1992). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *J Biotechnol.* 27: 27-45.
- Fillon, M. (1996). Développement d'une méthodologie pour la modélisation et la simulation des réacteurs discontinu, application à la fermentation brassicole. PhD Thésis, Institut National Polytechnique de Toulouse (France).

- Fleet, G.H. et Heard, G.M. (1993). Yeast: growth during fermentation. In: Fleet GM :ed *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur Switzerland. pp: 27-54.
- Freedman, H., SO, J. et Waltman, P. (1989). Coexistence in a model of competition in the chemostat incorporating discrete delays. *SIAM Journal Appl Math.* 49(3):859–870.
- Fujita, Y., Ito, J., Ueda, M. et Fukuda, H. (2003). Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol.* 70: 1207–1212.
- Ge, X.Y. et Zhang, W.G. (2005). Shortcut to the Production of High Ethanol Concentration from Jerusalem Artichoke Tubers. *Food Technol Biotechnol.* 43 (3) 241–246.
- Gervais, P. et Sarrette, M. (1990). Influence of age of mycelia and water activity on aroma production by *Trichoderma viride*. *J Ferment Bioeng.* 69:46–50.
- Gervasio, F., Mouret, D., Gorret, J.R., Goma, N.G. et Guillouet, S. (2008). Oleic acid delays and modulates the transition from respiratory to fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to glucose excess. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78(2):319-331.
- Ghasem, N., Habibollah, Y., Ku, S. et Ku, I. (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol.* 92:251–260.
- Gong, C.S., Maun, C.M. et Tsao, G.T. (1981). Direct fermentation of cellulose to ethanol by a cellulolytic filamentous fungus *Monilia sp.* *Biotechnol Lett.* 3:77–82
- Guebel, D., cordenons, A., Nudel, C et Giulietti, A.M. (1989). Fermentation of D-xylose to ethanol by *Pichia stipitidis* NRRLy 7124. *International symp yeasts.* 5: 73- 77.
- Guimaraes, L.H.S., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L. et Jorge, J.A. (2007). Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources, *Enzyme Microbial Technol.* 42: 52-57.
- Guiraud, J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris. p : 310-321.
- Guiraud, J.P. et Rosec, J.P. (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. AFNOR. p: 228-235.
- Gupta, A.K., Gill, A., et Kaur, N. (1998). A HgCl₂ insensitive and thermally stable inulinase from *Aspergillus oryzae* *Phytochemistry.* 49: 55–58.
- Gupta, A.K., Kaur, M., Kaur, N. et Singh, R. (1992). A comparison of properties of inulinases of *Fusarium oxysporum* immobilized on various supports. *J Chem Technol Biotechnol.* 53: 293–296.
- Hanne, H. (2012). Les marchés de production et de consommation et les prix des biocarburants dans l'Union européenne et le monde. Source :

http://www.economie.gouv.fr/files/directions_services/dgccrf/documentation/dgccrf_eco/dgccrf_eco9.pdf.

Hsu, T. (1996). *Pretreatment of biomass*. In: Wyman C (ed) Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor et Francis, Washington DC. pp: 179–212.

Ingram, L.O., Gomez, P.F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B.E., Yomano, L.P. et York, S.W. (1998). Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol Bioeng.* 58 (2,3) :204–214.

Ito, K., Yoshida, K., Ishikawa, T et Kobayashi, S. (1990). Volatile compounds produced by fungus *Aspergillus oryzae* in rice koji and their changes during cultivation. *J Ferment Bioeng.* 70:169–172.

Jackson, J.V. et Edwards, V.H. (1975). Kinetics of substrate inhibition of exponential yeast growth. *Biotechnol Bioeng.* 17: 943–964.

Jang, S. (2000). Dynamics of variable-yield nutrient-phytoplankton-zooplankton models with nutrient recycling and self-shading. *J Math Biol.* 40(3): 229–250.

Jeffries, T.W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr Opin Biotechnol.* 17: 320-326.

Jiang, L. et MA. Z. (1998). Stability of a *chemostat* model for a single species with delayed nutrient recycling- case of weak kernel function Chinese. *Quart J Math.* 13(1): 64–69.

Jose, D. (1999). Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol.* 81: 35–52.

Kane, Y. (1966). Numerical solution of initial boundary value problems involving Maxwell's equations in isotropic media . *IEEE Transactions on Antennas and Propagation.* 14 (3): 302–307.

Kang, S.I. et Kim, S.I. (1999). Molecular cloning and sequence analysis of an endo-inulinase gene from *Arthrobacter sp.* S37. *Biotechnol Lett.* 21: 569–574.

Kang, S.I., Chang, Y.J., Oh S.J. et Kim S.I. (1998). Purification and properties of an endo inulinase from an *Arthrobacter sp.* *Biotech Lett.* 20 (10): 983-986.

Kappeli, O. (1986). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Advan. Microbial Physiol.* 28:181-209.

Kato, K., Araki, T., Kitamura, T., Morita, N., Mouri, M. et Suzuki, Y. (1999). Purification and properties of a thermostable inulinase (β -D-fructan fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. *Starch.* 51: 253–258.

Kattere, T. et Andoren, O. (2001). The ICBM of analytically solved models of soil carbon, nitrogen and microbial biomass. *Ecol Model.* 130: 199-207.

Kelly, C.T., Moriarty, M.E. et Fogarty, W.M. (1985). Thermostable extracellular α -amylase and α -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 22:352–358.

- Kim, H.S., Lee, D.W., Ryu, E.J., Uhm, T.B., Yang, M.S., Kim, J.B. et Chae, K.S.(1999). Expression of the *INU2* gene for an endoinulinase of *Aspergillus ficuum* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* 21: 621–623.
- Kim, M.K., Kim, Y.H., Kim, H.R., Kim, B.I., Byun, S.M. et Uhm, T.B . (1994). Thermal stability of an acidic inulinase from *Scytalidium acidophilum*. *Biotechnol Lett.* 16: 965–966.
- Kiran, S., Sikander, A et Lkram. H .(2003). Time course study for yeast invertase production by submerged fermentation. *J Biol Sci.* 3(11):984–988.
- Kochhar, A., Kaur, N. et Gupta, A.K. (1997). Inulinase from *Aspergillus versicolor*. A potent enzyme for producing fructose from inulin. *J Sci Ind Res.* 56: 721–726.
- Koga, N. (2008). An energy balance under a conventional crop rotation system in northern Japan: Perspectives on fuel ethanol production from sugar beet. *Agri Ecosy Environ.* 125(1 4): 101-110.
- Kreger -Van Rij, N.J. (1984).*The yeast, a Taxonomic Study*, Elsevier Biomedical.
- Kurtzman ,C.P., Fell, J.W. et Boekhout, T. (2011). *The yeast a taxonomic study* (5edn) Elsevier. London. pp: 622- 623.
- Kwon, H.J., Jeon, S.J., You, D.J., Kim, K.H., Jeong, Y.K., Kim, Y.H., Kim, Y.M. et Kim, B.W.(2003). Cloning and characterization of an exoinulinase from *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol Lett.* 25:155–159.
- Larpent, J.P. et Larpent-Gourgaud, M. (1997). *Mémento technique de microbiologie.* (3^{ème} edn) édition, Lavoisier-Tec Doc. Paris. p : 217-240.
- Larpent, J.P. (1991). *Biotechnologie des levures.* Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p: 97-127.
- Larpent, J.P. et Larpent-Gourgaud, M. (1997). *Mémento technique de microbiologie.* (3^e éd), Lavoisier-Tec et Doc, Paris. 8. p: 217-240.
- LeBerre, M. et Ramousse, R. (2001). *Les enjeux de la conservation de la biodiversité en milieu saharien*, (edn) Université Claud Bernard. Lion 1.
- LeCleche, B. (2000). *Agronomie des bases au nouvelle orientation*, (edn) ENITA de Bordeaux.
- Leclerc, H., Meyer, A. et Deiana, J. (1995). *Cours de microbiologie générale. Nouveau programme.* Biosciences et Techniques. doin éditeur, Paris. p : 73-92.
- Lee, J.M., Pollard, J.F. et Coulman, G.A. (1983). Ethanol fermentation with cell recycling: Computer simulation. *Biotechnol Bioeng.* 25: 497-511.
- Lei, F., Rotboll, M. et Jorgensen, S.B. (2001). A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol.* 88: 205- 221.

- Leticia, P., Miguel, C., Humberto, G. et Jaime, A.J. (1997). Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnol Lett.* 19(1):45–47.
- Levespiel, O. (1980). The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnol Bioeng.* 22:1671–1687.
- Lim, S.H.A.D., Ryu, J.M.B., Lee, H., Jeon, J.H., Sok, D.E. et Choi, E.S. (2011). Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis. *Bioresour Technol.* 102: 2109–2111.
- Lin, Y. et Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 69: 627–642.
- Lodder, L. (1971). *The yeasts, a taxonomie study.* North Holland Publishing Company, Amsterdam- London.
- Loegering, K., Christian, M., Jan-Patrick, V., Claudia, W., Daniel, Z., Hans-Peter, B., Ulrich, S. et Reiner, L. (2011). An integrated scale-down plant for optimal recombinant enzyme production by *Pichia pastoris*. *Biotechnol J.* 6 (4): 428-436.
- Looten, P., Blanchet, P.D. et Vandecasteele, J.P. (1987). The β -fructofuranosidase activities of a strain of *Clostridium acetobutylicum* grown on inulin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 25: 419–425.
- Lu, Z. (2004). Global stability for a *chemostat*-type model with delayed nutrient recycling, Discrete and Continuous Dynamical Systems. *Series.4(3):663–670.*
- Luedeking, R. et Piret, E. L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. *J Biochemical Microbiol Technol Engin.* 1: 393-412.
- Madigan, M.T., Matinko, J.M. et Parker, J. (1997). *Brok biology of microorganisms*, (8^{ème} edn). USA.
- Margat, G. (1985). *Hydrologie et ressource en eau des zones arides.* (8^{ème} edn), Bull.soc.Geol. France.
- Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, C.F., Hahn-Hagerdal, B. et Jonsson, L.F. (2002). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.* 31: 274–282.
- Matthew, H., Ashley, O., Brian, K., Alisa, E. et Benjamin, J.S. (2005). Wine making 101. Available at <http://www.arches.uga.edu/matthaas/strains.htm>.
- Maung, M. (1987). Contribution à l'étude de dégradation des pristinaamycines en cours de culture de *Streptomyces pristinaespiralis* et des procédures minimisant ce processus. *Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées.* Toulouse, France.
- Melvydas, V., Gedminiene, G., Jarmalaite, I., Capukoitiene, B. et Nemceva, L. (2006). Initial analysis of highly competitive yeast strains promising for ethanol industry. *Biol.* 3: 63-66.
- Michael, M. et John M. (2006). *Broch Biology of Microorganisms*, (11th edn). Prentice Hall

- Mihail, J.D. et Alcoren, S.M. (1987). *Marcophomina phaseolma* spatial patterns in cultivated and sampling strategies. *Phytopath.* 77: 1126-1131.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal Chem.* 31: 426–8.
- Miyamoto, K. (1997). Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e00.htm>.
- Mogg, R. (2004). Biofuels in Asia: Thailand relauches gasohol for automotive use. *Refocus.* 5(3): 44-47.
- Mohamed, M. et Hind M. (1998). Etudes des pluies annuelles et journalières dans les Sahara algérienne. *Cahier Sécheresse.* 9(3): 193-199.
- Monod, J. (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann & Cie, Paris, France.
- Mons, L. (2005). Les enjeux de l'énergie. Larousse, France.
- Moriyama, S., Akimoto, H.N., Suetsugu, S., Kawasaki, T., Nakamura, T. et Ohta, K. (2002). Purification and properties of an extracellular exoinulinase from *Penicillium sp.* strain TN-88 and sequence analysis of the encoding gene. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66: 1887–1896.
- Moser, F.A. (1983). Formal macro-approach to bioprocess modeling with analogies. *Acta Biotechnol.* 3:195–216.
- Mukherjee, K. et Sengupta, S. (1987). Purification and properties of a non-specific fructofuranosidase (inulinase) from the mushroom *Panaeolus papillonaceus* *Can J Microbiol.* 33: 520–524.
- Mulchandani, A. et Luong, J.H.T. (1989). Microbial inhibition kinetics revisited. *Enzy Microb. Technol.* 11: 175-176.
- Muzzolini, A. (2000). *The origin and development of Africa livestock*. Archaeology Ggenetics linguistics and Ethnography U.C.L.P. (edn) Blench R.M & Macdonalds K.C Press. London.
- Nagem, R.A.P., Rojas, A.L., Golubev, A.M., Korneeva, O.S., Enyaskaya, E.V., Kulminskaya, A.A., Neustroev, K.N. et Polikarpov, I. (2004). Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *J Mol Biol.* 344: 471-480.
- Nakamura, T., Ogata, Y., Hamada, S. et Ohta, K. (1996). Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng.* 81:564-566.
- Navarro, A.R., Sepulveda, M.C. et Rubio., M.C. (2000). Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar canemolasses. *Waste Manag.* 20:581–585.

- Neagu, C.B. et Bahrim, G. (2012). Comparative study of different methods of hydrolysis and fermentation for bioethanol obtaining from inulin and inulin rich feedstock. *Food Industry*. 13: 63 – 68.
- Neilsen, J. et Villadsen, J. (1994). *Bioreaction Engineering Principales*. New York : Plenum Press.
- Ohta, K., Akimoto, H., Matsuda, S., Toshimitsu, D. et Nakamura, T. (1998). Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes from *Aspergillus niger*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 62:1731–1738.
- Ohta, K., Beall, D.S., Mejia, J.P., Shanmugam, K.T. et Ingram, L.O., (1991). Genetic-improvement of Escherichia-Coli for ethanol-production chromosomal integration of Zymomonas-Mobilis genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase-Ii. *Appl Environ Microbiol*. 57 : 893–900.
- Ohta, K., Hamada, S. et Nakamura, T. (1993). Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Envtl Microbiol*. 59: (3)729-733.
- Ongen-Baysal, G. et Sukan, S.S. (1996). Production of inulinase by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett*. 18: 1431–1434.
- Onodera, S., Murakami, T., Ito, H., Mori, H., Matsui, H., Honma, M., Chiba, S. et Shiomi, N. (1996). Molecular cloning and nucleotide sequences of c DNA and gene encoding endo inulinase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 60: 1780–1785.
- Orthen, B. et Wehrmeyer, A. (2004). Dynamics of non-structural carbohydrates in bulbs and shoots of the geophytes. *Galanthus nivalis Physiol Plant*. 120 (4): 529-536.
- Oura, E. (1997). Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochem*. 12: 19-21.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N. et Jose, D. (1999). Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol*. 81: 35–52.
- Parekh, S.R. et Margaritis, A. (1986). Continuous hydrolysis of fructans in Jerusalem artichoke extracts using immobilized non-viable cells of *Kluyveromyces marxianus*. *J Food Sci*. 51: 854–855.
- Pastore, G.M., Park, Y.K., Min, D.B. (1994). Production of a fruity aroma by *Neurospora* from beiju. *Mycol Res*. 98: 25–35.
- Peringer, P., Blachere, H., Corrieu, G. et Lane, A.G. (1974). A generalized mathematical model for the growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* with experimental determination of parameters. *Biotechnol Bioeng*. 16:431–454.
- Peuk, A.D. (2000). The chemical composition of xylem sapin *Vitis vinifera* L.cv. Riesling during vegetative growth on three different francian vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer. *Am Enol Viticult*. 51: 329-339.

- Phaff, H.J. et Starmer, W.T. (1987). *Yeast associated with Plants, Insects and Soil In* : Rose A.H., Harrison J.S. (ed), The yeast, V1, Biology of yeast. (2ndedn) Acad Press. London. p: 123- 174.
- Piret, S. J. (1988). Reflection on the dynamics of growth and product formation in microbial cultures. Dans: *Horiz Bioch Eng.* (3): 155- 160.
- Postma E., Verduyn C., Scheffers A. et Van Dijken J. (1989). Enzymic analysis of Crabtree effect in glucose- limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Env Microbiol.* 55 : 468-477.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., Claire, M ., Bacq, C. et Dusart, J. (2007). *Microbiologie .* (Edn). De Boeck p: 492.
- Rey, M.W. *et al.* (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus species*. *Genome Biol.* 5: 77. 84
- Ritsema, T. et Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol.* 6: 223-230.
- Robyns, B. et Bastard, P. (2004). Production décentralisée d'électricité : contexte et enjeux techniques. Source : [http://www. Electricité](http://www.Electricité) revue 3 EI n°39.
- Rodriguez-Zaragoza, S., Mayslish, E. et Steinberger, Y. (2005). Vertical Distribution the free living Amoeba Population in soil under desert Shrubs in the Ngev. *Appl Environ Microbiol.* 71(4): 2053-2060.
- Rosenberger, A., Kaul, H. P., Senn, T. et Aufhammer, W. (2000). Improving the energy balance of bioethanol production from winter cereals: The effect of crop production intensity. *Appl Energy* .68 (1): 51-67.
- Roukas, T. (1996). Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. *J Eng* .27:87–96.
- Ruan, S. (1993). Persistence and coexistence in zooplankton-phytoplankton-nutrient models with instantaneous nutrient recycling. *J Math Biol.* 31(6): 633–654.
- Ruan, S. et HE, X. (1998). Global stability in chemostat-type competition models with nutrient recycling. *J Appl Math.* 58: 170–192.
- Ruark, G.H. et Zarnoch, S.J. (1992). Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. *Soil Sc Soc Am J.* 56:1945-1950.
- Saadoun, I. et Momani, I. (1997). *Stryptoyses* from Jordan soil active against *Agrobacterium tumefaciens*. *Actinomycetes.* 8(12): 29-36.
- Saddler, J.N. et Chan, M.K.H. (1982). Optimization of *Clostridium thermocellum* growth on cellulose and pretreated wood substrates. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 16:99–104.
- Sanchez, O.J. et Cardona, C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol.* 99: 5270–5295.

- Sanchez, S., Bravo, V., Castro, E., Moya, A.J et Camacho, F. (1999). Comparative study of the fermentation of D-glucose/D-xylose mixtures with *Pachysolen tannophilus* and *Candida shehatae*. *Bioprocess Eng.* 21: 525–532.
- Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M.C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. et Arigoni, D. F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 14422–14427.
- Schnürer, J., Clarholm, M. et Rosswall, T. (1985). Microbial biomass and activity in a agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biol Biochem.* 17: 611- 618.
- Schugerl, K. (1985). Bioreaction engineering 1: Fundamentals, thermodynamics, formal kinetics, idealized reactor types and operation modes. John Wiles and Sons.
- Sébastien, N., Ronkart, A., Christophe, S. et Micher, P. (2007). Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta.* 604:81–87.
- Shafaghat, H., Najafpour, G.D, Rezaei, P.S. et Sharifzadeh, M. (2009). Growth Kinetics and Ethanol Productivity of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 24860 on Various Carbon Sources. *World Appl Sci J.* 7(2): 140-144.
- Sharma A.D., Kainth, S. et Gill P.K. (2006). Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces sp.* *J Food Engin.*77: 486-491.
- Sharma, S.K. (2000). Saccharification and bioethanol production from sunflower stalks and hulls. *Afr J bioetech* (41): 122- 130.
- Sheng, J., Chi, Z., Yan, K., Wang, X., Gong, F. et Li, J. (2009). Use of response surface methodology for optimization of process parameters for high inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a in solid state fermentation and hydrolysis of inulin. *Bioprocess Biosyst Eng.* 32: 333–339.
- Shiomi, N. (1989). Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in Liliaceous plants. *J Plant Physiol.* 134: 151-155.
- Shiomi, N., Benkeblia, N., Onodera, S. et Kawazoe, N. (2006). Fructooligosaccharides changes during maturation in inflorescences and seeds of onion (*Allium cepa* L W202). *Can J Plant Sci.* 86: 269-278.
- Silla, A.M., Zygora, P.S.J. et Stewart, G.G. (1984). Characterization of Sch. Castellii mutants with increased productivity of amylase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 20:124–128.
- Simoes-Mendes, B. (1984). Purification and characterization of the extracellular amylase of the yeast Sch. Alluvius. *Can J Microbiol.* 30:1163–1170.
- Singh, R.S. et Singh, R.P. (2010). Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential. *Food Technol Biotechnol.* 48 (4): 435–450.
- Singh, R.S., Dhaliwal, R. et Puri, M. (2006). Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. *Proc Biochem.* 41:1703–1707.

- Singleton, P. (2005). *Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies*, cours, (6^e éd), Dunod.
- Smith, C.K., Coyea, M.R. et Munson, A.D. (2000). Soil carbon, nitrogen and phosphorus stocks and dynamics under disturbed black spruce forest. *Ecol App.* 10:75-78.
- Sonnleitner, B. et Kappeli, O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol Bioeng.* 28: 927-927.
- Soto-Cruz, O., Favela-Torres, E. et Saucedo-Castaneda, G. (2002). Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnol Prog.* 18: 193-200.
- Spencer- Martins, I. et Van Uden, N. (1979). Extracellular amylolytic system of the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 6:241–250.
- Stepanov, A.I., Afanaseva, V.P., Zaitseva, G.V., Mednokova, A.P et Lupandina, I.B. (1975) Regulation of the biosynthesis of the enzyme of amylolytic acomplex of *Endomycopsis fibuligera*. *Prikl Biohim Mikrobiol.* 11:682–685.
- Subler, S. et Kirsh, K.S. (1998). Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthwarm middens in no-tillcornfield. *Bio Fert Soils.* 26:243-249.
- Sugawara, E., Hashimoto, S., Sakurai, Y. et Kobayashi, A. (1994). Formation by yeast of the HEMF (4-hydrpxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone) aroma components in Miso with aging. *Biosci Biotechnol Biochem.* 58:1134–1135
- Sun, Y. et Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* 83(1):1–11.
- Suzuki, T., Mori, H., Yamane, T et Shimizu, S. (1985). Automatic supplementation of minerals in fed-batch culture to high cell mass concentration. *Biotechnol Bioeng.* 27: 192-201.
- Teng, Z., Gao, R., Rehim, M. et Wang, K. (2009). Global behaviors of Monod type chemostat model with nutrient recycling and impulsive input. *J Mathel Chemist press.* 3: 123-147.
- Todor, D. et Tsonka, U.D. (2002). Influence of the growth conditions on the resistance of *Saccharomyces cerevisiae*, strain NBIMCC 181, by freeze–drying. *J Cult Collect.* 3:72–77.
- Toivola, A., Yarrow, D., Bosch, E., Dijken, J et Scheffers, A. (1984). Alcoholic fermentation of D- xylose by yeasts. *Appl Envirol Microbiol.* 47(6):1221-1223.
- Tortora, J., Funk, B.F. et Case, C.I. (2003). *Introduction à la microbiologie*, édition de renouveau Pédagogique Inc. Canada.
- Tsujimoto, Y., Watanabe, A., Nakano, K., Watanabe, K., Matsui, H., Tsuji, K., Tsukihara, T et Suzuki, Y. (2003). Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-

- inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289. *App Microbiol Biotechnol.* 62: 180–185.
- Uhm, T.B., Chung, M.S., Lee, S.H., Gourronc, F., Housen, I., Kim, J.H., Van Beeumen, J., Haye B. et Vandenhaute, J. (1999). Purification and characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63:146–151.
- UI-Haq, I., Roheena, A., Ashraf, H. et Shah, A.H. (2002). Isolation and screening of fungus for the biosynthesis of α - amylase. *Biotechnol.* 2 (4): 61- 66.
- Uzunova, K., Vassileva, A., Ivanova, V., Spasova, D. et Tonkova, A. (2002). Thermostable exo-inulinase production by semicontinuous cultivation of membrane-immobilized *Bacillus sp.11* cells. *Process Biochem.* 37: 863–868.
- Vallet, C., Said, R., Rabiller, C et Martin, M.L. (1996). Natural abundance isotopic fractionation in the fermentation reaction: influence of the nature of the yeast. *Bioorg Chem.* 24:319–330.
- Van Laere, A. et Van den Ende, W. (2002). Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant Cell Environ.* 25:803-813.
- Van Urk, H., Schipper, D., Breedveld, G.J., Mak, P.R., Alexander, S.W. et Van Dijken, J.P. (1989). Localization and kinetics of pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *Bioch Biophys Acta (BBA) - General Subjects.* 992 (1):78-86.
- Vandamme, E. J. et Derycke, D. G. (1983). Microbial inulinases - Fermentation process, properties, and applications. *Advan Appl Microbiol.* 29: 139-176.
- Vaughan-Martini, A., Kurtzman, C.P., Meyer Sally, A.N. et O'Neill, B.E. (2005). Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. *Yeast Res.* 5: 463–469.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A. et Van Dijken, J. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast.* 8(7):501-517.
- Virginie, A.G, Bruno, B., Sylvie, D. et Jean-Marie, S. (2001). Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* 23:677–681.
- Vullo, D.L., Coto, C.E. et Siñeriz, F. (1991). Characterization of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell) Rusby. *Appl Environ Microbiol.* 57: 2392–2394.
- Walker, J.F., Jenkins, N. (1997). "Wind energy technology". John Wiley et Sons, Inc
- Waterhouse, A.L et Chatterton, N.J. (1993). Glossary in fructan terms. In: *Science and technology of fructans*, Suzuki M, Chatterton NJ ed: Boca Raton, FL: CRC Press USA. pp: 1 6.

- Westra, M.T. et Kuyvenhoven, S. (2002). L'énergie fait tourner le monde. Source : https://www.efda.org/wpcms/wp-content/uploads/2011/11/EPYW_fr.pdf.
- Wickerham, L.J. (1951). Taxonomy of yeast. Technical Bulletin No. 1029, United States. Departement of Agriculture, Washington, D.C.
- Wilson, R.G., Martin, A.R et Kachman, S.D. (2006). Seasonal changes in carbohydrates in the root of Canada thistle (*Cirsium arvense*) and the disruption of these changes by herbicides. *Weed technol.* 20: 242-248.
- Workman, W.E et Day, D.F. (1983). Purification and properties of the β -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *FEBS Lett.* 160: 16–20.
- Xiao, R.M. et Tanida, S. (1989). Purification and characteristics of two exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*. *J Ferment Bioeng.* 67: 331–334.
- Yamauchi, H., Akita, O., Obata, T., Amachi, T., Hara, S et Yoshizawa, K. (1989). Production and application of a fruity odor in a solidstate culture of *Neurospora sp.* using pregelatinized polish rice. *Agric Biol Chem.* 53:2881–2888.
- Yu, Z.S et Zhang, H.X. (2004). Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol.* 93:199–204.
- Yuan, S., Zhang, W et Han, M. (2009). Global asymptotic behavior in chemostat-type competition models with delay Nonlinear Analysis. *Real World Applications* 10(3): 1305–1320.
- Yuan, W.J., Zhao, X.Q., Ge, X.M. et Bai, F.W. (2008). Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *J Appl Microbiol.* 105: 2076-2083.
- Yun, J.W., Kim, D.H., Kim, B.W et Song, S.K. (1997). Production of inulo-oligosaccharides from inulin by immobilized endoinulinase from *Pseudomonas sp.* *J Ferment. Bioeng.* 84: 369– 371.
- Zhang, L., Wang, J., Ohta, Y. et Wang, Y. (2003). Expression of the inulinase gene from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Proc Biochem.* 38:1209–1212.
- Zhang, T., Chi, Z., Zhao, C.H., Chi, Z.M. et Gong, F. (2010). Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces sp.* W0, *Bioresour Technol.* 101: 8166–8170.

Annexe

Annexe 1

1- Milieux de cultures

1.1- Sabouraud

La composition chimique de ce milieu en g/L d'eau distillée est :

Glucose20g
Peptone10g
Agar.....15- 20 g
Eau distillée1000mL

Le pH est de 6.4. Le pH acide du milieu favorise la croissance des levures et des moisissures (Guiraud et Rosec, 2004).

1.2- YPG (Yeast-extract-Peptone-Glucose-Agar)

Extrait de levure.....10g/L
Glucose20g
Peptone10g
Agar.....15- 20 g

Le pH du milieu est ajusté à 5 (Guiraud, 1998)

1.3- PDA (Potato Dextrose Agar)

Extrait de pomme de terre
Glucose 20g
Agar 20g

Préparation du milieu

L'agar et le Glucose sont dissous à chaud dans l'extrait puis le volume est complété à un litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 5.

1.4- MA (Malt Agar)

Extrait de Malt30g
Peptone5g

Glucose15g
Agar15- 20 g
Eau distillée..... 1000mL
Le pH est ajusté à 5 (Guiraud, 1998)

1.5- Milieu à base d'inuline

Inuline.....40g,
Extrait de levure.....4g
Peptone.....4g
Eau distillée.....1litre.

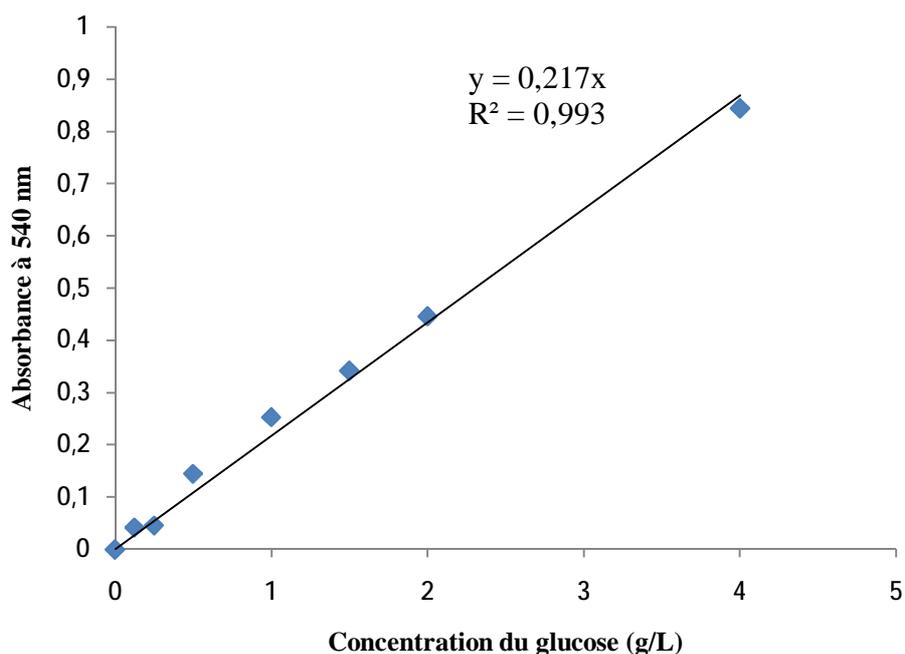
Annexe 2

2- Les courbes d'étalonnages

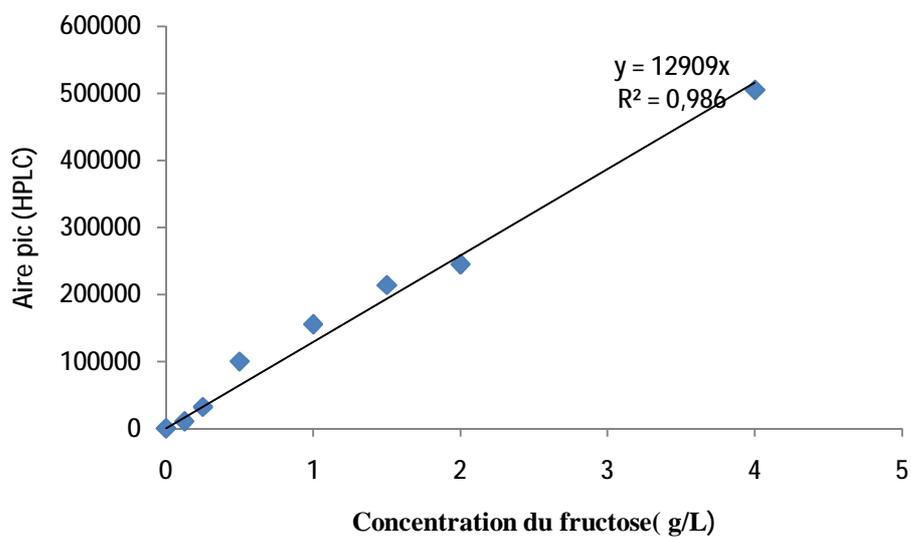
2.1- Courbe étalon du Fructose pour l'activité inulinase

Pour l'établissement de la droite d'étalonnage, les 0,5mL d'échantillon sont remplacés par 0,5 mL de solution fructose à différentes concentrations (0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 g/l). L'absorbance de ces concentrations est mesurée à 550nm avec le spectrophotomètre, la relation linéaire entre l'absorbance et la quantité de sucres des solutions étalons permet d'établir une relation mathématique liant ces deux valeurs.

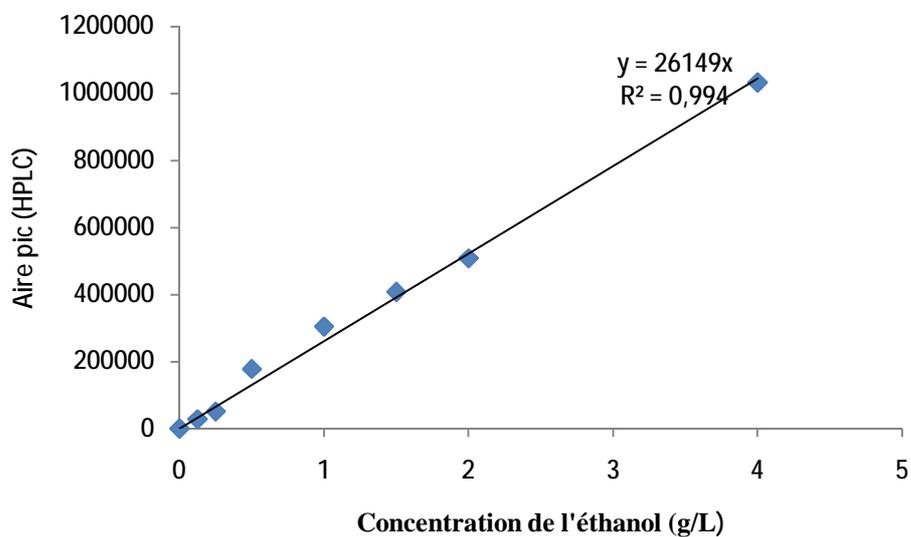
Cette méthode permet de déterminer la concentration en sucre réducteur présente dans les échantillons.



2.2- Courbe étalon du fructose pour le dosage HPLC



2.3- Courbe étalon de l'éthanol pour le dosage HPLC



Annexe 3

3- Réactif

3.1- Préparation de l'acide dinitrosalicylic (DNS)

Dissoudre 1g d'acide dinitrosalicylic à 60°C dans 20mL de NaOH 2N et 50 mL d'eau distillée, après la solubilisation complète du DNS on ajoute 30g de tartrate double sodium potassium. Le volume final est ramené à 100mL par de l'eau distillée, la solution est conservée à l'abri de la lumière.

3.2- Les solutions tampons

1- Tampon acétate de sodium (0,05M, pH= 5)

Solution A

Introduire 4,10 g d'acétate de sodium dans 1 litre de l'eau distillée

Solution B

Introduire 2,8 ml d'acétique acide dans 1litre de l'eau distillée

Préparation de Tampon acétate de sodium

Mélanger 39,2% de solution A avec 60,8 de solution B. Le pH obtenu est égale 5, la conservation de la solution est faite à 4°C

2- Tampon citrate (0,05M, pH 5)

Préparer 10g/L d'acide citrique ($C_6H_8O_7$, H_2O) 0,05M et 14,71 g/L citrate de sodium dans l'eau distillée. Le pH du mélange obtenu est égale 5.

Nom et Prénom : KARA ALI Mounira

Thème : Isolement et caractérisation de souches levuriennes des milieux arides productrices de l'éthanol sur différents substrats

Résumé :

L'exploration des échantillons du sol prélevés de palmeraie de la région de Tolga (Nord Ouest de la wilaya de Biskra-Algérie) a permis d'obtenir neuf isolats levuriens. Un des isolats (L₅) a été sélectionné pour sa capacité de produire de l'éthanol à partir d'inuline comme seule source de carbone. L'identification préliminaire de l'isolat (L₅) basée sur l'étude macroscopique, microscopique et biochimique, en utilisant la galerie API AUX 20, a révélé son appartenance au genre *Pichia*. L'étude moléculaire effectuée par analyse d'ADN *18S* et *ITS*, a montré qu'il s'agit de *Pichia caribbica*, enregistré sous le code d'accension ; KC977491.

La dégradation de l'inuline pour la production de l'éthanol par *P. caribbica* est effectuée en deux étapes à savoir: la saccharification de l'inuline en fructose et la fermentation de ce dernier en éthanol. Dans des conditions optimales de production d'éthanol, en l'occurrence, 40 g/L d'inuline, pH 5 et 37°C, *P. caribbica* a produit, en fioles, après 72 h de culture, 12.6 g/L d'éthanol, enregistrant un rendement de 0,31g d'éthanol/g d'inuline. En revanche, cette souche a la capacité de produire 14g/L d'éthanol en fermenteur de 20 litres, atteignant un rendement de 0,35g d'éthanol/g d'inuline.

Les résultats de la cinétique de sécrétion de l'inulinase (l'enzyme qui catalyse la dégradation de l'inuline) par *P. caribbica* ont révélé que cette souche est capable de produire des quantités importantes d'inulinase, atteignant 54.27 IU/mL en fiole, et 55.47 IU/ mL en fermenteur de 20 Litres, et ce, après 96 h de culture. La caractérisation partielle de l'enzyme a permis de constater que l'activité maximale de l'inulinase (108,72 IU/mL) est enregistrée à 55°C et à pH 3,4 et une meilleure thermostabilité à la même température (55°C) après une heure de réaction.

L'utilisation de l'artichaut comme seule source de carbone et de l'azote, pour la production de l'éthanol par *P. caribbica* a abouti à l'obtention d'une quantité considérable de l'éthanol dépassant les 14g/L, ce qui ouvre, désormais, la voie sur l'exploitation industrielle de ce produit agricole.

La revue bibliographique fouillée a révélé que *P. caribbica* n'a jamais été isolé à partir du sol des zones arides et son utilisation dans le domaine de biotechnologie, de l'agriculture et de l'agroalimentaire reste inconnue; ce travail est le premier à avoir exhibé ces potentialités biotechnologiques.

Des modèles mathématiques correspondant au processus biotechnologique de la fermentation ont été implémentés pour simuler le fonctionnement de fermentation. Les résultats de simulation permettent d'appréhender la dégradation du substrat, la croissance et la production de l'éthanol. Pour un choix approprié des paramètres du modèle, une bonne correspondance qualitative est notée pour le modèle des profils obtenus par notre simulation en comparaison aux résultats expérimentaux.

Mot clés : Ethanol, *Pichia caribbica*, Inuline, Inulinase, Fructose, Sol des régions arides.

Laboratoire de Recherche : Laboratoire de de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM)

Président de jury: Mr. BOULAHROUF A.
Directeur de thèse : Mr. KACEM CHAOUCHE N.
Examineurs: Mr. THONART P.
Mr. LAROUS L.
Mr. HAMIDECHI M.A.
Mr. DEHIMAT L.

Prof. Univ. Constantine 1.
Prof. Univ. Constantine 1.
Prof. Univ. Liège -Belgique-
Prof. Univ. Sétif.
Prof. Univ. Constantine 1.
Prof. Univ. Constantine 1