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).

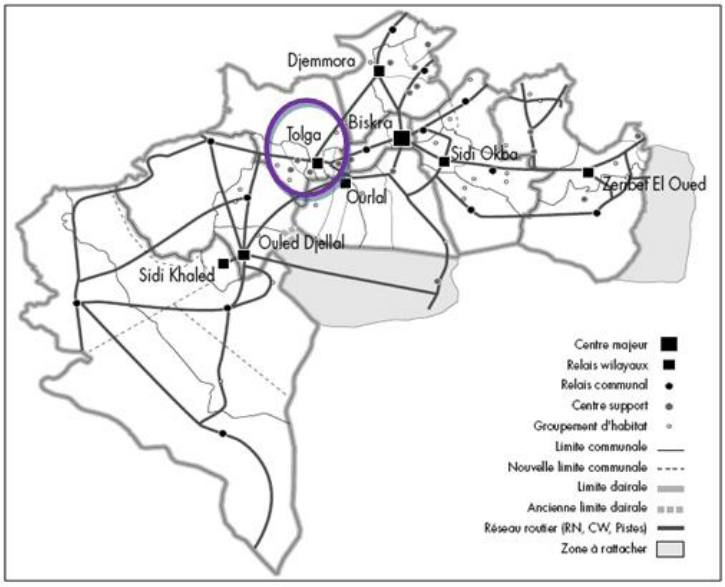

Figure 13 Localisation géographique de la région d'échantillonnage (**TOLGA**) (Farhi, 2002).

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 DEGLET NOUR (Sol humide)**	**25 20 10**
		Sol de Palmeraie des DATTES GHERS (Sol humide)	**25 20 10**
		Sol de Palmeraie de DAGLA BAYDA (Sol humide)	**25 20 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 nécessitent 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 en suite, 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 boites 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 boites 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 boites 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 boites de Pétri. L'incubation de toutes les boites 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 testées 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 sont ensemencés 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 nue 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 passants 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 boite de Pétri. Quand le milieu est solidifié, la levure à examiner est ensemencée en une strie longitudinale. La lame est incubée dans la boite 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 (10^7cellules/ 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-αD-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 µL d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA 50mM). Après, 7,5µl de l'enzyme lytique (lyticase) sont rajoutés et le mélange obtenu, est incubé à 37°C pendant 30 à 60 minutes. De plus, 300µL de «nuclei lysis solution» sont rajoutés et mélangés par pipetage. Les protéines sont éliminées par précipitation en rajoutant 100 µL 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 300µL 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 µL 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 µL 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'-GATCCTTCCGCAGGTTCACC-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 pendant10 min, puis 32 cycles de «94°C pendant1 min, 53°C pendant1 min, 72°C pendant 2 min» et enfin 72°C pendant10 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 pendant10 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 (L_5) 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 (10^7 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 5jours 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 ensemencer 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 fermenteurr 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 (DO_2 100%). 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* (NaN_3, 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'inulinase. 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:

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

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 :

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

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

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

3. 8.1.2- Formation du produit

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

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

$$\frac{dS}{dt} = \gamma S = -\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP}{dt} - m_S X \ldots . (10)$$ 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 domaine), 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).

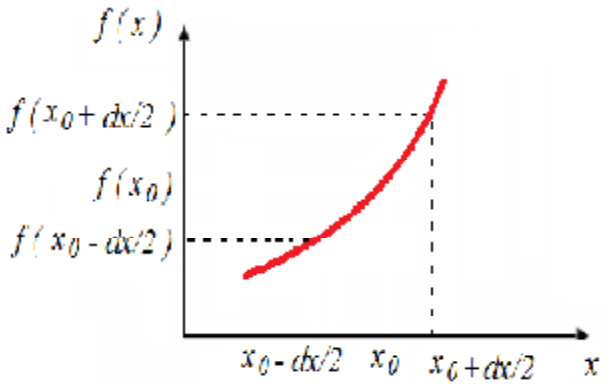

Figure 15 Evaluation d'une dérivée (Kane, 1966).