



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie fongique

Intitulé :

Etude de la production de la biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu optimisé à base de l'extrait de dattes déclassées

Présenté et soutenu par : *LEKIKOT Zeineb*

Le : 26/06/2016

MALKI Roumaissa

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Mr. KACEM-CHAOUCH. N* (Grade - UFM Constantine).

Rapporteur : *Mlle. KARA-ALI. M* (Grade - UFM Constantine).

Examineurs : *Mme. MIHOUBI. I* (Grade - UFM Constantine).

***Année universitaire
2015 - 2016***

Remerciement

*Nous remercions en premier lieu **Allah** le tout puissant pour tout la volonté et le courage qui nous a donné pour l'achèvement de ce travail*

*Nous tenons à remercier vivement notre promoteur **Mlle. KARA ALI M.**, pour avoir accepté d'encadrer et diriger ce travail, et pour nous avoir permis de bénéficier de ses conseils tout au long de la réalisation de ce travail.*

Nous remercions également :

***Mr. KACEM CHAOUCHE N.**, pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider notre jury de soutenance.*

***Mme. MIHOUBI I.**, pour nous avoir honoré et accepté d'examiner notre modeste travail.*

Enfin, nous remercions nos amies Baraa, Hadjer, Maroua, Soundous, Amira, Zineb qui nous ont soutenus pensant aux moments sympathiques qu'on a passés ensemble.

*À Nos famille pour leur encouragement et leur compréhension, un merci spécial aux mamans pour leur intarissable amour, sans vous nous ne serons jamais arrivées, ce diplôme est un peu le tien aussi **CHERE MAMAN.***

Sans oublier de remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

Roumaïssa et Zeineb.

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide de dieu tout puissant

*A celui qui m'a toujours encouragé soutenu durant toutes mes années d'études. Merci
pour ton amour et ta confiance totale... A toi très cher papa.*

*Celle qui m'a tant bercé, tant donné et tant enseigné, toi qui m'a guidé dans le droit
chemin, toi qui m'a appris que rien n'est impossible... A toi ma maman.*

A mon cher frère Amine

Mes chères sœurs Ikram, Sara, Hala, et la petite Choukrane

*Mes chères amies Zeineb, Marcoua, Baraa, Soundous, Hadjer, Amira, Zineb et
Ouneissa pour tous les moments que nous avons partagés*

Roumaïssa.

Dédicace

Je Dédie ce travail :

A mon très cher frère « Djaber Nacer Eddine »

Que Allah le tout puissant lui accorde sa sainte miséricorde et lui accueil dans son vaste paradis

A ma très chère maman

Aucune dédicace ne pourra exprimer l'amour, le respect et la fierté que j'ai toujours eu pour toi. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi

A mon très cher papa

Tu as toujours été présent pour m'encourager et me soutenir, par tes bons conseils durant toutes mes années d'études. Ton affection et ton soutien ont été mon grand secours.

A ma chère grande mère « Nina »

Ta prière et ta bénédiction ont été un grand secours pour bien mener mes études. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorde la santé, la longue vie et le bonheur.

A mes chères sœurs Safia, Soumia et son mari Aref et leurs poussins Ranim, Djaber et Layene

A mon très cher oncle « Djamel » et sa petite famille

A mes chers amis « es »

Baraa, Hadjer, Maroua, Naouel, Nordjes, Roumaïssa, Scoundous, Zineb

Housssem, Oussama, Seif.

Merci pour les bons moments qu'on a partagés ensemble, pour votre soutien et de votre serviabilité. Que Dieu vous procure tout le bonheur que vous méritez.

.Zeineb.

Table des matières

1- Introduction	1
2- Revue bibliographique	2
2.1- Les levures	2
2.1.1- Définition	2
2.1.2- Morphologie et Structure	2
2.1.3- Les levures en biotechnologie	3
2.2- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2.1- Classification	4
2.2.2- Reproduction	4
2.2.3- Condition de culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.2.3.1- Besoins nutritionnels	6
2.2.3.2- Besoins physico-chimiques	7
2.2.4- Principales applications de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.2.5- Mécanismes de production de biomasse de la levure <i>S. cerevisiae</i>	8
2.2.6- Procédés de production de la biomasse microbienne	10
2.2.6.1- Système batch	10
2.2.6.2- Système fed-batch	11
2.2.6.3- Système Continu	11
2.3- Dattes déclassées, substrat de fermentation	11
2.4- Modélisation	13
2.4.1- Modèles structurés	15
2.4.2- Modèles non structurés	15
2.4.2.1- Monod	15
2.4.2.2- Logistique	17
2.4.2.3- Verhulst	18
3- Matériel et méthodes	21
3.1- Matériel biologique	21
3.2- Méthodes de fermentation	22
3.2.1- Sélection du milieu de production de biomasse de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
3.2.2- Préparation de l'extrait de dattes	22

3.2.3- Préparation de milieu de culture à base de l'extrait de dattes	23
3.2.4- Préparation de la pré-culture	23
3.2.5- Sélection des facteurs et optimisation du milieu de production	24
3.2.5.1- Plan d'expérience	24
3.2.6- Conduite de la fermentation en fioles	28
3.2.6.1- Production de la biomasse	28
3.2.6.2- Méthodes analytiques	28
3.3- Modélisation	29
3.3.1- Equations des modèles	29
3.3.2- Simulation des systèmes dynamiques	30
4- Résultats	31
4.1- Aspect morphologique de la levure	31
4.1.1- Observation macroscopique	31
4.1.2- Observation microscopique	31
4.2- Sélection du milieu de production de la biomasse de <i>S. cerevisiae</i>	32
4.3- Optimisation du milieu de production	33
4.3.1- Estimation des effets	34
4.3.2- Signification des effets	36
4.3.2.1- Test de Student	36
4.3.2.2- Analyse de la variance (ANOVA)	37
4.3.2.3- Détermination de R^2	38
4.3.3- Etude de la réponse	39
4.3.3.1- Détermination de la surface et des contours de réponse	39
4.3.3.2- Optimisation de réponse	39
4.4- Production de la biomasse en fiole	41
4.5- Modélisation	41
4.5.1- Résolution des équations	42
4.5.1.1- Modèle de Monod	42
4.5.1.2- Modèle de Verhulst	43
4.5.1.3- Modèle de logistique	44
5- Discussions	45
6- Conclusion et perspectives	48
7- Références bibliographiques	49

Annexe

8- Abstract.....	61
9- الملخص	62

Liste des abréviations

YPGA: Yeast-Extract Peptone Glucose Agar.

ANOVA: Analyse Of Variance.

μ : vitesse spécifique de croissance d'un micro-organisme (taux de croissance).

S : la concentration en substrat limitant

X_m : la concentration maximale de la biomasse (g/L)

μ_{max} : la vitesse spécifique de croissance maximale (1/h).

P : la taille de population.

β (P) : le taux de fertilité.

μ (P) : le taux de mortalité.

α : une fonction affine décroissante.

α_1 : une constante de signe quelconque

α_2 : une constante positive.

α_1 : constante de croissance intrinsèque.

K : capacité de charge dans le cas où $\alpha_1 > 0$.

Liste des figures

Figure 1 Structure cellulaire des levures.....	02
Figure 2 Bourgeonnement de <i>S. cerevisiae</i>	04
Figure 3 Cycle biologique de la levure <i>S. cerevisiae</i>	04
Figure 4 Métabolisme respiratoire (voie oxydative).....	08
Figure 5 But de la modélisation.....	13
Figure 6 Datte Mech-Degla.....	21
Figure 7 Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan composite centré à 3 Facteurs.....	24
Figure 8 Aspect macroscopique de la levure.....	29
Figure 9 Observation microscopique à l'état frais de la levure aux grossissements GX40 (A) et GX100 (B).....	30
Figure 10 Observation microscopique à l'état fixé de la levure aux grossissements GX40 (A) et GX100 (B).....	30
Figure 11 Assimilation des différents sucres.....	31
Figure 12 Représentation graphique des surfaces (A),et des contours (B), de réponse (DO).....	37
Figure 13 Recherche d'optima pour la réponse (DO)	37
Figure 14 Evolution de la biomasse de <i>S. cerevisiae</i> pendant le temps.....	39
Figure 15 Méthode de <i>linweaver-Burk</i> pour estimer μ_{\max} et K_s	41

Figure 16 Evolution du taux de croissance pendant le temps entre les données expérimentales et les données prédites par le modèle de Monod.....**42**

Figure 17 Evolution de la croissance pendant le temps entre les données expérimentales et les données prédites par le modèle de logistique.....**43**

Liste des tableaux

Tableau 1 Les principales applications de <i>S. cerevisiae</i>	07
Tableau 2 Production de datte par pays.....	11
Tableau 3 Teneur en sucres de quelques variétés des dattes algériennes.....	12
Tableau 4 Cas de croissance limité par le substrat pour les levures.....	15
Tableau 5 Plan d'expérience.....	23
Tableau 6 Valeurs réelles et valeurs codées.....	25
Tableau 7 La concentration des cellules (DO) entre les valeurs de l'expérimentation et les valeurs estimées.....	32
Tableau 8 Coefficients de l'équation 1.....	33
Tableau 9 Test de Student.....	34
Tableau 10 Analyse de variance.....	35
Tableau 11 Signification des valeurs codées et valeurs réelles.....	38

Introduction

Introduction

Depuis des milliers d'années les microorganismes ont été employés spontanément par l'homme dans le domaine alimentaire, mais les scientifiques n'ayant pu initier leurs études sur ces êtres vivants qu'après l'apparition du microscope en 1680.

La levure *S. cerevisiae* est un des microorganismes les plus utilisés dans le domaine des biotechnologies (Pandey *et al.*, 2009 ; Blachere, 2009). Notamment, pour la production du vin, de la bière et du pain. Mais aussi, elle est largement utilisée comme "usine cellulaire" pour plusieurs applications, comme la production de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique, de divers produits chimiques et plus récemment pour la production de bioéthanol (Lim *et al.*, 2011 ; Martin *et al.*, 2012 ; Neagu et Bahrim, 2012).

L'Algérie importe 18.000 tonnes par an de mélasse de betterave sucrière, et plus 13.000 tonnes par an de mélasse de canne (Chibane *et al.*, 2007). De même, elle importe la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisée comme levain boulanger (Boughnou, 1988 ; Leard, 2012). Par ailleurs, l'Algérie possède un potentiel énorme des dattes (Al-Farsi *et al.*, 2009 ; Gilles, 2010 ; Soltani, 2014). Aussi, la production de la biomasse levurienne à partir des sous produits issus de la palmeraie pourrait constituer un programme d'avenir pour la satisfaction du marché local (Soltani, 2014).

C'est sur cette logique que décolle le but de ce travail, et qui cible l'optimisation de la production de la biomasse de *S. cerevisiae* par des méthodes statistiques utilisant les extraits de dattes déclassées comme milieu de fermentation. Pour ce faire, plusieurs étapes s'avèrent nécessaires :

- Sélection du milieu de production afin d'obtenir un bon rendement de la biomasse de *S. cerevisiae* ;
- Détermination des conditions optimales pour améliorer la productivité de la levure cible ;
- Exploitation de l'extrait de dattes comme seule source de carbone pour la production de la biomasse de *S. cerevisiae* ;
- Validation du processus de production de biomasse par des modèles mathématiques non structurés.

Revue
Bibliographique

2- Revue Bibliographique

2.1- Les levures

2.1.1- Définition

Le mot levure, selon Phaff *et al.* (1968), provient du mot latin « levare » qui se traduit par lever. Ce mot a été appliqué aux levures en raison de l'aptitude de ces micro-organismes à produire de CO₂ pendant la fermentation et à lever la surface mousseuse d'un milieu liquide de fermentation (Oteng-Gyang, 1984).

Les levures sont des eucaryotes chimio-hétérotrophe, c'est-à-dire qu'elles sont capables de tirer leur énergie à partir des réactions d'oxydo-réduction ou de fermentation de composés chimique tels que les sucres (Guiraud et Galzy, 1998 ; Guiraud, 1996). Elles sont ubiquitaires, on les rencontre fréquemment dans les eaux, le sol, les feuilles de végétaux, les moûts de fruits, à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, etc., (Bouix et Leveau, 1991 ; Scriban, 1993 ; Leveau et Bouix, 1993 ; Pol, 1996). Les levures présentent un grand nombre d'applications industrielles par rapport aux procaryotes et possèdent un capital génétique qui subit peu de mutations (Larpen, 1990 ; Pol, 1996).

2.1.2 - Morphologie et Structure

Les levures présentent une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de golgi et de plus d'un chromosome (*Saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) (figure 1) (Larpen, 1990). Les cellules végétatives sont généralement ovoïdes ou sphériques, mais il existe d'autre formes spécifiques: triangulaires, ogivales, en forme de citron ou même en forme de bouteille (Larpen, 1991; Bourgeois et Larpen, 1996). Leur taille cellulaire varie de quelques microns jusqu'à 25 à 30 microns. Certaines peuvent former des associations cellulaires ou se présenter sous forme filamenteuse à un certain stade de leur vie (Bouix et Leveau, 1991).

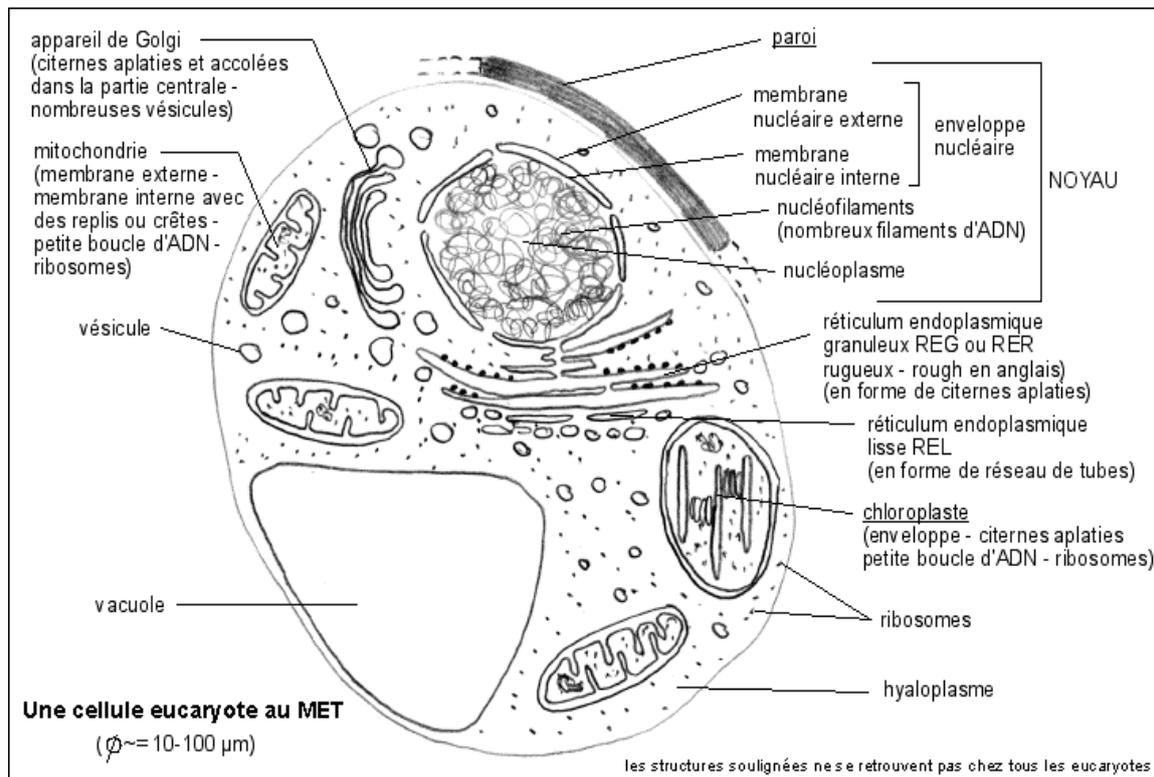


Figure 1 Structure cellulaire des levures (Thuriaux, 2004)

2.1.3- Les levures en biotechnologie

Les levures occupent une place primordiale dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie,) et dans la production des enzymes (l'invertase, lactase, lipase et les amylases) et dans la production de la biomasse (Simon et Meunier, 1970), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels et à la production des protéines (Scriban, 1984 et Lecterc *et al.*, 1995). Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (ex: production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) (Mercier, 1997 et Blin, 2002).

2.2- *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae vient du mot saccharose qui signifie «sucre», myces «champignon», tandis que *cerevisiae* fait référence à «cervoise», c'est un terme utilisé pour désigner le petit champignon microscopique qui compose les différentes sortes de levures qu'on utilise pour la fermentation (Larpent et Gourgoud, 1985). *Saccharomyces cerevisiae* est une cellule sphérique,

ovoïde ou allongée de taille très variable « 3-14 μ m ». Certaines cellules sont cylindriques et de grande taille (Larpent, 1991).

2.2.1- Classification

La classification de la levure *S.cerevisiae* selon le *catalogue of life* (2016) est la suivante :

Règne :	Fungi
Embranchement :	Ascomycota
Classe :	Saccharomycetes
Ordre :	Saccharomycetales
Famille :	Saccharomycetaceae
Genre :	Saccharomyces
Espèce :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

2.2.2- Reproduction

Selon les conditions physico-chimiques du milieu de culture, les cellules de la levure peuvent utiliser deux modes de reproduction différents :

➤ Reproduction asexuée

Le bourgeonnement représente le mode de reproduction végétatif le plus courant chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (figure 2). Pendant la formation du bourgeon, son cytoplasme reste réuni au cytoplasme de la levure mère, le noyau de celui-ci grossit et se déplace vers le bourgeon. La membrane nucléaire étrangle le noyau de telle manière que la moitié de celui-ci demeure dans la cellule mère et l'autre passe dans la cellule fille, tandis que la membrane cellulaire se referme autour de chaque noyau en donnant ainsi deux levures semblables, il est possible d'observer une cicatrice à l'endroit de la formation du bourgeon (Guiraud et Galzy, 1980).

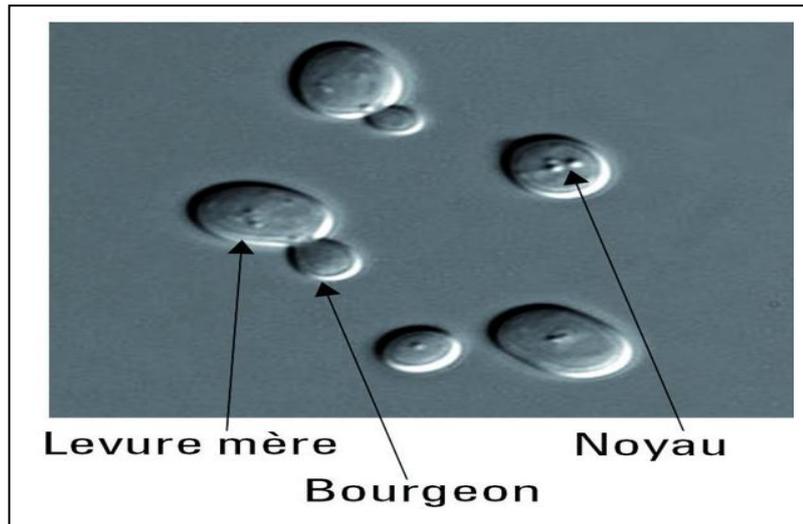


Figure 2 Bourgeonnement de *S. cerevisiae* (Kreger –Van, Rij, 1984)

➤ Reproduction sexuée

La reproduction sexuée s'effectue par conjugaison des deux cellules qui donnent naissance à un zygote, ce dernier subit une méiose ou les quatre noyaux haploïdes forment quatre ascospores donnant plus tard des cellules haploïdes (figure 3) (Bouix et Leveau, 1993).

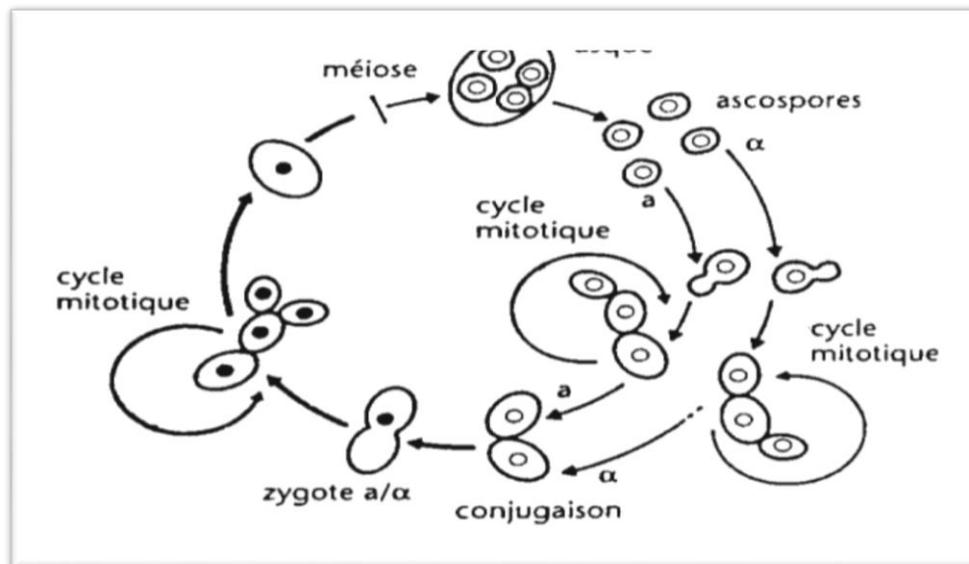


Figure 3 Cycle biologique de la levure *S. cerevisiae* (Bourgeois et Larpent, 1996).

2.2.3- Condition de culture de *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.3.1- Besoins nutritionnels

Les nutriments sont apportés au milieu de culture de façon graduelle pour maintenir une faible concentration de glucose afin d'encourager la respiration et la reproduction cellulaire des levures. Les éléments chimiques nécessaires à la croissance des levures sont :

➤ *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 tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques, etc., (Aguilar Uscanga, 2003). Les levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* 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 (Aguilar Uscanga, 2003).

➤ *Source d'azote*

L'azote joue un rôle capital pour la croissance de la levure, il entre dans la constitution de molécules simples et des macromolécules essentielle au fonctionnement cellulaire. Les levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* sont capables d'utiliser les sources azotées minérales simples, mais aussi des composés organiques divers, tels que les acides aminés et les peptides (Larpen, 1990). En levurière, l'apport d'azote est assuré par l'addition de l'urée, des sels d'ammonium comme le sulfate d'ammonium ou le dihydrogénophosphate d'ammonium.

➤ *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 (Suarit *et al.*, 1988). 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 (Blom *et al.*, 2000). Les oligo-éléments augmentent la production de l'éthanol de 20% par *Sacharomyces cerevisiae* (Guiraud, 1996). 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 (Aguilar Uscanga, 2003).

2.2.3.2- Besoins physico-chimiques

➤ *La température*

La température courante de culture des levures se situe entre 25 et 35°C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. En effet, la température de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* est située entre 27 et 39°C (Bouix et Leveau, 1993).

➤ *Le pH*

Les levures ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. La croissance optimale de *saccharomyces cerevisiae* se fait à des pH acides entre 4,6 à 6,5 (Bouix et Leveau, 1993).

➤ *L'oxygène*

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes. Certaines levures sont aérobies strictes comme les genres : *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*. Les autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire comme ; *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces* soit respiratoire comme ; *Candida*, les *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula* et *Torulopsis* (Bouix et Leveau, 1991).

2.2.4- Principales applications de *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* occupe une place privilégiée dans les activités industrielles. Elle est utilisée par l'homme depuis des millénaires pour la production de boissons et produits fermentés (vin, bière, pain) et joue un rôle très important dans l'industrie agroalimentaire comme agent de fermentation et pour l'élaboration de produits dérivés (Tortora et Anagnostakos, 1987). La levure est également largement utilisée comme usine cellulaire pour la production de molécules d'intérêt (Mercier, 1997 ; Blin, 2002). Dans le domaine pharmaceutique et médical, elle est utilisée pour la production de vaccins et de probiotiques (Rose et Harrison, 1971). Elle joue également un rôle clé dans l'industrie chimique pour la synthèse de produits de commodité comme l'acide lactique pour la production des plastiques et dans le domaine des énergies renouvelables et des biocarburants (bioéthanol) (Parrou *et al.*, 1997) (tableau 1).

Tableau 1 Les principales applications de *S. cerevisiae*

Produits de <i>S. cerevisiae</i>	Applications	Références
Alcool et CO ₂	Fabrication du pain, du vin, de la bière	(Hurteau et Tremblay, 2015)
Ethanol	Solvant	(Smeets <i>et al.</i> , 2016)
Glycérol	Chimie des matières plastiques industrie pharmaceutique	(Zighaet <i>et al.</i> , 2015)
Protéines alimentaires (à partir des mélasses)	Alimentation de l'homme ou du bétail	(Duport <i>et al.</i> , 2015)
Invertase	Confiserie	(Silveira <i>et al.</i> , 2016)

2.2.5- Mécanismes de production de biomasse de la levure *S. cerevisiae*

Pour obtenir un bon rendement de production de biomasse, il est nécessaire d'oxyder complètement le substrat organique et d'utiliser l'énergie potentielle libéré au cours de la fermentation (Scriban, 1999). 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 ; Aguilar Uscanga, 2003). Le type métabolique, lui-même, varie selon l'environnement (présence d'oxygène), la source de carbone et l'espèce de la levure considérée (Bauer *et al.*, 1992). La levure *S. cerevisiae* a un métabolisme varié (Bouix et Leveau, 1991 ; Touzi, 1994 ; Flickweert *et al.*, 1999). Cependant, le bon rendement de production de la biomasse s'effectue grâce au métabolisme respiratoire (figure 4).

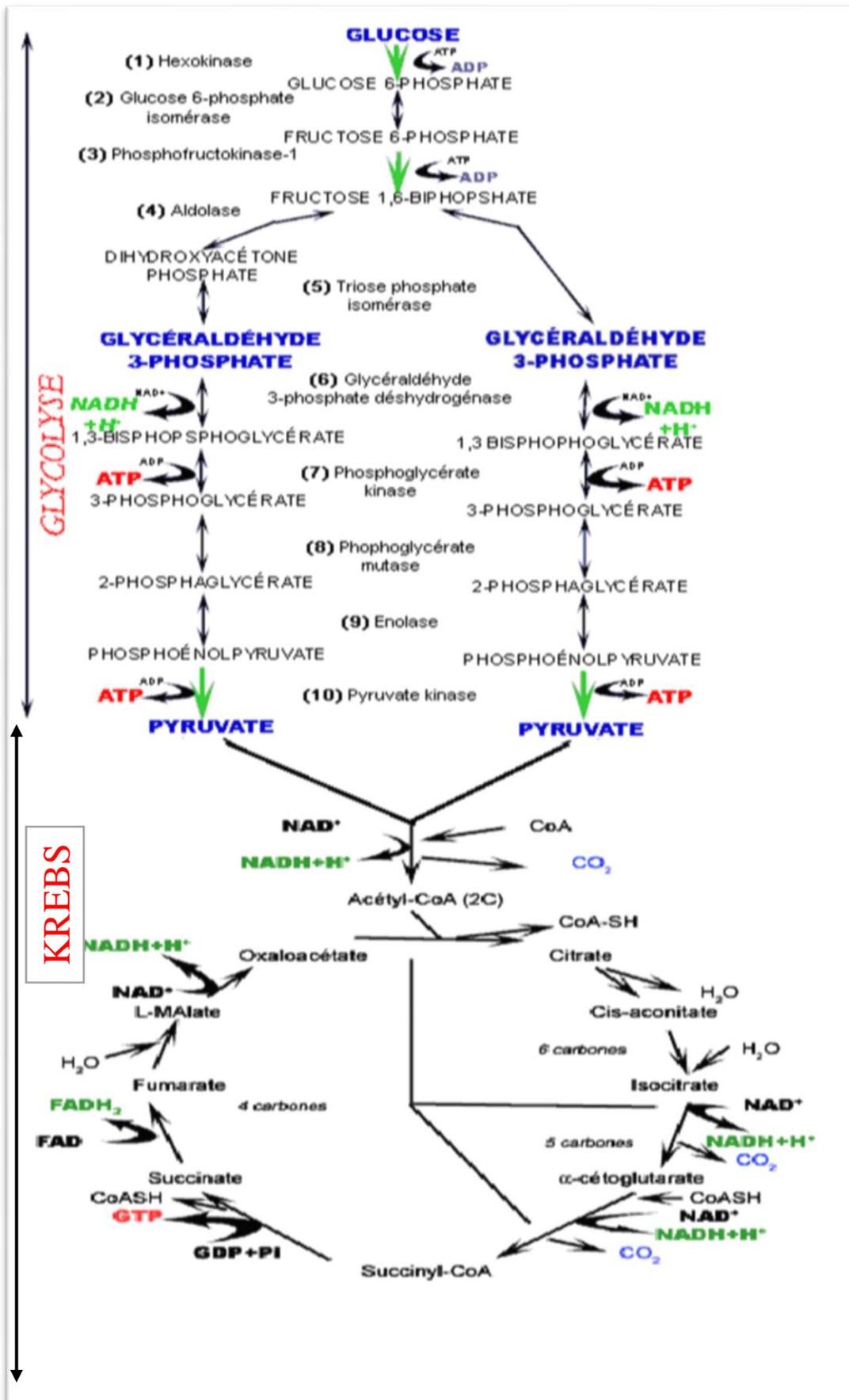


Figure 4 Métabolisme respiratoire (voie oxydative) (Flickweert *et al.*, 1999).

Le métabolisme (respiratoire) oxydatif du glucose est une oxydation complète de la molécule de sucre en eau et en gaz carbonique à travers les voies métaboliques de la glycolyse, du cycle de Krebs (figure 4) et de la phosphorylation oxydative. Deux conditions sont nécessaires à ce métabolisme ; la présence d'oxygène et la concentration en glucose et ce, pour éviter un changement métabolique (Van Uden et Fell, 1968). Chez la levure comme chez d'autres organismes eucaryotes, les différentes enzymes qui catalysent les réactions du cycle de Krebs sont situées dans la mitochondrie.

Le bilan énergétique théorique maximal de cette voie métabolique est le suivant :



En plus de la production de co-enzymes réduits sous forme de NADH et FADH₂, le cycle de Krebs sert à former de nombreux précurseurs pour la synthèse de macromolécules de la composition cellulaire (Rose et Harrison, 1971). La phosphorylation oxydative régénère les co-enzymes réduits NADH et FADH₂ en NAD⁺ et FAD. Les électrons ainsi libérés sont transférés à l'oxygène moléculaire pour former une molécule d'eau. Les protons exportés permettent le maintien du potentiel transmembranaire entre l'espace intermembranaire et la matrice de la mitochondrie. Ainsi, l'entrée des protons à l'intérieur de la mitochondrie permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi grâce à l'ATPase membranaire.

L'efficacité de cette voie peut se traduire par le nombre de moles d'ATP formées par atome d'oxygène consommé soit le rapport P/O. La valeur théorique de P/O pour la levure est de 2. Mais des études conduites en culture aérobie sur différents substrats (acide acétique, acide lactique, éthanol, glucose, etc.) avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont montré que la valeur moyenne de ce ratio P/O varie entre 1,2 et 1,3 (Nielsen et Villadsen, 1991 ; Vasconcelos *et al.*, 2004). La plupart de l'énergie produite par cette voie métabolique est utilisée pour faire de la biomasse et du dioxyde de carbone. Le rendement énergétique de la biomasse par voie oxydative est de 0,5g/g.

2.2.6- Procédés de production de la biomasse microbienne

2.2.6.1- Système batch

Le procédé est réalisé dans un système clos dans lequel un même volume de milieu non renouvelé est utilisé pour la croissance des micro-organismes, la quantité de nutriments est donc limitée (Warren *et al.*, 1994).

La cuve est remplie par le milieu de culture stérilisé, puis inoculé. La fermentation se déroule ensuite, sans addition supplémentaire de milieu. Le volume reste constant et la productivité est relativement faible. En fin de fermentation, le fermenteur est vidé et son contenu est récupéré (Warren *et al.*, 1994).

2.2.6.2- Système fed-batch

Le terme de culture fed-batch a été introduit dans la communauté scientifique par Yoshida *et al.*, (1973). La conduite en mode fed-batch permet d'atteindre de plus hautes concentrations en biomasse et en produits que le mode batch en évitant l'inhibition par la concentration en substrat et la limitation en éléments nutritifs et en réduisant les effets toxiques des produits par dilution lors des apports (Roukas, 1994 ; Ward, 1989).

Le fed-batch permet en pratique un gain de temps, une augmentation de productivité et une possibilité de modification du milieu en cours de culture mais le risque de contamination est élevé (Lee et Chang, 1987).

2.2.6.3- Système Continu

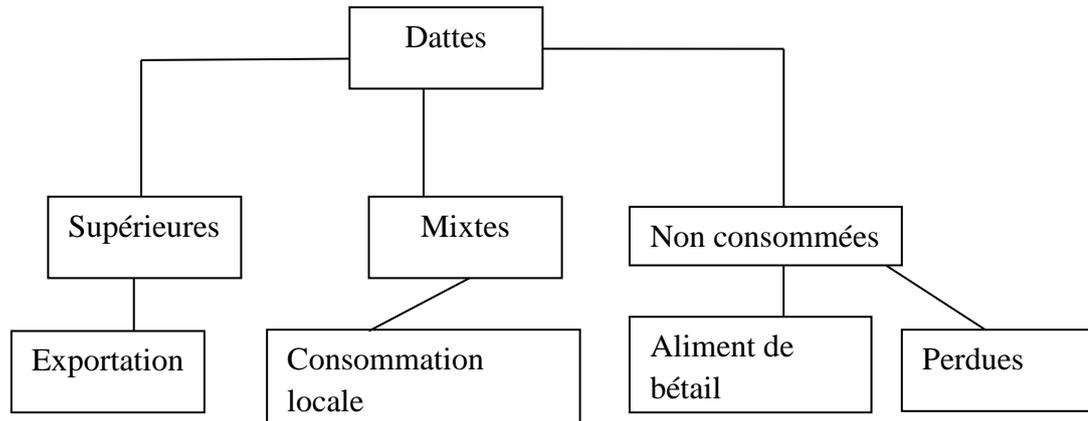
Le réacteur en mode continu est un système ouvert, dans lequel le milieu de culture est continûment additionné et le milieu de fermentation qui contient les métabolites produits, est continûment extrait, avec un volume réactionnel constant (Ward, 1989).

La fermentation en mode continu peut combiner une cuve et un système de recyclage cellulaire ; dans ce cas, une fraction de la biomasse cellulaire est recyclée dans la cuve (Lee et Chang, 1987 ; Nishiwaki et Dunn, 1999 ; Warren *et al.*, 1994). La fermentation en mode continu permet l'obtention de productivité élevée (Vasconcelos *et al.*, 2004), et facilite le contrôle du procédé et la maîtrise des rendements.

2.3- Dattes déclassées, substrat de fermentation

Les variétés de dattes sont très nombreuses, seulement quelques-unes ont une importance commerciale. Elles se différencient par la saveur, la consistance, la forme, la couleur, le poids et les dimensions (Djerbi, 1994 ; Belguedj, 2001).

Du point de vue de la valorisation des dattes en Algérie, on peut distinguer plusieurs catégories selon le schéma suivant :



Les dattes exportées sont de la variété *Deglet-Nour* appelées dattes nobles, consommées sans transformation ou modification. Les dattes mixtes ou communes représentent les dattes molles et les dattes sèches destinées exclusivement au marché local, avec une importance économique faible, car très peu appréciées sur les marchés lucratifs. Les dattes non consommables sont des dattes qualifiées de déclassées pour leur caractéristiques technologiques, en l'occurrence les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques : faible qualité gustative, texture rébarbative ou négligée. Une grande partie des deux dernières catégories proviennent des dattes sèches représentées par plusieurs variétés, entre autres : Kentichi, Mech degla, Degla beida, etc., (Bouddrar et *al.*, 1997 ; Kendri, 1999 ; Masmoudi, 2000). La production mondiale de dattes réalisée en 2007 est de 5,09 millions de tonnes (Tableau 2) (FAO, 2007). Quantitativement l'Algérie représente 7% de la production mondiale mais du point de vue qualitatif elle occupe le premier rang grâce à la variété *Deglet-Nour*, la plus appréciée mondialement.

Tableau 2 Production de datte par pays (FAO, 2007).

Pays	Production en quintaux
Egypte	1.100.000
Irak	910.000
Iran	880.000
Arabie saoudite	830.000
Emirats arabes unis	760.000

Pakistan	650.000
Algérie	450.000
Soudan	330.000
Oman	238.611

Plusieurs applications biotechnologiques peuvent être envisagées. Outre les applications classiques, la préparation de l'extrait de dattes constituera par sa richesse en sucres (tableau 3) un excellent milieu de fermentation pour une grande diversité des microorganismes, pour la production de différents produits métaboliques primaires ou secondaires (Estanove, 1990). De plus, ce substrat peut être utilisé dans la production de biomasse riche en protéines d'organismes unicellulaires, destinée à l'alimentation animale.

Tableau 3 Teneur en sucres de quelques variétés des dattes algériennes (Belguedj, 2002).

Constituant par rapport à la matière sèche (%)	Type de datte					
	Molle		Demi- molle		Sèche	
	Ghars	Tinicine	Deglet-nour	Tafazouine	Degla-beida	Mech-degla
Sucres Totaux	85,28	54,30	71,37	56,90	74	80,07
Sucres réducteurs	80,68	48	22,81	47,70	42	20
Saccharose	04,37	05,30	46,11	8,74	30,36	51,40

2.4- Modélisation

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 (Lin et Tanaka, 2006). Généralement, l'objectif de la modélisation est de répondre à trois besoins principaux : la compréhension des phénomènes, le contrôle et l'optimisation (figure 5) Lin et (Lin et Tanaka, 2006). En effet, le choix du modèle nécessite la définition de ses 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 (Lin et Tanaka 2006).

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 (Warren *et al.*, 1994). 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).

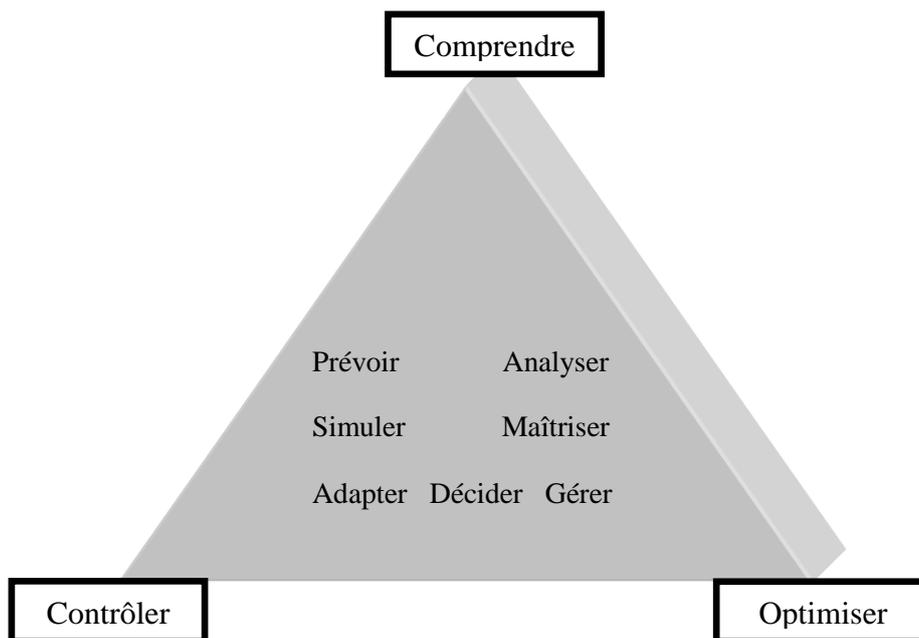


Figure 5 But de la modélisation (Lin et Tanaka, 2006).

Ainsi, le choix d'un modèle (ou sa construction) sera fortement lié à la définition initiale des objectifs et des contraintes. D'autre part, le travail de modélisation repose de plus en plus sur une approche pluridisciplinaire (Lin et Tanaka, 2006). Cette constatation est exprimée dans le discours d'introduction d'un colloque canadien sur la modélisation des systèmes biologiques (Pattey et De Jong, 1998): « *Because modelling is such a comprehensive task, it offers an opportunity to carry out cross disciplinary research whereby our knowledge in different research areas is summarized. Perhaps even more importantly, it pushes scientists to examine the limits of their current knowledge domain, thereby forcing them to broaden their own scope* ». La croissance microbienne, en particulier, 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 (Pattey et De Jong, 1998).

On distingue deux grands groupes de modèles dans le domaine du génie microbiologie : les modèles dits non-structurés ou empiriques et les modèles dits structurés ou mécanistes.

2.4.1- Modèles structurés

A l'intérieur d'une même population cellulaire, il est possible de distinguer des entités différentes selon l'âge, la taille, la morphologie, l'état physiologique, et la composition biochimique, éléments reliés d'ailleurs les uns aux autres (Nielsen *et al.*, 1991). Les modèles structurés prennent les différences en compte en faisant appel à des fonctions statistiques de distribution de telle ou telle propriété plus intéressante à retenir. L'état physiologique d'une population cellulaire est étroitement lié aux concentrations des différents types de constituants présents dans les cellules qui définissent le vecteur physiologique d'état de la population considérée (Leveau et Bouix, 1999). Les modèles de ce type bien sûr très intéressants, sont cependant, rarement utilisés du fait de leur degré de complexité mathématique (Bouguettoucha *et al.*, 2007) et des difficultés d'acquisition de données concernant l'âge, la morphologie et l'état physiologique des cellules (Norton *et al.*, 1993).

2.4.2- 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 en présence d'inhibiteurs de la croissance), ainsi que de certaines variables environnementales (pH, TP, force ionique, etc.) (Piret, 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).

2.4.2.1- 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 micro-organisme, μ , et la concentration en substrat limitant, S donnée par l'équation suivante (Monod, 1942).

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S+K_S}$$

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 $1/2\mu_{\max}$. (Monod, 1942). 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 4).

Tableau 4 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)

2.4.2.2- Logistique

La régression linéaire, simple ou multiple, est une méthode statistique très couramment utilisée dans le traitement des données, en particulier dans une démarche de modélisation.

Elle consiste à mettre en relation une variable à expliquer y avec une ou plusieurs variables explicatives x_1, x_2, \dots, x_p , appelées **prédicteurs**. La méthode est cependant limitée aux situations où la variable à expliquer est une variable quantitative dont la distribution, pour une valeur fixée des prédicteurs, est normale. Elle ne devrait notamment pas être utilisée lorsque la variable y est une variable qualitative. Pour de telles situations, la méthode indiquée est la régression logistique qui offre plusieurs variantes en fonction du nombre et de la nature des classes de la variable à expliquer (Brant, 1990).

La première méthode, appelée **régression logistique binaire** (*binary logistic regression*), correspond au cas où la variable y comporte uniquement deux classes, les individus étant décrits par la présence ou l'absence d'un caractère donné (O'Connell, 2000). Par exemple, des individus (parcelles, plantes, animaux, etc.) peuvent être attaqués ou non par un parasite, être fertiles ou non, être porteurs ou non d'une tare, etc. La deuxième méthode, appelée **régression logistique polychotomique nominale** (*polytomous nominal logistic regression*), permet de traiter les cas où la variable à expliquer possède plus de deux classes si celles-ci ne peuvent pas être ordonnées ou si on ne souhaite pas tenir compte de l'ordre dans le cas où elles seraient ordonnées (O'Connell, 2000). Enfin, la troisième méthode, appelée **régression polychotomique ordinale** (*polytomous ordinal regression*), concerne les situations où la variable y présente plus de deux modalités qui peuvent être ordonnées et dont on souhaite tenir compte de l'ordre (Allison, 1999). Un exemple typique est la description de l'intensité de l'attaque d'individus par un parasite, cette description étant réalisée par exemple sur la base d'une échelle à quatre niveaux notés **A**, **B**, **C** et **D**, le niveau **A** représentant l'absence d'attaque, le niveau **B** une attaque faible, le niveau **C** une attaque modérée et le niveau **D** une attaque forte.

Le modèle de logistique propose une relation entre le taux de croissance d'un micro-organisme μ_m , et la concentration en biomasse X , donnée par l'équation suivante (Bailey, 1986).

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m \left(1 - \frac{x}{x_m}\right) x$$

L'intégration de cette équation par l'utilisation des conditions initiales donne la variation de la biomasse en fonction de t comme suit :

$$X = \frac{x_0 e^{\mu_{\max} t}}{1 - (x_0 / X_m)(1 - e^{\mu_{\max} t})}$$

Où :

X_m : la concentration maximale de la biomasse (g/L)

μ_{\max} : la vitesse spécifique de croissance maximale (1/h).

2.4.2.3- Modèle Verhulst

Ce modèle a été présenté par le mathématicien Verhulst en (1838) (Dekker, 1985), pour modéliser la croissance d'une population en présence de facteurs limitant (la croissance de la population se stabilise au cours du temps). C'est un modèle de croissance proposé, en réponse au modèle de Malthus qui supposait un taux de croissement constant sans frein conduisant à une croissance exponentielle de la population. Le modèle de Verhulst suppose que le taux de natalité et le taux de mortalité sont des fonctions affines respectivement décroissante et croissante de la taille de la population. Autrement dit, plus la taille de la population augmente, plus son taux de natalité diminue et son taux de mortalité augmente. Ce modèle conduit, en temps continu, à une fonction logistique et en temps discret à une suite logistique. Si on appelle par :

- P : la taille de population.
- $\beta(P)$: le taux de fertilité.
- $\mu(P)$: le taux de mortalité.

La taille de la population suit l'équation différentielle suivante :

$$\dot{P}(t) = P(t) [\beta(P) - \mu(P)].$$

Si μ et β sont des fonctions affines respectivement croissante et décroissante, alors $\alpha = \beta - \mu$ est une fonction affine décroissante.

$$\alpha(P) = \alpha_1 - \alpha_2 P.$$

Avec α_1 une constante de signe quelconque et α_2 une constante positive.

D'où l'équation :

$$P'(t) = P(t) (\alpha_1 - \alpha_2 P(t)).$$

En posant $k = \frac{\alpha_1}{\alpha_2}$ on aura,

$$P'(t) = \alpha_1 P(t) \left(1 - \frac{P(t)}{k}\right).$$

Résolution en temps continu D'où :

$$P(t) = \frac{P(0)k}{P(0) - (P(0) - k)e^{-\alpha_1 t}}$$

α_1 : constante de croissance intrinsèque.

K : capacité de charge dans le cas où $\alpha_1 > 0$.

La simulation de la croissance de la souche levurienne étudiée dans le présent travail (*S. cerevisiae*), a été mise en place en utilisant les modèles non structurés (Monod, verhulst et logistique).

Matériel
et
Méthodes

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'optimisation de production de la biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* sur diverses sources de carbone, en se focalisant sur la caractérisation de la production de la meilleure biomasse sur milieu à base de l'extrait de dattes d'une part et sur la proposition de modèles mathématiques non structurés en vue—de les valider par l'expérimentation. La partie expérimentale a été réalisée au sein du Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri, Constantine.

3.1- Matériel biologique

La levure utilisée dans ce travail est d'origine commerciale produite par la société *Lesaffre*. Il s'agit de la forme lyophilisée de *Saccharomyces cerevisiae*. Le choix de cette souche est motivé par plusieurs avantages comme ; la disponibilité, la croissance rapide, la résistance aux contaminants, la culture facile, un pouvoir fermentaire élevé, la capacité de consommer la plupart des sucres, un rendement important... etc. Elle a été réactivée en boîtes de Pétri sur milieu gélosé Yeast-Extract- Peptone- Glucose- Agar (YPGA) (Annexe 1) et incubée à 30°C pendant 24h. Après développement, la levure a subie une vérification par l'observation macroscopique et microscopique :

➤ **Observation macroscopique**

L'observation macroscopique a concerné l'étude de la colonie sous tous ses aspects : la taille (petite, moyenne, grande) ; la forme (ronde, irrégulière, etc.) ; la consistance ; l'élévation et le relief (Camille, 2007). Cette observation est entamée à partir de l'ensemencement sur milieu solide YPGA, jusqu'à l'expiration de la période de l'incubation.

➤ **Observation microscopique à l'état frais**

Cette technique permet l'observation des cellules levuriennes et la détermination de leurs morphologie (Camille, 2007). La technique consiste à déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame en verre propre, puis, à l'aide d'une boucle de l'anse de platine stérile, un prélèvement de la colonie jeune est apporté et dissocié dans la goutte d'eau physiologique, la préparation est, ensuite, couverte par une lamelle en évitant la formation de

bulles d'air, l'observation est réalisée au microscope optique à l'objectif (X40) et à immersion (X100) (Singleton, 2005).

➤ **Observation microscopique à l'état fixé**

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 lavés à l'eau du robinet, séchés par le papier filtre et examinés au microscope jusqu'à l'objectif à immersion (GX100) (Guiraud, 1998).

3.2- Méthodes de Fermentation

3.2.1- Sélection du milieu de production de biomasse de *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae* est testée sur un milieu de culture composé de diverses sources de carbone, en l'occurrence, les hexoses (le glucose et le fructose); les disaccharides (le maltose, et le saccharose); les polysaccharides (amidon et inuline) et deux extraits de dattes et de l'artichaut. Chaque substrat carboné est préparé à une concentration de 2% alors que la source d'azote (extrait de levure) est utilisée à 0.5%. Les tubes contenant 8 mL du milieu sontensemencés avec 2 mL d'une suspension levurienne (10^7 cellules/mL) et sont incubés à 30 °C pendant 4h. La biomasse est estimée par la mesure de la DO qui est proportionnelle à la concentration cellulaire, (1 Unité d'absorbance équivaut à $1,3 \cdot 10^7$ cellules/mL) (Pinta, 1979).

3.2.2- Préparation de l'extrait de dattes

La variété de dattes retenue dans cette étude est très répandue dans les palmeraies de la région Sud-Est de l'Algérie. C'est la variété sèche: Mech-Degla. Cette variété est de forme sub-cylindrique, légèrement rétrécie à son extrémité. La datte est de couleur beige clair teinté. L'épicarpe est ridé, peu brillant et cassant. Le mésocarpe est peu charnu de consistance sèche et de texture fibreuse (figure 6) (Belguedj, 2001).



Figure 6 Datte Mech-Degla (Beldgeudj, 2001).

Le choix de cette variété se justifie par son abondance au niveau national, sa faible valeur marchande, sa facilité de conservation (datte sèche) et sa richesse en sucres, de ce fait, cette variété est constituée un milieu favorable pour la croissance et le développement des levures.

Pour ce faire, 1 kg de dattes sont lavés, pelés et placés dans 5 L de l'eau distillée puis portés à l'ébullition à 100°C pendant une heure, pour extraire les sucres. L'extrait obtenu est filtré à travers la mousseline pour éliminer les grosses particules, ensuite, la solution est centrifugée à 5000 rpm pendant 5 min. le surnageant obtenu constitue le jus (extrait) de dattes.

3.2.3- Préparation de milieu de culture à base de l'extrait de dattes

Le jus obtenu de la préparation précédente, est supplémenté par les sels minéraux dont la composition par g/L est la suivante : sulfate de magnésium 0.44g, urée 12.70 g, sulfate d'ammonium 5.30 g. Enfin le milieu est réparti dans des Erlenmeyers de 250 ml à raison de 100 ml par erlen et stérilisé à 120°C pendant 20 minutes.

3.2.4- Préparation de la pré-culture

La pré-culture est obtenue par inoculation de deux colonies de la levure *S. cerevisiae* dans des fioles de 250 mL, contenant 100 mL du milieu de l'extrait de dattes préparé précédemment. La culture est incubée à 30°C pendant 3h. La pré-culture obtenue est utilisée comme inoculum pour la production de la biomasse.

3.2.5- Sélection des facteurs et optimisation du milieu de production

La croissance microbienne est influencée par les constituants du milieu de culture et par les facteurs physico-chimiques en particulier, la température, le pH, et la concentration de substrat. En effet, plusieurs méthodes ont été utilisées pour optimiser l'influence de ces facteurs sur une réponse donnée, parmi ces méthodes, on cite le plan d'expérience.

3.2.5.1- Plan d'expérience

Un plan d'expérience se définit par la mise en œuvre de façon organisée d'un ensemble d'unités expérimentales de manière à révéler les effets de différents paramètres sur une ou plusieurs réponses mesurées. Ainsi, il est nécessaire de faire varier tous les facteurs simultanément afin de mesurer l'impact d'un paramètre et/ou les interactions entre plusieurs paramètres sur les réponses étudiées. Ceci permet de diminuer à la fois le nombre d'expériences à réaliser, mais aussi l'incertitude sur les résultats des calculs.

➤ *Choix des facteurs*

Les facteurs sont les variables que l'on désire étudier et qui sont supposées avoir une influence sur le système. Ils peuvent être quantitatifs ou qualitatifs, continues ou discrets, contrôlables ou non contrôlables. En effet, dans la présente étude, les facteurs, qui sont sensés optimiser le milieu de production de biomasse, sont choisis à partir de l'analyse bibliographique (la température, le pH et la concentration de la source de carbone (extrait de dattes déclassées)).

➤ *Organisation des expériences*

L'organisation des expériences est réalisée selon la matrice du plan Composite centré. Cette matrice est composée de 3 facteurs, cités précédemment et de 20 expériences. Les codes -1 et +1 correspondent respectivement au niveau inférieur et au niveau supérieur respectivement, la valeur 0 représente la valeur centrale de la gamme et 1.68 représente la valeur α ($\alpha = \sqrt[4]{N_f}$) (N_f = nombre d'expérience) (Tableau 5).

Tableau 5 Matrice du plan composite centré

Expériences	Valeurs codées			Valeurs réelles		
	X1	X2	X3	TP (°C)	pH	Concentration des sucres totaux (g/L)
01	-1	-1	-1	29	3.6	44.1
02	+1	-1	-1	37	3.6	44.1
03	-1	+1	-1	29	7.3	44.1
04	+1	+1	-1	37	7.3	44.1
05	-1	-1	+1	29	3.6	170.9
06	+1	-1	+1	37	3.6	170.9
07	-1	+1	+1	29	7.3	170.9
08	+1	+1	+1	37	7.3	170.9
09	-1.68	0	0	27	5.5	107.5
10	+1.68	0	0	39	5.5	107.5
11	0	-1.68	0	33	2.4	107.5
12	0	+1.68	0	33	8.6	107.5
13	0	0	-1.68	33	5.5	1
14	0	0	+1.68	33	5.5	214
15	0	0	0	33	5.5	107.5
16	0	0	0	33	5.5	107.5
17	0	0	0	33	5.5	107.5
18	0	0	0	33	5.5	107.5
19	0	0	0	33	5.5	107.5
20	0	0	0	33	5.5	107.5

Chaque colonne représente les différentes variables (facteurs) et chaque ligne représente les différentes expériences. Chaque facteur est testé à trois niveaux :

- Les deux niveaux $(-1, +1)$ du plan factoriel complet, 2^k expériences (k , nombre de facteurs).
- Les deux niveaux $(-\alpha, +\alpha)$ du plan étoile, $2k$ expériences.
- Le point au centre du domaine d'étude N_0 .

Le nombre total de N essais à réaliser pour k facteur est donné par la relation suivante :

$$N=2^k+2k+N_0$$

Les valeurs codées illustrés sur le tableau composées de trois sous-parties:

- La première avec les expériences de 1 à 8 correspond au plan factoriel complet $N_f = 2^3$ expériences.
- La seconde avec les expériences de 9 à 14 correspond au plan en étoile ($\alpha = \sqrt[4]{N_f} = 1,6818$)
- La troisième avec les expériences de 15 à 20 correspond aux points au centre N_0 .

Le lieu géométrique des points expérimentaux est représenté sur la figure 7.

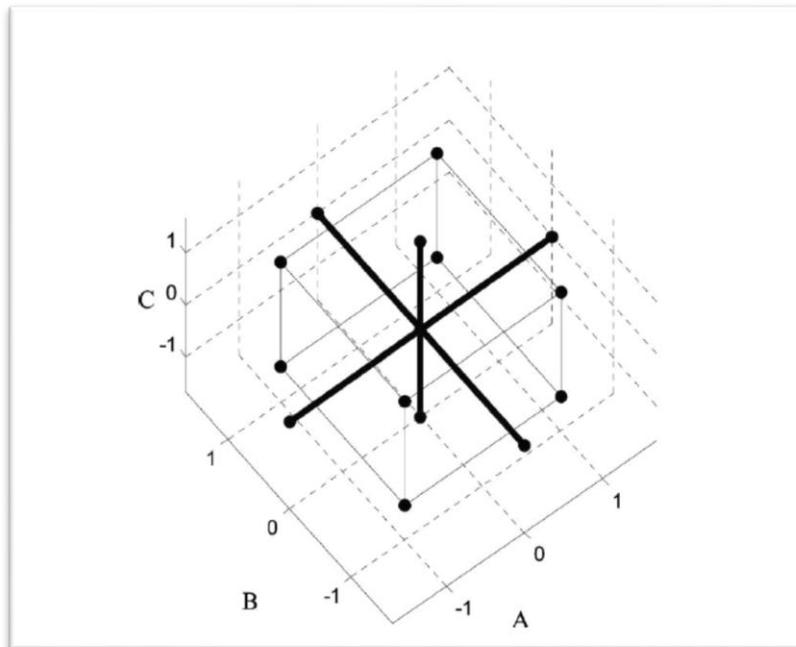


Figure 7 Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan composite centré à 3 facteurs.

Les valeurs expérimentales réelles correspondantes aux valeurs codées servant à la création de la matrice d'expériences (tableau 5), sont présentées ci-dessous (tableau 6).

Tableau 6 Valeurs réelles et valeurs codées.

	Valeurs codées				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
	Valeurs réelles				
X1 = TP	27	29	33	37	39
X2 = pH	2.4	3.6	5.5	7.3	8.6
X3=Concentration des sucres (g/L)	1	44.1	107.5	170.9	214

➤ *Estimation des effets*

Les valeurs réelles X_i ont été calculées pour les différentes variables i d'après l'équation

$$X_i = x_i \Delta x_j + X_{i0}$$

Dans laquelle X_i est la valeur codée pour la $i^{\text{ème}}$ variable, Δx_j est le pas (variation de la grandeur réelle correspondant à une unité de la variable codée) et X_{i0} est la valeur réelle pour la $i^{\text{ème}}$ variable correspondant à la valeur codée 0 (valeur centrale de la gamme).

Le calcul d'effet de chaque variable et l'établissement d'une corrélation entre la réponse Y_i et les variables X_i , ont été réalisés grâce à un logiciel Minitab 16.

La corrélation établie entre Y_i et X_i est une régression multiple de forme :

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Dont, Y_i est la réponse prédite représenté dans notre cas par la concentration cellulaire (D.O), β_0 est la constante, $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ sont les coefficients d'effets linéaires, $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ sont les coefficients d'effet quadratique, $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ sont les coefficients d'interactions et X_1, X_2, X_3 sont les variables indépendantes.

3.2.6- Conduite de la fermentation en fioles

3.2.6.1- Production de la biomasse

Le milieu à base de l'extrait de datte est réparti dans des Erlenmeyers de 250 ml à raison de 100 ml par erlen (concentration), puis le pH de milieu est ajusté à 5,4 (valeur optimale). Les

erlens sont stérilisés à 120°C pendant 20 minutes, ensuite, chaque erlen estensemencé par 11 ml de la pré-culture préparée précédemment, et incubé à 32,9°C (valeur optimale) pendant 18 heures.

3.2.6.2 -Méthodes analytiques

À chaque 2 heures, un volume de 10 ml est prélevé pour suivre la concentration de biomasse et la concentration du substrat.

➤ *Mesure de la densité optique*

La croissance cellulaire est suivie par la 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 mesure du poids sec consiste à peser la biomasse cellulaire contenue dans un volume de culture connu Prescott *et al.*, (2007). Pour chaque échantillon, 1 mL de culture est introduit dans des tubes Eppendorff (1,5 mL/ tube) puis centrifugé à 5000 rpm, pendant 5 min, La biomasse obtenue a été séchée dans le four à 105 °C pendant 6h, puis, pesée afin de déterminer son poids sec.

➤ *Dosage des sucres totaux*

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de Dubois *et al.*, (1956), dont le principe repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy méthyl furfural (HMF). Ce composé se condense avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. Afin de doser les sucres totaux contenant dans l'extrait de dattes selon cette méthode, un mélange réactionnel contient 0.1 ml de l'extrait de dattes, 1 ml de phénol et 5 ml de l'acide sulfurique (95%) a été incubé à 37°C pendant 15 min, la réaction est stoppée immédiatement en mettant le mélange réactionnel à 100°C pendant 5 min. L'absorbance est déterminée à 490 nm par rapport à une gamme d'étalons de 0 à 120 µg /ml de glucose. La

courbe d'étalonnage représente la concentration des cellules (D.O) en fonction des différentes concentrations du glucose (Annexe 2).

3.3- Modélisation

Trois modèles non structurés ont été implémenté pour simuler le processus de production de la biomasse par *S. cerevisiae* en l'occurrence ; le modèle de **Monod**, le modèle de **Verhulst** et le modèle de **Logistique** pour la croissance de la biomasse.

3.3.1- 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 et ds/dt .

➤ *Equation de Monod*

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}).

K_S : la constante de demi-saturation (g/L).

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 :

$$\frac{dx}{dt} = r_X = \mu X \dots (2)$$

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

$$r_X = X \cdot \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \dots (3)$$

➤ *Equation de Verhulst :*

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$$

Où :

μ_{max} : Représente le taux de croissance maximal (h^{-1}).

X_m : Concentration maximale en biomasse (g/L), avec une évolution de X_0 à X_f .

➤ *Equation de logistique*

$$X(t) = X_0 \cdot \frac{e^{(\mu_{max} \cdot t)}}{\left[1 - \frac{X_0}{X_m} \cdot (1 - e^{\mu_{max} \cdot t})\right]}$$

Où :

μ_{max} : Représente le taux de croissance maximal (h^{-1}).

X_m : Concentration maximale en biomasse (g/L), avec une évolution de X_0 à X_f .

3.3.2- Simulation des systèmes dynamiques

Le logiciel utilisé pour la simulation des données dans le présent travail est Mathcad 16. Ce logiciel permettant de réaliser des calculs scientifiques. Son interface permet de réaliser des rapports, c'est-à-dire des documents formatés qui mêlent des calculs et des textes nécessaires à la compréhension d'un projet d'ingénierie. Avec son interface bloc-notes unique, le logiciel intègre dans une même feuille de calcul les notations, textes et graphiques mathématiques standard. Il contient des fonctions de calcul numérique et de calcul formel (Mathsoft, 2006).

Résultats

4- Résultats

Le présent travail porte sur l'optimisation de la production de la biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* sur diverses sources de carbone, en se focalisant sur la caractérisation de la production de la meilleure biomasse sur milieu à base de l'extrait de dattes, et sur la validation de modèles mathématiques non structurés par l'expérimentation.

4.1- Aspect morphologique de la levure

Une étude morphologique se basant sur l'aspect macroscopique et microscopique a été développée afin de confirmer l'aspect de la levure.

4.1.1- Observation macroscopique

Les caractères macroscopiques de la levure ont été étudiés sur le milieu YPGA le plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). L'observation macroscopique a permis de mettre en évidence l'aspect des colonies, la taille, la forme, le relief et la couleur (figure 8).



Figure 8 Aspect macroscopique de la levure *S.cerevisiae*.

Les colonies apparues sont ; de forme circulaire, de taille moyenne et de couleur blanche.

4.1.2- Observation microscopique

➤ l'état frais

La réalisation de l'état frais nous a permis d'observer la cellule de la levure et le mode de reproduction (Camille, 2007). Le résultat obtenu montre que les cellules sont, plus ou moins sphériques, pourvues d'un noyau, se reproduisant par bourgeonnement (figure 9).

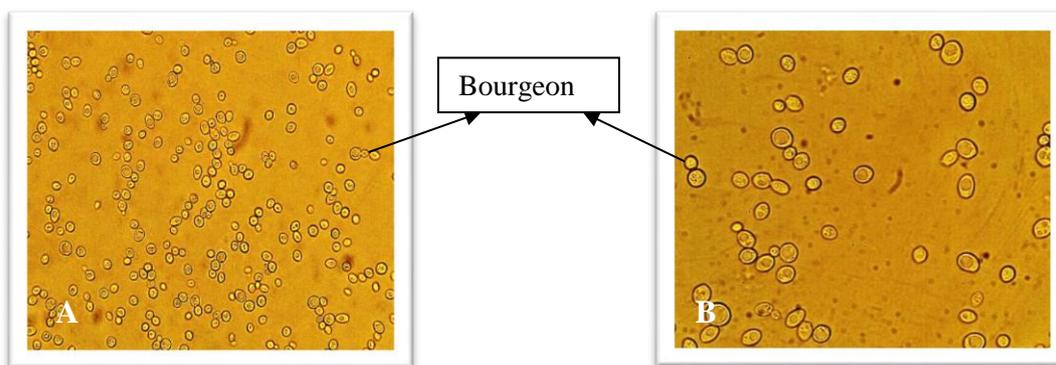


Figure 9 Observation microscopique à l'état frais de la levure aux grossissements GX40 (A) et GX100 (B).

➤ **l'état fixé**

Après avoir effectué une coloration au bleu de méthylène sur la levure, la pigmentation permet de mieux voir la taille et la paroi de la levure, l'observation est effectuée sous microscope optique aux grossissements GX40 et GX100.

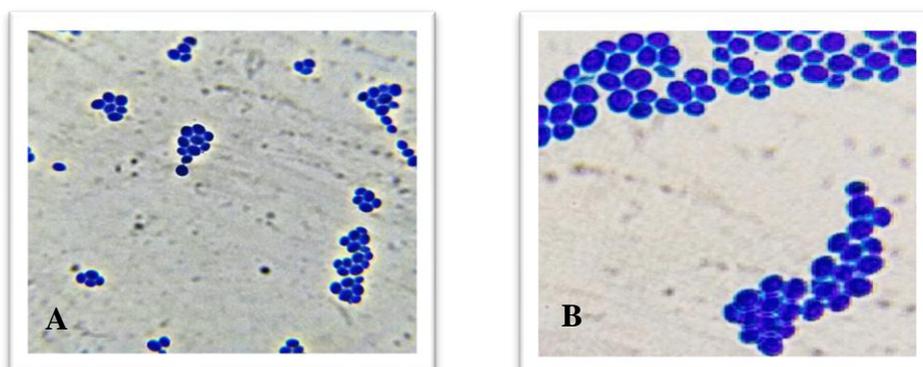


Figure 10 Observation microscopique à l'état fixé de la levure aux grossissements GX40 (A) et GX100 (B).

Les résultats obtenus des deux observations tendent à confirmer que la souche observée répond à la morphologie de *S. cerevisiae*.

4.2- Sélection du milieu de production de la biomasse de *S. cerevisiae*

Les résultats obtenus du test d'assimilation des sucres ont montré que la levure *S. cerevisiae* présente une aptitude à assimiler toutes les sucres testés (figure 11). Cependant, la meilleure production de la biomasse de *S. cerevisiae* est observée dans le cas d'assimilation des hexoses comme le glucose et le fructose que ce soit pures ou contenus dans l'extrait de dattes, suivi de l'inuline, (polysaccharide), composé, lui-même, de polymères de fructose, enfin, de

l'assimilation des disaccharides comme le saccharose et le maltose. En revanche, les autres sucres de type pentose comme l'arabinose et le xylose s'avèrent les moins assimilés par cette levure.

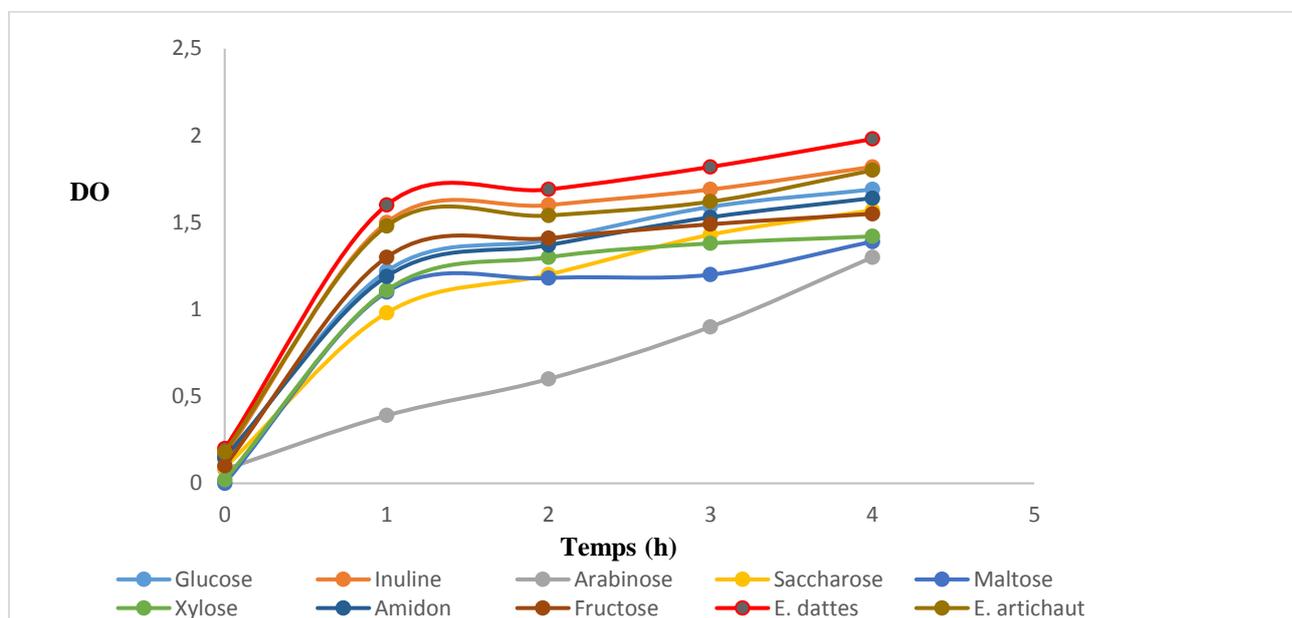


Figure 11 Assimilation des différents sucres par *S. cerevisiae*

Considérant les résultats, concernant la meilleure croissance obtenue sur milieu à base de l'extrait de dattes, qui correspond à une valeur maximale de 2 DO ($2,6 \times 10^7$ cellule/mL) et ce, seulement après 4 heures, il est fortement, intéressant d'exploiter la capacité de la levure à assimiler les sucres contenus dans cet extrait pour la production de la biomasse. Pour ce faire, les expérimentations de caractérisation de production de biomasse sont développées en tenant compte de l'optimisation du milieu de fermentation, ainsi que de la validation des résultats obtenus par l'utilisation des modèles mathématiques non structurés.

4.3- Optimisation du milieu de production

L'optimisation du milieu de production pour obtenir un bon rendement de biomasse est basée sur le plan d'expérience qui tient compte des facteurs d'environnement dans lesquels évoluent la biomasse de la levure en particulier ; le substrat et les conditions d'incubation.

La méthode de composite centré est appliquée pour déterminer les conditions optimales de la température, du pH, de la concentration des sucres totaux et, aussi, de l'interaction entre ces paramètres, sur la production de la biomasse. En effet, 3 variables sont testées, utilisant 20 expériences.

4.3.1- Estimation des effets

Afin de déterminer la concentration de biomasse en fonction des facteurs étudiés, un critère, appelé réponse (Y_i , régression multiple) (équation 1), a été déterminé et qui, signifie dans la présente étude, la concentration des cellules (DO).

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

(équation 1)

Avec : X_1 , X_2 et X_3 correspondant à la température, le pH et la concentration des sucres respectivement. Les résultats obtenus concernant la concentration des cellules (DO) entre les valeurs de l'expérimentation et les valeurs estimées par le logiciel **Minitab 16** sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 La concentration des cellules (DO) entre les valeurs de l'expérimentation et les valeurs estimées par le logiciel **Minitab 16**

Nombre d'expérience	X_1	X_2	X_3	Concentration cellulaire (DO)	Réponse estimée (Y_i)
01	-1	-1	-1	0,724	0,722
02	+1	-1	-1	0,481	0,525
03	-1	+1	-1	0,773	0,836
04	+1	+1	-1	0,475	0,631
05	-1	-1	+1	0,854	0,753
06	+1	-1	+1	0,898	0,890
07	-1	+1	+1	0,626	0,636
08	+1	+1	+1	0,707	0,764
09	-1,68	0	0	0,68	0,724
10	+1,68	0	0	0,788	0,666
11	0	-1,68	0	0,782	0,848
12	0	+1,68	0	0,984	0,839
13	0	0	-1,68	0,763	0,634
14	0	0	+1,68	0,723	0,773

15	0	0	0	1,203	1,205
16	0	0	0	1,203	1,205
17	0	0	0	1,203	1,205
18	0	0	0	1,203	1,205
19	0	0	0	1,203	1,205
20	0	0	0	1,203	1,205

Pour ces valeurs le logiciel Minitab 16 a fourni les différents coefficients de l'équation 1 (tableau 8).

Tableau 8 Coefficients de l'équation 1

Termes	Coefficients
β_0	1.205
β_1	-0.017
β_2	-0.003
β_3	0.041
β_{11}	-0.180
β_{22}	-0.128
β_{33}	-0.177
β_{12}	-0.002
β_{13}	0.083
β_{23}	-0.058

Après le remplacement de ces coefficients dans la régression multiple Y_i , l'équation 1, est présentée comme suite :

$$Y_i = 1.205 - 0.017X_1 - 0.003X_2 + 0.041X_3 - 0.180X_1^2 - 0.128X_2^2 - 0.177X_3^2 - 0.002X_1X_2 + 0.083X_1X_3 - 0.058X_2X_3 \text{ (Equation 2).}$$

4.3.2- Signification des effets

Il est très nécessaire, de déterminer le t de student, le f de ficher, et le coefficient de détermination R^2 , indicateurs permettant d'exprimer la qualité d'une régression donnée.

4.3.2.1- Test de Student

Le test t de **Student** est considéré significatif s'il est, pour un risque donné, significativement différent de 0 d'un côté et supérieur à t_{crit} de l'autre côté. Une table de **student** à $v = n - p$ degrés de liberté dont, n est le nombre d'expériences réalisées et p le nombre d'effets (Annexe) a été utilisée pour déterminer la valeur t_{crit} (tableau 9) .

Tableau 9 Test de Student

Termes	Coefficients	t_i	Valeur critique
β_0	1.205	28.818	$t_{crit}(\alpha, v)$ pour (0.05 ; 10) égale à 2.23. (Annexe 3)
β_1	-0.017	-0.616	
β_2	-0.003	-0.098	
β_3	0.041	1.488	
β_{11}	-0.180	6.680	
β_{22}	-0.128	4.730	
β_{33}	-0.177	6.562	
β_{12}	-0.002	0.059	
β_{13}	0.083	2.300	
β_{23}	-0.058	1.596	

L'analyse des résultats montre que, les valeurs de t_i pour la plupart des coefficients sont différentes de 0, et supérieur à la valeur critique, ce qui indique la signification du test.

4.3.2.2- Analyse de la variance (ANOVA)

L'analyse de la variance ANOVA du modèle de régression multiple est aussi nécessaire pour tester la signification et la pertinence du modèle, en effet, le modèle est considéré valide si, la valeur de **F** du modèle est supérieure à la valeur de **F**(Fisher) tabulée (Annexe 4) et ce, pour un certain nombre de degrés de liberté.

Un autre paramètre **P** a été estimé par le logiciel Minitab (tableau 10), pour vérifier toujours la signification du modèle, et qui désigne la valeur relative du modèle pour une régression quadratique, en effet, si les valeurs de **P** pour une régression quadratique est très faible (proche de 0), le modèle est considéré significatif.

Tableau 10 Analyse de variance (ANOVA)

Source	Degrés de liberté	F	P
Régression (modèle)	9	11.44	0.000
Linéaire	3	0.87	0.490
X ₁	1	0.38	0.552
X ₂	1	0.01	0.924
X ₃	1	2.21	0.168
Quadratiques	3	30.83	0.000
X ₁ ²	1	44.62	0.000
X ₂ ²	1	22.37	0.001
X ₃ ²	1	43.06	0.000
Interactions	3	2.61	0.109
X ₁ X ₂	1	0.00	0.945
X ₁ X ₃	1	5.29	0.044
X ₂ X ₃	1	2.55	0.141

L'analyse des résultats montrent que la valeur du **F** calculée est beaucoup plus grande que la valeur de **F** tabulée soit : $F=150.88 \gg F_{(p-1, n-p)} = F_{(9, 10)} \text{ tabulée} = 3.02$, ainsi que les valeurs de **P** pour un effet quadratique sont négligeables, Ceci suggère que le modèle est hautement significatif.

4.3.2.3- Détermination de R^2

Le coefficient de détermination R^2 est aussi un indicateur qui permet d'exprimer la qualité d'une régression multiple donnée. Lorsque sa valeur est proche de 1, implique que la réponse du modèle prédit est meilleure.

L'équation 1, présentée précédemment ayant donné un coefficient de détermination élevé, $R^2 = 0,911$ (déterminé par le logiciel **Minitab**). Ceci explique l'adéquation entre le modèle et les données observées (résultats expérimentaux).

Sur la base des résultats obtenus le modèle utilisé (équation 1) permet de modéliser correctement l'impact des différents paramètres (pH, TP et concentration en sucres totaux) sur la réponse étudiée [concentration des cellules (DO)].

4.3.3- Etude de la réponse

4.3.3.1- Détermination de la surface et des contours de réponse

Afin de déterminer qualitativement, l'intervalle des surfaces et des contours de réponse, pour obtenir les conditions optimales, l'équation de régression multiple (équation 2) a été intégrée dans le logiciel Minitab et ce, après la sélection du paramètre *Design surface*. La figure 12 illustre la représentation graphique des surfaces et des contours de réponse (DO).

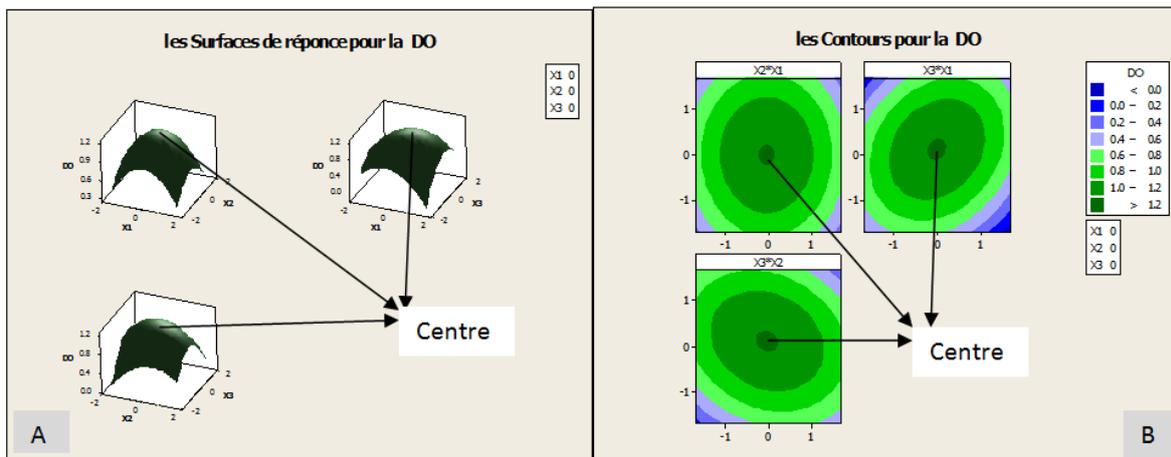


Figure 12 Représentation graphique des surfaces (A), et des contours (B), de réponse (DO)

L'analyse de ces résultats montre que l'optima des trois facteurs utilisés X_1 , X_2 , X_3 (TP, pH, concentration en sucres totaux) sur la réponse (DO) est fixé au centre 0 du domaine (figure 12).

4.3.3.2- Optimisation de réponse

Les représentations graphiques des contours et des surfaces de réponse étudiés précédemment ne permettent pas de déterminer exactement les meilleures conditions qui peuvent influencer la DO, de ce fait, une recherche quantitative des valeurs d'optima a été réalisée (figure 13).

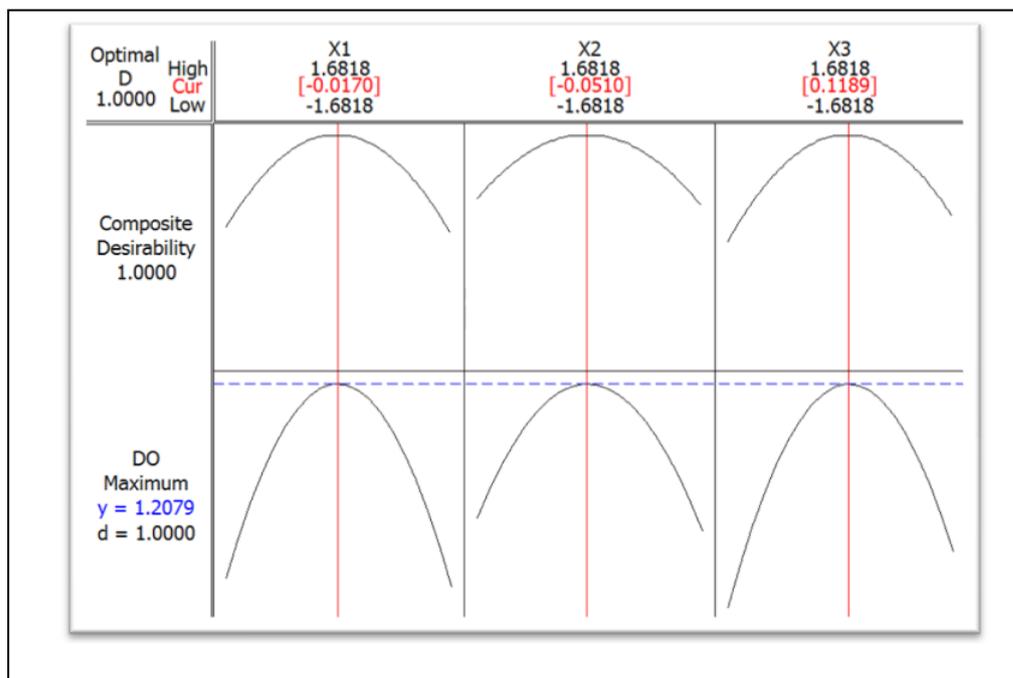


Figure 13 Recherche d'optima pour la réponse (DO)

La figure illustre la maximisation de la DO dont, Les lignes pointillées verticales localisent l'optimum pour les X_i (facteurs) et y réponse correspond à la valeur optimale de la concentration cellulaire (DO). Les intersections entre les courbes de réponses et la ligne pointillée horizontale représentent graphiquement les valeurs optimales qui sont codées comme suit (-0.017), (-0.051), (0.119) (figure 13), la transformation des valeurs codées en valeurs réelles pour obtenir les différentes conditions optimales est illustrée par le tableau 11.

Tableau 11 Signification des valeurs codées et valeurs réelles

	La température	Le pH	La concentration en sucre initiale
Valeurs codées	-0.017	-0.051	0.119
Valeurs réelles	32.9	5.4	115.05

Ce résultat montre que la concentration des cellules (DO) est maximale (1.208) (tableau 11) pour une température de 32,9°C, un pH de 5.4 et une concentration en sucre initiale de 115.05 g/L. d'après le modèle utilisé, ces conditions sont choisies pour obtenir un bon rendement de la biomasse de *S. cerevisiae*.

4.4- Production de la biomasse en fiole

Dans le but de s'assurer du développement du *S. cerevisiae* sur milieu submergé et de confirmer sa production de biomasse, des cultures en fioles de 250 mL, contenant 100mL de milieu de culture à base de l'extrait de dattes comme source de carbone, sont lancées. La concentration des sucres et la production de la biomasse par *S. cerevisiae* sont des éléments mesurables informatifs de la cinétique de la production. Les résultats de l'évolution de ces éléments pendant le temps, sont présentés dans la figure 14.

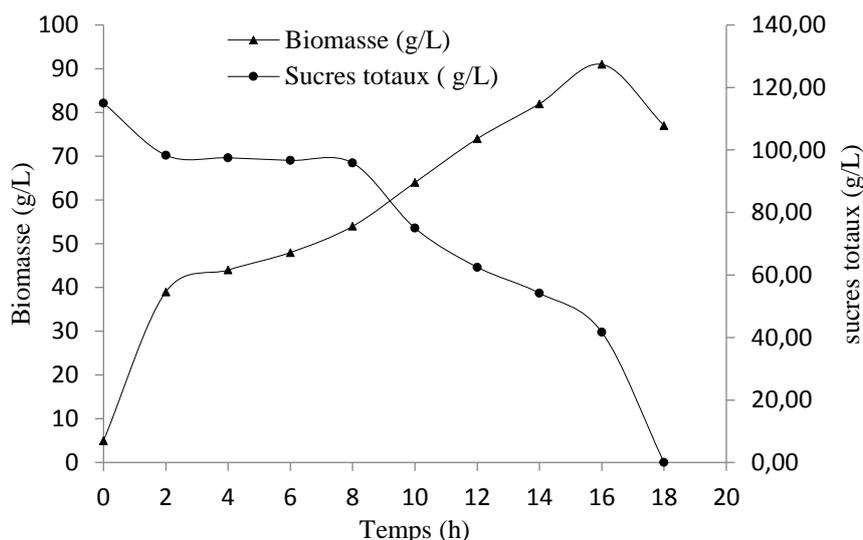


Figure 14 Evolution de la biomasse de *S. cerevisiae* pendant le temps

Il apparaît que la concentration des sucres dans le milieu de fermentation régresse progressivement pendant les 16h de fermentation, par contre, la production de la biomasse augmente jusqu'elle atteint le maximum (91 g/L) à 16h. Cet état signifie qu'il y a eu transformation des sucres en biomasse (bioconversion) via le processus de respiration. Après 16h de fermentation, les sucres sont complètement consommés, et la concentration des cellules commence à régresser. Dans ces conditions, le rendement de la production de la biomasse par *S. cerevisiae*, $Y_{X/S}$, sur milieu à base de l'extrait de dattes est de 0,7g biomasse/g substrat.

4.5- Modélisation

Des modèles mathématiques correspondant au processus biotechnologique de la production de la biomasse par *S. cerevisiae* sont implémentés pour simuler le fonctionnement de ce phénomène. Les modèles utilisés permettant de déterminer les valeurs du taux de croissance maximal ainsi que les valeurs estimées (K_s et X_{max}).

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 effet, une bonne adéquation des profils montre que ces modèles sont acceptables pour prédire le processus de production de la biomasse par *S. cerevisiae*.

4.7.1- Résolution des équations

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, les modèles de *Monod*, de *verhulst* et de *logistique* sont appliqués pour simuler la croissance de *S. cerevisiae* (les modèles les plus répondus). Il est intéressant, de noter que ces modèles prennent 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 linéaire de *linweaver-Burk* et la méthode de Levenberg-Maquardt (Maquardt, 1961).

4.7.1.1- Modèle de Monod

L'équation de Monod (équation 1) est utilisée pour obtenir les valeurs maximales du taux de μ_{max} et de K_s . La linéarisation de cette équation donne la droite $\frac{1}{\mu}$ en fonction du $1/S$

Selon Monod :

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

L'inverse de l'équation de Monod donne :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} \cdot \frac{S + K_S}{S} \dots \dots (2)$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \dots \dots (3)$$

La relation (3) est l'équation d'une droite de type $\frac{1}{\mu} = F \left(\frac{1}{S} \right)$ dont la pente est égale à $\frac{K_S}{\mu_{max}}$, et

l'ordonnée à l'origine $\frac{1}{\mu_{max}}$ (Figure 15)

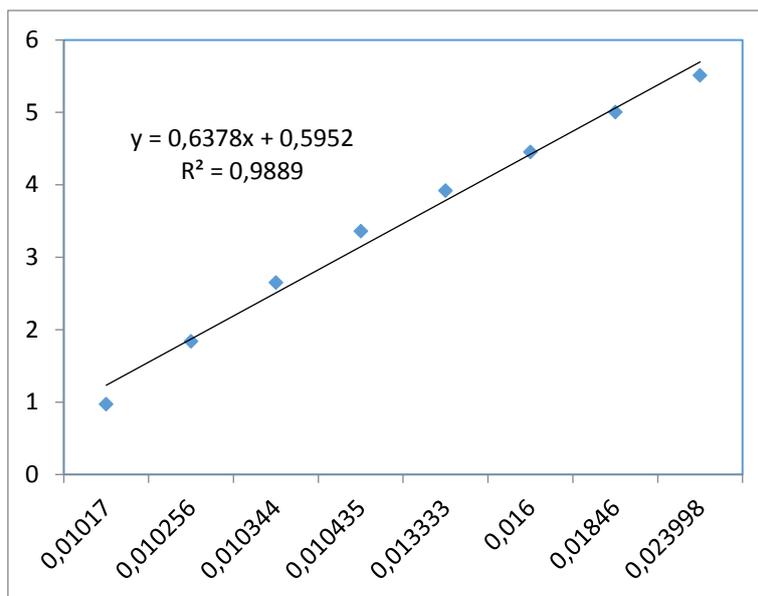


Figure 15 Méthode de *linweaver-Burk* pour estimer μ_{max} et K_s

La méthode linéaire a fourni les valeurs suivantes :

$\mu_{max} = 1.68$, $K_s = 1.07$ avec un coefficient de détermination $R^2 = 0.988$, en effet ce dernier confirme que cette méthode est hautement fiable pour valider les résultats de l'expérimentation.

2-Modèle de Verhulst

Le modèle de verhulst (équation 4) est résolu par l'utilisation de la méthode de Levenberg-Maquardt qui permet de transformer le modèle décrit ci-dessous (equation4) en équation linéaire $\mu_i = f(t_i)$ et ce, par l'utilisation de logiciel mathcad. La figure illustre l'adéquation entre les valeurs du modèle et les résultats expérimentaux.

$$\mu := \mu_m \cdot \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) \dots\dots\dots 4$$

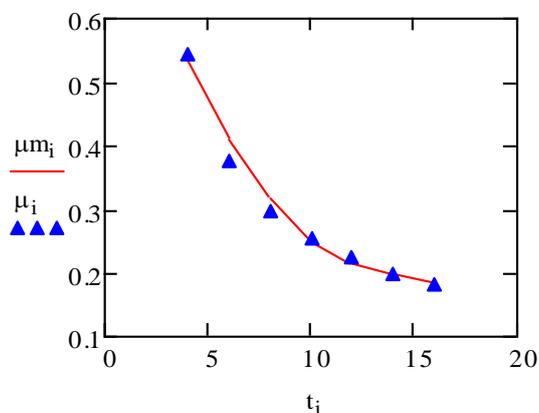


Figure 16 Evolution du taux de croissance pendant le temps entre les données expérimentales, et les données prédites par le modèle de Monod.

La méthode linéaire de Levenberg-Maquardt a fourni les valeurs suivantes :

$\mu_{\max} = 0.1148$, $X_m = 34,53$ avec un coefficient de détermination $R^2 = 0.995$, en effet ce dernier confirme que cette méthode est hautement fiable pour valider les résultats de l'expérimentation.

2- Modèle de logistique

Le modèle de logistique (équation 5) est résolu par l'utilisation de la méthode de Levenberg-Maquardt décrite ci-dessus (modèle de verhulst).

$$X(t) := X_0 \cdot \frac{e^{(\mu_m \cdot t)}}{\left[1 - \frac{X_0}{X_m} \cdot (1 - e^{\mu_m \cdot t}) \right]}$$

La figure illustre l'adéquation entre les valeurs du modèle et les résultats expérimentaux.

Cette méthode donne des valeurs de $X_0 = 5$, $X_m = 91$ avec $R^2 = 0.857$

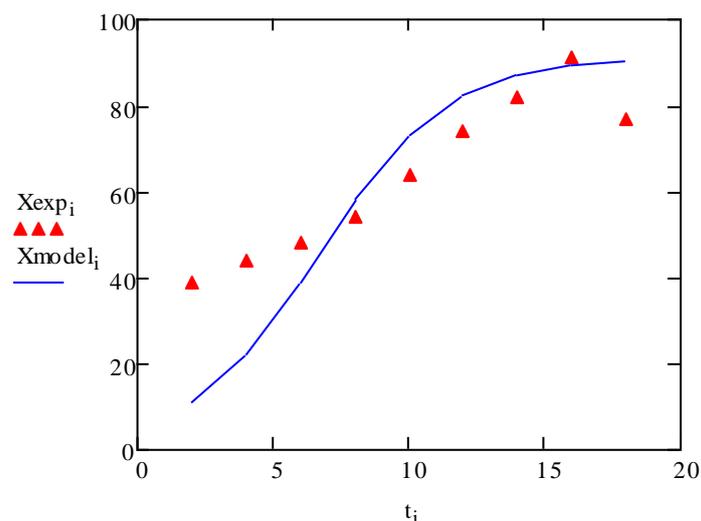


Figure 17 Evolution de la croissance pendant le temps entre les données expérimentales ($\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$) et les données (—) prédites par le modèle de logistique

Le coefficient de détermination R^2 obtenu montre que ce modèle est invalide pour valider les résultats de l'expérimentation.

En considérant les résultats de la modélisation, il ressort que le modèle de Monod et le modèle de verhulst sont les plus fiables pour valider le processus de production de la biomasse par la levure *S. cerevisiae*. 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- Discussions

Un grand nombre de produits que nous consommons chaque jour sont issues de l'exploitation des microorganismes dont l'utilisation remonte à la plus haute antiquité (Pierto, 2010). Cependant, il a fallu attendre les découvertes de Pasteur pour voir s'établir les connaissances précises qui ont permis la naissance de l'industrie des fermentations (Vasconcelos *et al.*, 2004). Le développement de cette nouvelle industrie a donné une preuve éclatante du rôle utile des microorganismes (Scenihr, 2006). Dans ce contexte, les levures occupent une place primordiale dans l'industrie alimentaire notamment, dans la panification, la production d'alcool, la fromagerie, la brasserie, dans la production des enzymes et des protéines, du glycérol, certaines vitamines et solvants, (Scriban, 1984 ; Lecterc *et al.*, 1995 ; Verbeken *et al.*, 2003 ; Casey *et al.*, 2007) mais aussi dans la revalorisation de déchets agricoles, industriels et dans la production de la biomasse (Simon et Meunier, 1970), C'est dans cette dernière optique que s'inscrit l'objectif de notre travail qui vise à étudier la production de la biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu optimisé à base de l'extrait de dattes. Cette étude est motivée par l'utilisation des méthodes d'optimisation (plan d'expérience) pour obtenir un bon rendement de biomasse, et par la proposition des modèles mathématiques non structurés pour valider les résultats expérimentaux.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisée, dans ce travail, a été choisie pour plusieurs critères comme, la disponibilité, la croissance rapide, la résistance aux contaminants, la culture facile, le pouvoir fermentaire élevé et surtout la capacité de consommer la plupart des sucres. D'après la littérature, plusieurs auteurs ont évoqué l'utilisation de *S. cerevisiae* comme microorganisme modèle pour la production de plusieurs produits, entre autre, la biomasse (Iranika, 2004 ; Ould El-Hadj *et al.*, 2006 ; Pastor, 2008 ; sheng *et al.*, 2009).

Le test d'assimilation des sucres a montré que la levure *S. cerevisiae* présente une aptitude à assimiler toutes les sucres testés. Cependant, la meilleure production de la biomasse de *S. cerevisiae* est observée dans le cas du milieu à base de l'extrait de dattes. L'étude réalisée par Sébastien *et al.*, en (2007), a décrit la capacité de la levure *S. cerevisiae* à assimiler ces sucres dans les mêmes conditions expérimentales utilisés dans ce travail.

L'utilisation de l'extrait de dattes comme source de carbone constitue un milieu riche en glucides, ce qui justifie notre choix du substrat. Par ailleurs, ce milieu a été utilisé pour la production de biomasse microbienne par plusieurs auteurs (Acourène *et al.*, 2001 ; Ould El-Hadj *et al.*, 2006 ; Boualal *et al.*, 2010).

Afin d'obtenir un meilleur rendement en biomasse, l'optimisation du milieu de fermentation s'avère nécessaire, cette dernière est basée sur une méthode statistique (plan d'expérience), en utilisant la matrice de **composite centré** (Saddler, 1982) pour sélectionner les facteurs influençant la production de la biomasse. D'après notre connaissance, cette méthode n'a jamais été utilisée pour optimiser un milieu de fermentation pour la production de la biomasse microbienne. En revanche, d'autres travaux ont montré que l'optimisation du milieu de fermentation pour la production de la biomasse microbienne et leur métabolites primaires et secondaires est fondée sur d'autres méthodes statistiques utilisant la matrice de Plackett and Burman (1946) (Gervasio *et al.*, 2008 ; Kappeli, 2010 ; Kacem chaouche *et al.*, 2013).

L'utilisation de la régression multiple a permis, à la fois, de sélectionner les conditions optimales (TP, pH, concentration en sucres totaux) et aussi, de l'interaction entre ces paramètres, sur la production de la biomasse et d'optimiser l'équation de régression multiple obtenue, par la détermination de différents tests statistiques (Egorov, 2000).

Dans le présent travail, la production de la biomasse de *S. cerevisiae* sur un milieu de culture de base, composé essentiellement, de l'extrait de dattes comme source de carbone a été réalisée dans des fioles de 250mL. Les résultats obtenus montrent que la concentration maximale de la biomasse était très importante (90g/L), Il est à noter, que la levure est capable de produire une quantité importante de la biomasse via le processus de respiration qui se déroule en deux étapes : la glycolyse et le cycle de Krebs (Gervasio *et al.*, 2008). La première étape se développe entièrement dans le cytosol; le processus indispensable qui prépare à la dégradation de glucose en 3- glycéraldéhyde phosphate, alors que la deuxième étape se déroule au niveau du cycle de Krebs qui sert à former de nombreux précurseurs pour la synthèse de macromolécules de la composition cellulaire (Rose et Harrison, 1971). L'efficacité de cette voie peut se traduire par le nombre de moles d'ATP formées par atome d'oxygène consommé par la quantité de la biomasse formée et du dioxyde de carbone dégagé. 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. Le pyruvate est converti via la pyruvate déshydrogénase vers le cycle de Krebs. Par contre, 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; Ferial-Gervasio *et al.*, 2008).

Les résultats de simulation par des modèles non structurés, permettent de déterminer les valeurs du taux de croissance maximal ainsi que les valeurs estimées (K_s et X_{max}). Pour un choix approprié des modèles, une bonne correspondance 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 bonne correspondance quantitative entre les profils de l'expérience et les profils de simulation pour les modèles de **Monod** et **verhulst**, 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) et Shafaghat *et al.*, (2009) qui ont examiné l'application du modèle de Monod et le modèle de verhulst pour simuler une fermentation en *fed-batch* de *Klebsiella pneumoniae* et aussi une fermentation en batch de *S. cerevisiae* (Soto-Cruz, 2002). Par contre, l'utilisation, ici, du modèle de logistique pour simuler le processus de production de la biomasse par *S. cerevisiae* montre que le coefficient de détermination R^2 est très faible ce qui suggère que ce modèle est invalide pour approuver les résultats de l'expérimentation. En effet, une étude similaire démontre que la simulation de processus de production de biomasse microbienne par l'utilisation du modèle de logistique est restée limitée et non significative (Fillon, 1996 ; Virginie *et al.*, 2001 ; Van-Leare, 2002).

*Conclusion et
perspectives*

6- Conclusion et perspectives

Deux aspects principaux sont visés dans le présent travail, le premier est l'optimisation de la production de la biomasse par la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le seconde est la simulation de processus par des modèles d'optimisation non structurées.

Plusieurs sucres ont été testés pour l'objectif de produire de la biomasse par la levure *S. cerevisiae*, en l'occurrence, des monosaccharides (Xylose, Arabinose [Pentoses], Glucose, Fructose [hexoses]) ; des disaccharides (Maltose et Saccharose), des polysaccharides (Amidon et inuline) et l'extrait de dattes et de l'artichaut. Les résultats obtenus montrent que les meilleurs taux de production de biomasse ont été observés dans le cas de l'extrait de dattes.

Il a été conclu de cette partie, que l'extrait de dattes peut constituer un milieu conventionnel pour la production de la biomasse de *S. cerevisiae* pour obtenir un rendement meilleur.

Dans le but de sélectionner les conditions optimales à savoir ; la température, le pH, et la concentration en sucres totaux pour la production de la biomasse, la méthode de composite centré a été appliquée. Les résultats obtenus montrent que la concentration maximale de la biomasse était très importante (90g/L) et ce, dans des conditions optimales du pH(5,4) ; de température (32,9° C) et de concentration initiale en sucres (115g/l).

Le peu de travaux publiés concernant l'optimisation du milieu de fermentation par l'utilisation de la matrice composite centré montrent que cette dernière, est une première dans ce travail.

La modélisation dans cette étude, a permis d'appréhender la croissance de la biomasse par l'utilisation des différents modèles mathématiques non structurés (Modèle de **Monod**, de **Verhulst** et de **Logistique**). Pour un choix approprié des méthodes d'optimisation, une bonne correspondance quantitative des profils obtenus par notre simulation en comparaison avec les résultats expérimentaux a été notée dans le cas du modèle de **Monod** et de **Verhulst**.

Il a été conclu de cette partie que ces modèles sont valides pour attribuer les résultats obtenus dans le présent travail.

A la lumière de ce travail plusieurs points peuvent se constituer en perspectives :

- 1- Application des résultats pour des fermentations en scale up ;
- 2- Utilisation d'autres variétés de dattes pour cet objectif ;
- 3- Utilisation des modèles structurés pour mieux valider le *processus*.

*Références
Bibliographiques*

10- Références bibliographiques

Aguilar Uscanga, B.R., (2003). Influence des paramètres de croissance et des conditions de mise en oeuvre sur la composition et l'architecture de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse INSA Toulouse.

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), pp 18842 - 18846.

Al-Farsi, M., Moris, A., Baron, M., (2009). Functional Proprietes of dates (*Phoenix dactylifera*). *Acta Horticultrae* 736, pp 479-484.

Allison, P.D., (1999). Logistic regression using SAS system: theory and application. Cary, NC, USA: SAS Institute.

Bauer, W., et Rartz, E., (1992). Fermentation et Technologie enzymatique. Lausanne, pp 62.

Belguedj, M., (2001). Caractéristiques des cultivars de dattiers dans les palmeraies du Sud-Est Algérien, N° 11, INRAA. El-Harrach, Alger, pp 289.

Belguedj, M., (2002). Caractéristiques des cultivars de dattiers dans les palmeraies du Sud-Est Algérien, N° 11, INRAA. El-Harrach, Alger, pp 289.

Bento, A., Kanbur, R., et Leard, B. (2012). Super- Additionality: A Neglected Force in Markets for Carbon Offsets. Discussion Paper. CEPR.

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.

Biotechnol. 3, pp 195–216.

Blachere, H., Corrieu, G., Peringer, P., et Lane, A.G. (2009). A generalized mathematical model for the growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* with experimental determination of parameters. *Biotechnol Bioeng.* 16: pp 431–454.

- Blin, C.P., (2002). Etude comparative du catabolisme de l'acide ricinoléique chez les levures du genre *Sporidiobolus* : mise en évidence et caractérisation du système bêta-oxydase impliqué. Thèse de doctorat. *Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation*. Université de Bourgogne, France.
- Blom, J., Mattos, M.J.T.D., et Grivell, L.A., (2000). Redirection of the Respiro-Fermentative Flux Distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by Overexpression of the Transcription Factor Hap4p. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, pp 1970 - 1973.
- Boudrar, C., Bouzid, L., et Nait larbi, H., (1997). Etude des fractions minérale et glucidique de la datte *Deglet-Nour* au cours de la maturation. Mémoire d'Ingénieur, INA. El-Harrach. Alger, pp 60.
- Bouguettoucha, A., Balanec, B., Nacef, S., Amrane, A., (2007). « A generalised unstructured model for batch cultures of *Lactobacillus helveticus* », *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 41, pp 377 - 382.
- 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, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3, pp 206 - 229.
- 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, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3, pp 206 - 229.
- Bouix, M., Leveau, J.Y., (1993). Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Technique et documentation-Lavoisier-Apria. Paris, pp 523.
- Bourgeois, C. M., Larpent, J., (1996). Microbiologie alimentaire. Vol II: Aliments fermentés et fermentation alimentaire. (Ed) Lavoisier. Paris, pp 523.
- Brant, R., (1990). Assessing proportionality in the proportional odds model for ordinal logistic regression. *Biometrics*, 46, pp 1171 - 1178.
- Camille, D., (2007). *Microbiology pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition Lavoisier, pp 128-129.
- Casey, A., Herzog, E., Davoren, M., Lyng, F., Byrne, H., and Chambers, G. (2007). Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon*, 45 :1425–1432.

- Chibane, H., Benamara, S., Noui, Y., Djouab, A., (2007). Some Physicochemical and Morphological Characterizations of Three Varieties of Algerian Common Dates. *European Journal of Scientific Research*. 18 (1): pp 134-140.
- 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, pp 125 - 137.
- Dekker, M., (1985). *Theory of Nonlinear Age-Dependent Population Dynamics*. New York.
- Djerbi, M., (1994). Précis de phoéniculture. FAO, pp 192.
- Egorov, S.N., Semenova, I.N., Maksimov V.N., (2000). Mutual effect of invertase and phosphatase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on their secretion into culture media. *Mikrobiologia*; 69:34-37.
- Estanove, P., (1990). Note technique : Valorisation de la datte. In Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens. Ed. CIHEAM., pp 301 - 318.
- Ethanol Productivity of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 24860 on Various Carbon Sources. FAO, (2007). Date palm production. www.fao.org/docrep/t0681E/t0681E00.htm.
- 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).
- Flikweert, M.T., Kuyper, M., Van Maris, A.J., Kötter, P., Van Dijken, J.P., and Pronk, J.T, (1999). Steady-state and transient-state analysis of growth and metabolite production in a *Saccharomyces cerevisiae* strain with reduced pyruvate-decarboxylase activity. *Biotechnol. Bioeng*. 66, pp 42 - 50. *Gene. Applied Biochemistry and Biotechnology* 84–86, 247–254. Growth. *Biotechnol Bioeng*. 17: 943–964.
- 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.
- Gilles P., (2010). Cultiver le palmier dattier .Ed. CIRAS, p 110.
- Guiraud, J., Galzy P., (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed. Les éditeurs de l'Usine Nouvelle. Paris, pp 236.
- Guiraud, J., Galzy P., (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris, pp 615.

- Guiraud, J.P., (1996). Microbiologie alimentaire. (Ed) Dunod. Paris, pp 9 - 320.
- Guiraud, J.P., (1996). Microbiologie alimentaire. (Ed) Dunod. Paris, pp 9 - 320.
- Hurteau, P. et Simon Tremblay-Pépin, Doit-on privatiser la SAQ?, Institut de recherche et d'informations socio-économiques, Montréal, avril 2015, p. 17-18.
- inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*. 604:81–87.
- Iranica, J., (2004). Journal of Energy & Environment 5 (1): ISSN 2079-2115. IJEE an Official Peer Reviewed Journal of Babol Noshirvani University of Technology.
- Jackson, J.V., et Edwards, V.H., (1975). Kinetics of substrate inhibition of exponential yeast
- Kappeli, O. (2010). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Advan. Microbial Physiol.* 28:181-209.
- Kendri, S., (1999). Caractéristiques biochimiques de la biomasse "*Saccharomyces cerevisiae*" produite à partir des dattes "Variété Ghars". Mémoire d'Ingéniera. Département d'agronomie. Batna. pp 51.
- Kreger –Van, Rij N.J., (1984). The yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical.
- Larpent, J.P., (1990). Biotechnologie des levures masson, Paris, pp 132 - 315.
- Larpent, J.P., (1991). Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris, pp 426.
- Larpent, J.P., Gourgoud, M., (1985). Elément de microbiologie. Ed.Herman. Paris, pp 464.
- Leclerc H., Meyer A., et Deiana J., (1995). Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et Techniques. doin éditeurs, Paris. p : 73 - 92.
- Lee C.W., Chang H.N., (1987). Kinetics of ethanol fermentations in membrane cell recycle fermentors. *Biotech. Bioeng.* 29: 9, pp 1105 - 1112.
- Lee, J.M., Pollard, J.F., et Coulman, G.A., (1983). Ethanol fermentation with cell recycling: Computer simulation. *Biotechnol Bioeng.* 25: P 497 - 511.
- Lei, F., Rotboll, M., et Jorgensen, S.B., (2001). A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol.* 88, pp 205 - 221.
- Leveau J.Y., et Bouix M., (1999). « Bio-ingénierie », In : Scriban R., « Biotechnologie», 5ème édition, Edition Technique & Documentation, Paris, pp 229 - 310.

- 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, pp 627 - 642.
- Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, C.F., Hahn-Hagerdal, B. et Jonsson, L.F. (2012). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xyloseutilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.* 31: 274–282.
- Masmoudi, N., (2000). Essai de production de biomasse "*Saccharomyces cerevisiae*" à partir des dattes "Ghars". Mémoire d'Ingénieur. Département d'agronomie. Batna, pp 52.
- Mercier, C., (1997). Transgènes et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à de fins nutritionnels. In : Frened G. (Ed), intérêts nutritionnels et diététique du lait de chèvre. Nord-France, pp 169 - 177.
- Monod, J., (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann et Cie, Paris, France.
- Moser, F.A., (1983). Formal macro-approach to bioprocess modeling with analogies. *Acta*
- 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: pp 63 – 68.
- Nielsen, J., Nikolajsen, K., Villadsen, J., (1991). « Structured modelling of a microbial system: A theoretical study of lactic acid fermentation », *Biotechnology Bioengineering*, vol. 38, pp 1 - 10.
- Nishiwaki, A., et Dunn, I.J., (1999). Analysis of the performance of a two-stage fermentor with recycle for continuous ethanol production using different kinetic models. *Bioch. Eng. J.* 4, pp 37 - 44.
- Norton, S., Lacroix, C., Vuilleumard, J.C., (1993). « Effect of pH on the morphology of *Lactobacillus helveticus* in undissociated-cell batch and immobilized-cell continuous fermentation », *Food Biotechnology*, vol. 7, pp 235 - 251.

- O'Connell, A., (2000). Methods for modelling ordinal outcome variables. *Meas. Eval. Counseling Dev.*, **33** (3), pp 170 - 193.
- Oteng-Gyang, K., (1984). Introduction à la microbiologie ans les pays chauds. Ed. Lavoisier. Paris, pp 43 - 46.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N., et Jose, D., (2009). Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol.* 81: pp 35–52.
- Parrou, J.L., Teste, M.A., et François, M., (1997). Effect of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*, 143; pp 1891 - 1900.
- Pattey, E., et De Jong, R., (1998). Biological Systems Modelling Workshop (Preface/Avant-Propos) *Can. J. Soil Sci.*, 78(3); pp 407 - 408.
- 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.
- Phaff, H.G., Miller, M.W., et Mrak, E.K., (1968). The life of yeasts. *In*: Oteng-Gyang K. Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. *Technique & Documentation Lavoisier*, Paris. 8; pp 43.
- Pinta, M., (1979). Spectrométrie d'absorption atomique Tome 1, Problèmes généraux. Masson, Paris, pp 696. ISBN: 2-225-64020-3.
- Piret, S.J., (1988). Reflection on the dynamics of growth and product formation in microbial cultures. *Dans: Horiz Bioch Eng.* (3); pp 155 - 160.
- Pol, D., (1996). Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire.ellipses édition marketing S.A, Paris. 15, pp 20 - 38; 42 - 57; 141 - 151.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., Claire, M., Bacq, C. et Dusart, J. (2007). Microbiologie. (Edn). De Boeck pp: 492. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. Role of the URE2.
- Prieto, L. (2010). Environmental control of phase transition and polyp survival of a massive-outbreaker jellyfish. *PLoS ONE* 5, e13793.
- Rose, A.H., et Harrison, J. S., (1971). *The yeast*. Vol. 4, 2ème édition, pp 297 - 345.

Roukas, T., (1994). Ethanol production from nonsterilized carbon pod extract by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. *Biotech. bioeng.* 43 : 3, pp 189 - 194.

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.

Scenihr. (2006). The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. Technical report, Comission Européenne.

Scriban, R., (1984). *Biotechnologies*. 2^{ème} édition. Techniques et Documentation-Lavoisier. Paris, p: 531.

Scriban, R., (1993). *Biotechnologie*. (4^{ème} Ed) Technologie et documentation - Lavoisier. Paris, pp 886.

Scriban, R., (1999). *Biotechnologie*. (5^{ème} Ed) Technique et documentation- Lavoisier. Bruxelles, Londres, New-York, pp 1017.

Scriban, R., (1999). *Biotechnologie*. (5^{ème} Ed) Technologie et documentation - Lavoisier. Paris, pp 1017.

Sébastien, N., Ronkart, A., Christophe, S. et Micher, P. (2007). Isolation and identification of

Shafaghat, H., Najafpour, G.D, Rezaei, P.S. et Sharifzadeh, M. (2009). Growth Kinetics and

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.

Silveira, M.C., Oliveira, E.M., Carvajal, E. & Bon, E.P. 2000 Nitrogen

Silveira, M.C., Oliveira, E.M., Carvajal, E., Bon, E.P., (2016) Nitrogen regulation of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. Role of the URE2 gene. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84–86, 247–254.

Simon, R., et Meunier, P., (1970). *Microbiologie industrielle et Génie biochimique*. (Ed) Masson et Cie. Paris, pp 559.

Singleton, P., (2005). *Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies*, cours, (6^e édn), Dunod.

- Smeets, E., Junginger, M., Faaij, A., Walter, A., Dolzan, P., Turkenburg, W., (2016), "The sustainability of Brazilian ethanol – An assessment of the possibilities of certified production", in *Biomass and Bioenergy*, Volume 32, Issue 8, pp. 781-813.
- Soltani H., (2014). Etude comparative de la composition biochimique de trois types d'extrait de dattes: Datte molle "Ghars", Demi-molle "Deglet-Nour" et Sèche "MecDegla". Mémoire d'Ingénieur. Département d'Agronomie. Batna, p 57.
- 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.
- Suarit, R., Gopal, P.K., et Sherped, M.G., (1988). Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol*, 134, pp 2359 - 2368.
- Thuriaux, P., (2004). Les organismes modèles : "la levure" .Ed. DECLIN. Paris, pp 1- 144.
- Tortora, G.J., et Anagnostakos, N.P., (1987). Principes d'anatomie et de physiologie. Ed. INC, 5 ème édition, pp 688 - 693.
- Touzi, A., (1997). Valorisation des produits et sous-produits de la datte par les procédés biotechnologiques. Rapport de synthèse de l'atelier « Technologie et qualité de la datte », CIHEAM - Options Méditerranéennes, pp 214.
- 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 Uden, N., et Fell, J.W., (1968). *Advances in Microbiology of the Sea*. Academic Press, New York. 1, pp 167 - 201.
- Vasconcelos, J.N., Lopes, C.E., França, F.P., (2004). Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. *Brazilian Journal of chemical engineering.* 21: 3, pp 357 - 365.
- Verbeken, D., Dierckx, S., and Dewettinck, K. (2003). Exudate gums: occurrence, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63(1) :10–21.
- 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.*
- Ward, O.P., (1989). *Fermentation biotechnology, principles, processes and products*. Prentice Hal, New Jersey, USA.

Warren, R.K., Hill, G.A., MacDonald, D.G., (1994). Continuous cell recycle fermentation to produce ethanol. *Food and bioproducts processing*. 72: 3, pp 149 - 157.

World Appl Sci J. 7(2): 140-144.

Yoshida, M., Hirao, M., Yokobayashi, Y., Shiosaka, M., Sugimoto, K., (1973). Process for preparing low molecular weight amyloses. (Hayashibara Company) UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE GRANTED PATENT, May 1973 patno: US3730840.

Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., DUPORT, C., (2015) Anaerobic cells of *S. cerevisiae* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Archives of Microbiology* 185, 222-233.

Annexe 1

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

Extrait de levure.....10g/L

Glucose20g

Peptone10g

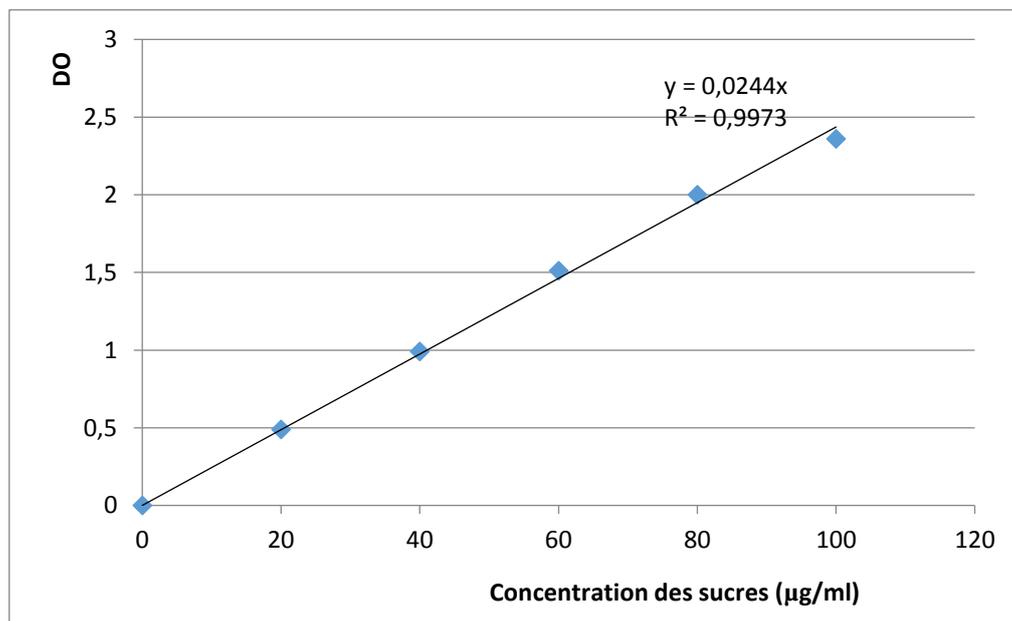
Agar.....15- 20 g

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

Annexe 2

➤ Courbe d'étalonnage

" La courbe d'étalonnage représente la concentration des cellules (D.O) en fonction des différentes concentrations du glucose".



Annexe 3**➤ Table de Student**

	Risque 5%	Confiance 95%
DDL	t(crit)	t(crit)
1	12.70	63.66
2	4.30	9.33
3	3.18	5.84
4	2.78	4.60
5	2.57	4.03
6	2.45	3.71
7	2.37	3.50
8	2.31	3.36
9	2.26	3.25
10	2.23	3.17
11	2.20	3.11
12	2.18	3.06
13	2.16	3.01
14	2.15	2.98
15	2.13	2.95
16	2.12	2.92
17	2.11	2.90
18	2.10	2.98
19	2.09	2.86
20	2.08	2.85

Annexe 4

➤ Table de Fischer

	v_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
v_2														
1		161	199.5	215.70	224.6	230.2	234	236.8	239	240.5	241.9	243.9	245.9	248
2		18.5	19.00	19.16	19.25		19.33	19.35	19.4	19.36	19.4	19.41	19.43	19.45
3		10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.7	8.66
4		7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.40	6	5.96	5.91	5.86	5.8
5		6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.98	4.62	4.56
6		5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87
7		5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44
8		5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.5	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15
9		5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94
10		4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.70	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77
11		4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65
12		4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54
13		4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.6	2.53	2.46
14		4.6	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39
15		4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33
16		4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28
17		4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23
18		4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19
19		4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16
20		4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12
21		4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10
22		4.3	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.223	2.15	2.07
23		4.28	3.42	3.03	2.8	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.2	2.13	2.05
24		4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03
25		4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01
26		4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99
27		4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97
28		4.2	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96
29		4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.1	2.03	1.94
30		4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93
40		4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84
60		4.00	3.15	2.76	2.53	2.3	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75
120		3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66
Inf- ini		3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.95	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57

Abstract

A comprehensive study on the production of biomass *S. cerevisiae* on medium optimized based on the date's extract as the sole carbon source was performed in order to obtain a good yield of biomass.

The selection of the factors influencing the production of biomass was conducted using the central composite design. Under optimal conditions of production of biomass, i.e; date's extract (115g / L), pH (5.4) and temperature (32.9 ° C), *S. cerevisiae* produced in vials, 91 g / l of biomass and this after only 16 h of fermentation.

Mathematical models corresponding to the biotechnological process of biomass production from *S. cerevisiae* have been implemented to simulate the fermentation phenomenon. Simulation results are used to determine the values of the maximum growth rate and the estimated values (K_s and X_{max}). For an appropriate choice of model simulation methods, a good quantitative correspondence is noted for Monod model and verhulst model.

Keywords : Biomass, *S. cerevisiae*, date's extract, Optimisation, Modélisation.

المخلص

الدراسة المعمقة لإنتاج الكتلة الحيوية لخميرة *S. cerevisiae* على وسط معدل أساسه مستخلص التمر في مصدر وحيد للكربون تم إنتاجها لأجل الحصول على مردود جيد من الكتلة الحيوية.

تم انتقاء العوامل التي لها تأثير على إنتاج الكتلة الحيوية حسب الدراسة الإحصائية باستعمال المصفوفة (composite) (centré).

في الظروف المعدلة لإنتاج الكتلة الحيوية نخص بالذكر مستخلص التمر (115 g/l) درجة الحرارة (32,9°C) درجة الحموضة (5,4) تمكنت الخميرة *S. cerevisiae* من إنتاج 91g/l من كتلتها الحيوية وهذا خلال 16h فقط من التخمر.

أدمجت معادلات رياضية من أجل التنبؤ بظاهرة إنتاج الكتلة الحيوية لهذه الخميرة، النتائج المحصل عليها سمحت بتعيين نسبة النمو القصوى (μ_{max}) والقيم المقربة X_m ، K_s .

الاختيار المناسب للطرق التحليلية لهذه المعادلات أثبتت توافق جيد للنتائج المحصل عليها تجريبيا وهذا بالنسبة لمعادلة Monod ومعادلة Verhulst.

الكلمات المفتاح: الكتلة الحيوية، *S. cerevisiae*، مستخلص التمر، Modélisation، Optimisation.

*Etude de la production de la biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu optimisé à base de l'extrait de dattes déclassées*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie fongique

Une étude approfondie sur la production de la biomasse de *S. cerevisiae* sur milieu optimisé à base de l'extrait de dattes comme seule source de carbone a été réalisée dans le but d'obtenir un bon rendement de la biomasse.

La sélection des facteurs influençant la production de la biomasse a été effectuée selon la méthode statistique du Plan d'expérience, en utilisant la matrice de composite centré. En effet, dans des conditions optimales de production de la biomasse, en l'occurrence, l'extrait de dattes (115g/L), le pH (5,4) et la TP (32,9°C), *S. cerevisiae* a produit, en fioles, 91 g/L de biomasse et ce, après seulement 16 h de fermentation.

Des modèles mathématiques correspondant au processus biotechnologique de production de la biomasse de *S. cerevisiae* ont été implémentés pour simuler le fonctionnement de fermentation. Les résultats de simulation permettent de déterminer les valeurs du taux de croissance maximal ainsi que les valeurs estimées (K_s et X_{max}). Pour un choix approprié des méthodes de simulation des modèles, une bonne correspondance est notée pour les modèles de Monod et le modèle de Verhulst.

Mots clés : Biomasse, *S. cerevisiae*, Extrait de dattes, Optimisation, Modélisation.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM),

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. KACEM-CHAOUCH. N (Professeur - UFM Constantine),
Rapporteur : Mlle. KARA-ALI. M (Docteur - UFM Constantine),
Examineur : Mme. MIHOUBI. I (Professeur - UFM Constantine).

Date de soutenance : 26/06/2016