

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 au 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.