

OPTIMISATION ET MODELISATION DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LA CROISSANCE DE "Saccharomyces cerevisiae" ISOLE SUR REBUT DE DATTE

CHIBI Souad*, EL HADI Djamel
Laboratoire d'Analyse Fonctionnelle des Procédés Chimiques,
Département de Génie des Procédés, Université -Saad Dahlab-Blida, 09000 Blida, Algérie
 E-mail: s.chibi@univ-blida.dz

(Received 19 September 2018 - Accepted 22 October 2020)

Résumé.- Le présent travail porte sur l'analyse métabolique et cinétique de deux souches S_1 et S_3 de type *Saccharomyces cerevisiae*, isolées respectivement à partir de l'extrait de dattes Degla-Beida et Mech-Degla. En s'appuyant sur la méthodologie des plans d'expérience pour étudier l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance des levures, tel que le pH, température, concentration initiale en l'éthanol et la salinité. Les valeurs des paramètres du modèle de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* sont fixées à partir des résultats du plan d'expérience et le recueil des données a été effectué selon un plan composite centré, de manière à étudier les effets linéaires, les effets quadratiques et les interactions entre facteurs. Les résultats obtenus montrent que la levure S_3 était capable de croître à pH agressive d'ordre 3 et à une température entre 20 et 38°C en présence d'un taux alcoolique élevée (14%). La production de la biomasse cellulaire de S_3 a été améliorée ($X_{max} = 4,7308$ g/l) par optimisation des facteurs température, pH, NaCl et taux d'éthanol fixés respectivement à 2°C; 4,34; 2% et 3,2%. Cette souche peut s'adapter à des usages industriels pour la production de bioéthanol à grande échelle.

Mots-clés: Moûts de dattes, *Saccharomyces cerevisiae*, biomasse, alcool, modélisation.

OPTIMIZATION AND MODELING OF ENVIRONMENT PARAMETERS ON THE GROWTH OF "Saccharomyces cerevisiae" ISOLATED ON DATE BIT

Abstract.- This work focused on the metabolic and kinetic analysis of two strains of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* (S_1 and S_3), isolated from juice of dates poorer quality Degla-Beida and Mech-Degla respectively. Based on the methodology of the experimental plans to study the influence of environmental factors (pH, temperature, initial concentration in ethanol and salinity) upon the growing of the yeasts. The parameter value of the growing of *Saccharomyces cerevisiae* are fixed according to the results of the experiment plan and the data collection was made according to a centered composite plan, so as to study the linear effects, the quadratic effects and the interactions between factors. The results obtained show that the yeast S_3 was able to grow at an aggressive pH of order 3 and at a temperature between 20 and 38°C in the presence of a high alcohol content 14%. The production of the S_3 cell biomass was improved ($X_{max} = 4.7308$ g/l) by optimizing the temperature, pH, NaCl and ethanol content factors set respectively at 29°C., 4.34, 2% and 3%. 23%. It has been concluded that this strain may well adapt to industrial uses for large scale bioethanol production.

Key words: Musts of dates, *Saccharomyces cerevisiae*, biomass, alcohol, modelization.

Introduction

L'Algérie possède un potentiel énorme en biomasse dans le Sud du pays. Il est constitué des déchets générés par la palmeraie et des industries de conditionnement des dattes. Il s'agit des déchets de dattes (écarts de tri, dattes par ténocarpiques, etc.) et des dattes communes, qui s'écoulent difficilement sur le marché. Les rebuts de dattes

représentent une moyenne de 53% de la production dattier annuellement [1]. En se basant sur la production de 750 000 tonnes/an en 2011, il est possible d'estimer le tonnage annuel de rebuts de dattes à $187,5 \cdot 10^3$ tonnes/an. À la lumière de ces résultats estimatifs obtenus, il est constaté que ces sous-produits sont disponibles avec un tonnage très appréciable, justifiant une étude de leur valeur énergétique et alimentaire, en vue de leur utilisation comme source de production des levures.

La levure *S. cerevisiae* représente certainement le groupe le plus important de micro-organisme exploité par l'homme, elle est très répandue sur les fruits. Dans une fermentation alcoolique en batch et en présence de *S. cerevisiae*, environ 30 à 35% de la source de carbone est convertie pour produire la biomasse cellulaire tandis que 50% d'hydrates de carbone est transformée en éthanol. Le reste des sucres est utilisé pour la production de l'énergie et l'entretien des cellules [2]. Face à ce constat, la présente étude s'intéresse aux effets de différents facteurs environnementaux sur la croissance de *S. cerevisiae*, deux souches (S_1 et S_3) isolées localement à partir d'extraits de dattes *Mech-Degla* et *Degla-Beida* respectivement. Une étude précédente a été entreprise dans le but de sélectionner de nouvelles souches de levures afin qu'elles soient exploitées dans la production du bioéthanol [3]. Une série d'expériences de fermentation sur milieu synthétique affirme que les deux souches sélectionnées peuvent se développer aux différents pH acide (3,2; 3,5; 4,0; 4,5) et aux températures de 25°C et 35°C; en plus elles résistent à la concentration initiale de l'éthanol absolu (Merck, Allemagne) jusqu'à 16%. C'est pourquoi, les deux souches (S_1 et S_3) sont retenues pour étudier l'effet des interactions combinées des quatre facteurs physicochimiques sur les paramètres de croissance. Notons que la concentration en biomasse est dépendante de plusieurs paramètres opératoires. Il est donc utile de connaître leurs effets et de pouvoir modéliser la variation de la biomasse en fonction des paramètres choisis. Dans une première partie, il est tenté de décrire l'influence de quatre facteurs particulièrement la concentration initiale en l'éthanol, la température, le pH initial et la salinité. La deuxième partie consiste ensuite à optimiser les facteurs influençant la croissance des levures sélectionnées en appliquant la méthodologie des plans d'expériences, afin d'obtenir une croissance maximale. Les plans d'expériences permettent une diminution considérable du nombre d'essais et une interprétation rapide et pratique.

En se référant aux expériences précédentes, nous avons travaillé dans des intervalles de 20 à 38°C pour la température, de 3% à 14% pour l'éthanol, de 3 à 6 pour le pH et de 2% à 6% pour le NaCl. Le traitement statistique a été effectué à l'aide de logiciel de planification expérimentale le MODDE[®] 6.0 software (umetrics AB, version 6.0, Sweden).

1.- Matériel et Méthodes

1.1.- Matériel biologique

Deux souches levuriennes *Saccharomyces cerevisiae* identifiées et sélectionnées comme les plus résistantes aux stress environnementaux potentiellement agressifs [3]. Ces souches sont isolées localement.

1.2.- Milieux et condition de culture

Le milieu semi synthétique défini par Strehaiano (1984) utilisé pour faire des tests de résistance des levures à l'éthanol et des tests de chocs thermiques, dont la composition suivante: 50 g/l de glucose extra pure, 5 g/l de KH_2PO_4 , 2 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g/l de

MgSO₄, 1,0 g/l d' extrait de levure; de l'éthanol et du NaCl. Différentes concentrations d'éthanol et de chlorure de sodium sont ajoutées aux milieux.

1.3.- Préparation de l'inoculum

Les expériences sont réalisées à 30°C dans des erlenmeyer de contenance 1 l, de volume utile 800 ml (250 rotations/minute). La préparation de l'inoculum (250 rotations/minute à 30°C) se fait dans le même milieu (milieu de Strehaiano), en 2 étapes: la première permet de stabiliser la souche vis-à-vis du milieu et la deuxième est utilisée pour ensemercer le milieu à étudier à 3x10⁶ CFU/ml en fin de phase de croissance.

1.4.- Culture en mode batch

La culture est conduite dans des erlenmeyers de 300 ml, plongées dans un Bain-marie afin de maintenir la température fixe. Les solutions sont inoculées avec la pré-culture de la souche testée à une concentration de 3x10⁶ CFU/ml puis scellés par des bouchons en silicone pour assurer l'anaérobiose [4]. Le dégagement du CO₂ est rendu possible par l'installation d'une tuyauterie en plastique stérile, trempée dans de l'eau et traversant les bouchons. Puis le processus de multiplication des levures est déclenché. Pour suivre l'évolution de la biomasse microbienne, il est procédé à toutes les 2 heures à des prélèvements de 1 à 2 ml en vue de compter le nombre de cellules viables après une coloration au bleu de méthylène.

1.5.- Analyse de la biomasse

Le suivi de l'évolution de la biomasse a été étudié en milieu liquide par trois méthodes différentes:

- Comptage hématimétrique (Cellule de Malassez) de la population microbienne sous microscope optique type (OLYMPUS BH, G: 40x10), après une coloration au bleu de méthylène (cellules viables). Cette méthode permet l'étude du temps de latence, le taux de croissance et le temps de génération.
- La biomasse sèche, exprimé en g/l est déterminée par une méthode gravimétrique. Elle consiste à centrifuger un volume connu de suspension cellulaire, soit 30 ml de milieu de fermentation sont centrifugés à 3500 tours/minutes. Deux lavages par l'eau, le culot est pesé pour déterminer le poids de biomasse en matière sèche (MS) dans une étuve à 105°C pendant 48 heures [5]. Cette méthode est utilisée en parallèle de la mesure turbidimétrique pour obtenir une corrélation DO/Concentration en biomasse (poids-sec) afin d'éviter le recours systématique à cette technique longue et peu précise dans les faibles valeurs de biomasse.
- Spectrophotométrie (turbidimétrie), l'évolution de la concentration cellulaire est mesurée par spectrophotométrie à 620 nm (spectrophotomètre modèle CHIMADZU UV-1700) dans une cuve de 2 mm de trajet optique. Comme la densité optique évolue très vite, il est avons préférable de diluer les échantillons au 1/20 de façon à obtenir des densités optiques dans la zone linéaire du spectrophotomètre utilisé (DO < 0,8).

Matrice d'expérience

En fonction des paramètres à étudier et de leurs limites de variation, le logiciel Modde[®] 6.0 a déterminé les expériences à réaliser. Les variables d'étude considérées sont la concentration initiale en éthanol, la salinité, la température et le pH. Les conditions

opératoires testées sont: une concentration initial de l'éthanol varié de 3% à 14% (v/v); 20 à 38°C pour la température; de 3 à 6 pour le pH et de 2 à 6% pour le NaCl. A partir des variables d'étude, il peut donc être déduit la matrice d'expériences.

Tableau I.- Définition des différents niveaux des variables de la matrice d'expériences d'un plan Composite Centré

N° Expérience	N° ordre expérience	Niveaux				Niveaux réels			
		(X ₁)	(X ₂)	(X ₃)	(X ₄)	Ethanol (X ₁)	Température (X ₂)	pH (X ₃)	NaCl (X ₄)
1	13	-1	-1	-1	-1	3	20	3	2
2	3	+1	-1	-1	-1	14	20	3	2
3	16	-1	+1	-1	-1	3	38	3	2
4	14	+1	+1	-1	-1	14	38	3	2
5	20	-1	-1	+1	-1	3	20	6	2
6	19	+1	-1	+1	-1	14	20	6	2
7	23	-1	+1	+1	-1	3	38	6	2
8	2	+1	+1	+1	-1	14	38	6	2
9	5	-1	-1	-1	+1	3	20	3	6
10	11	+1	-1	-1	+1	14	20	3	6
11	6	-1	+1	-1	+1	3	38	3	6
12	15	+1	+1	-1	+1	14	38	3	6
13	22	-1	-1	+1	+1	3	20	6	6
14	26	+1	-1	+1	+1	14	20	6	6
15	8	-1	+1	+1	+1	3	38	6	6
16	4	+1	+1	+1	+1	14	38	6	6
17	1	-1	0	0	0	3	29	4,5	4
18	17	+1	0	0	0	14	29	4,5	4
19	24	0	-1	0	0	8,5	20	4,5	4
20	10	0	+1	0	0	8,5	38	4,5	4
21	25	0	0	-1	0	8,5	29	3	4
22	18	0	0	+1	0	8,5	29	6	4
23	12	0	0	0	-1	8,5	29	4,5	2
24	27	0	0	0	+1	8,5	29	4,5	6
25	9	0	0	0	0	8,5	29	4,5	4
26	7	0	0	0	0	8,5	29	4,5	4
27	21	0	0	0	0	8,5	29	4,5	4

Il est choisi de suivre comme variables de réponse: la concentration de biomasse maximale (X_{max}); la vitesse de croissance maximale (μ_{max}) et le temps de latence (λ), il est choisi de définir le temps de latence comme le temps où il est atteint une biomasse deux fois plus importante que la biomasse initiale (λ temps pour lequel $X=2X_0$).

2.- Résultats

Le plan généré par le logiciel Modde 6.0 est de type Composite Centré (CCF- Central Composite Face-centered). Il est retenu pour l'étude le même plan d'expérience pour les deux souches S₁ et S₃. L'expérience correspondant à chaque point du plan expérimental a été réalisée 3 fois. Pour chacune, la courbe log DO = f(temps) a été tracée grâce au logiciel Excel; le taux de croissance μ (h⁻¹), le temps de latence λ (h), et la biomasse maximale (X_{max}) ont été déterminés graphiquement. Le tableau 2 résume les résultats expérimentaux pour chaque combinaison éthanol, température, pH et NaCl.

Tableau II.- Présentation des paramètres de croissance pour chaque expérience sur milieux synthétique des deux souches (S₁, S₃)

N° Expérience	Souche S ₁			Souche S ₃		
	X _{max} (g/l)	μ _{max} (h ⁻¹)	Latence λ (h)	X _{max} (g/l)	μ _{max} (h ⁻¹)	Latence λ (h)
1	3,73	0,039	52	3,88	0,031	52
2	2,48	0,025	56	2,62	0,038	56
3	3,95	0,039	56	2,72	0,036	56
4	2,11	0,021	72	1,96	0,025	72
5	3,32	0,038	32	3,25	0,036	32
6	2,49	0,027	78	3,32	0,032	78
7	2,95	0,036	48	2,89	0,042	48
8	2,24	0,028	120	2,61	0,027	120
9	3,54	0,057	30	3,47	0,042	30
10	1,55	0,015	76	1,62	0,024	81
11	2,63	0,055	48	2,52	0,047	48
12	0,67	0,016	128	0,33	0,017	128
13	2,87	0,046	52	2,53	0,038	52
14	1,72	0,012	152	0,62	0,015	152
15	2,01	0,043	72	2,12	0,046	72
16	0,85	0,013	196	0,91	0,016	196
17	3,72	0,048	24	4,54	0,053	24
18	2,62	0,022	97	2,75	0,031	97
19	3,54	0,032	32	4,12	0,033	32
20	3,12	0,027	52	3,28	0,028	53
21	2,62	0,025	49	2,85	0,025	48
22	2,29	0,021	72	2,33	0,029	72
23	3,83	0,027	26	3,73	0,028	27
24	2,92	0,032	52	3,56	0,023	52
25	3,52	0,03	30,5	3,67	0,034	30
26	3,61	0,028	30,5	3,69	0,035	30
27	3,59	0,028	30,5	3,74	0,034	30

Pour chaque souche (S₁ et S₃), 27 expériences au total et 3 répétitions du point central sont réalisées. La répétition du point central permet l'estimation de la variance expérimentale. L'ensemble des expériences va permettre de connaître l'impact de chaque variable d'étude sur la croissance de la levure ainsi que leurs éventuelles interactions.

D'après le formalisme du plan d'expériences, les différentes valeurs des variables de réponses «y» ont été assimilées à un modèle polynomial du 2^{ème} degré.

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{44}X_4^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{14}X_1X_4 + a_{23}X_2X_3 + a_{24}X_2X_4 + a_{34}X_3X_4 + a_{123}X_1X_2X_3 + a_{124}X_1X_2X_4 + a_{134}X_1X_3X_4 + a_{234}X_2X_3X_4 + a_{1234}X_1X_2X_3X_4 \quad (I)$$

Les réponses générées par le premier logiciel (Modde 6.0) pour l'ensemble des 27 essais, ont été traitées par un second logiciel Statgraphics Centurion Version 18.0.09. La détermination des différents coefficients du modèle polynomial (équation I) s'est fait par une régression multilinéaire multi-variables. Les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart-type, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée dans chaque cas et les différences ont été considérées significatives à $p < 0,05$.

Les résultats générés par ce logiciel, pour chaque essai du plan d'expérience exécuté, sont présentés sur les figures 1-3 regroupent deux graphique de Pareto pour chaque

souches montrant les effets de chaque paramètre et les tableaux III-V de l'analyse de variance. De même, le modèle mathématique correspondant est établi après un calcul matriciel.

2.1.- Evaluation de l'effet combiné des quatre facteurs sur la concentration de la biomasse maximale (X_{max}) des deux souches (S_1 et S_3)

La figure 1 présente les résultats obtenus de l'effet des interactions combinées des quatre facteurs physico-chimiques sur la densité cellulaire maximale (X_{max}) exprimé en (g/l).

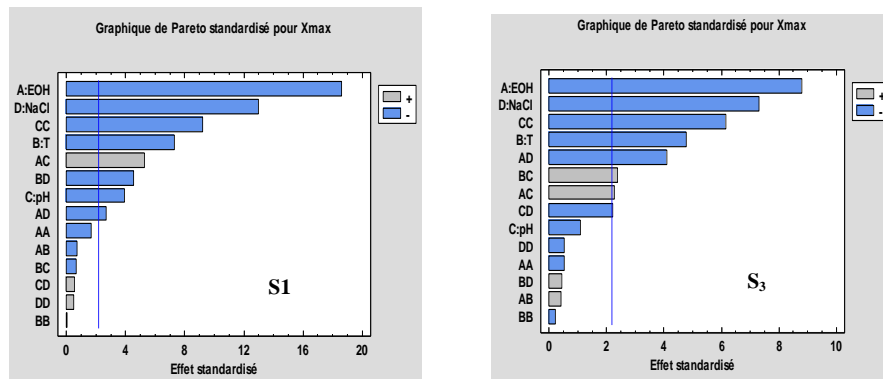


Figure 1.- Diagramme de Pareto pour X_{max} de S_1 et S_3

Tableau III.- Effet des paramètres environnementaux sur la concentration de biomasse maximale

Facteur	Souche S_1				Souche S_3			
	Ecart-type	DDL	F	Proba.	Ecart-type	DDL	F	Proba.
A:EOH	7,15 E -2	1	347,19	0,0000	0,141422	1	77,15	0,0000
B:T	7,15 E -2	1	53,58	0,0000	0,141422	1	22,89	0,0004
C:Ph	7,15 E -2	1	15,58	0,0019	0,141422	1	1,19	0,2962
D:NaCl	7,15 E -2	1	167,98	0,0000	0,141422	1	53,39	0,0000
AA	1,89 E -1	1	2,72	0,1247	0,374168	1	0,27	0,6107
AB	7,58 E -2	1	0,55	0,4725	0,150001	1	0,18	0,6784
AC	7,58 E -2	1	27,65	0,0002	0,150001	1	5,18	0,0421
AD	7,58 E -2	1	7,22	0,0198	0,150001	1	16,88	0,0015
BB	1,89 E -1	1	0,00	0,9679	0,374168	1	0,05	0,8230
BC	7,58 E -2	1	0,46	0,5120	0,150001	1	5,72	0,0340
BD	7,58 E -2	1	20,55	0,0007	0,150001	1	0,20	0,6666
CC	1,89 E -1	1	84,82	0,0000	0,374168	1	37,97	0,0000
CD	7,58 E -2	1	0,30	0,5964	0,150001	1	4,88	0,0474
DD	1,89 E -1	1	0,27	0,6146	0,374168	1	0,27	0,6107
Erreur totale		12				12		
R			0,9865				0,9619	

L'analyse de variance porte sur 14 facteurs pour les deux souches S_1 et S_3 ; donc les deux modèles initiaux ont une équation polynômiale à 14 termes (I.1) et (I.2).

$$X_{max}(S_1) = -2,10798 - 0,0886065 x_1 + 0,0197069 x_2 + 3,2125 x_3 - 0,00475063 x_4 - 0,0051607 x_1^2 - 0,000568182 x_1x_2 + 0,0241667 x_1x_3 - 0,00926136 x_1x_4 + 0,000048011 x_2^2 - 0,00189815 x_2x_3 - 0,00954861 x_2x_4 - 0,38716 x_3^2 + 0,006875 x_3x_4 + 0,0122222 x_4^2 \quad (I.1)$$

$$X_{max}(S_3) = -3,44909 - 0,0576768 x_1 - 0,0795879 x_2 + 4,21934 x_3 + 0,370388 x_4 - 0,00323232 x_1^2 + 0,000643939 x_1x_2 + 0,0206818 x_1x_3 - 0,0280114 x_1x_4 - 0,000528121 x_2^2 + 0,013287 x_2x_3 + 0,00184028 x_2x_4 - 0,512346 x_3^2 - 0,0552083 x_3x_4 - 0,0244444 x_4^2 \quad (I.2)$$

Mais pour affiner le modèle, seuls sont pris en compte les facteurs à effets significatifs. Dans ce cas, 8 effets ont des probabilités inférieures à 0,05 pour S_1 et S_3 , ce qui indique qu'ils sont significativement différents de zéro au niveau de confiance de 95,0%. Il est obtenu alors 8 facteurs significatifs sur le taux de croissance des deux souches, il est possible alors de décrire l'influence de ces différents facteurs par les deux modèles simplifiés suivants:

$$X_{\max}(S_1) = -2,10798 - 0,0886065 x_1 + 0,0197069 x_2 + 3,2125 x_3 - 0,00475063 x_4 + 0,0241667 x_1 x_3 - 0,00926136 x_1 x_4 - 0,00954861 x_2 x_4 - 0,38716 x_3^2 \quad (I.3)$$

$$X_{\max}(S_3) = -3,44909 - 0,0576768 x_1 - 0,0795879 x_2 + 0,370388 x_4 + 0,0206818 x_1 x_3 - 0,0280114 x_1 x_4 + 0,013287 x_2 x_3 - 0,512346 x_3^2 - 0,0552083 x_3 x_4 \quad (I.4)$$

Avec: x_1 : [EOH], x_2 : T, x_3 : pH et x_4 : [NaCl]

La figure 1 indique que 4 termes linéaires (éthanol, température, NaCl, pH), 1 terme quadratique [pH^2] et 3 interaction [EOH-pH], [EOH-NaCl], [T-NaCl] sont significatifs sur la biomasse maximale de la souche (S_1) et 3 termes linéaires (éthanol, température, NaCl), 1 terme quadratique [pH^2] et 4 interaction [EOH-pH], [EOH-NaCl], [T-pH], [pH-NaCl] sont significatifs sur la biomasse maximale de (S_3). Les valeurs du test F révèlent de plus que l'éthanol est le facteur prépondérant parmi ceux étudiés. D'autre part, les coefficients de détermination obtenus $R^2(S_1) = 0,9865$ et $R^2(S_3) = 0,9619$ signifie que 98,65% de la variation de la biomasse de S_1 et 96,19% de la variation de la biomasse de S_3 sont attribuées aux variables indépendantes étudiées.

2.2.- Evaluation de l'effet combiné des quatre facteurs sur la vitesse de croissance maximale (μ_{\max}) des deux souches

Les résultats générés par Statgraphics, pour chaque essai du plan d'expérience exécuté, sont donnés sur la figure 2. Les deux modèles polynomiaux peuvent être transcrits sous forme de diagramme de Pareto qui représente visuellement l'influence de chacun des paramètres sur la variable de réponse (μ_{\max}). Comme pour X_{\max} la figure 2 indique que 2 termes linéaires (éthanol, pH), 2 termes quadratiques [EOH²], [pH^2] et 3 interaction [EOH-pH], [EOH-NaCl], [pH-NaCl] sont significatifs sur le taux de la croissance maximal de la souche (S_1) et 2 termes linéaires (éthanol, NaCl), 3 termes quadratiques [EOH²], [pH^2], [NaCl²] et 2 interactions [EOH-T], [EOH-NaCl] sont significatifs sur le taux de la croissance maximal de (S_3). Toutefois, ces interactions statistiquement sont à la limite du seuil de signification et ont un effet moins important que la concentration en éthanol.

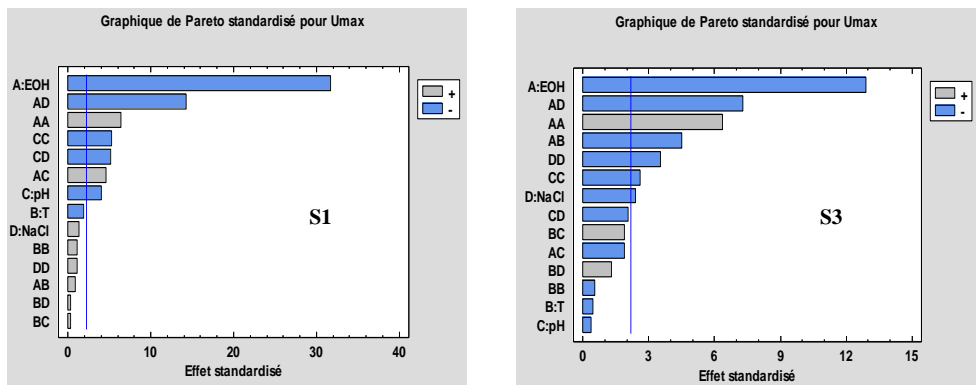


Figure 2.- Diagramme de Pareto pour μ_{\max} de S_1 et S_3

Tableau IV.- Effet des paramètres environnementaux sur le taux spécifique maximal de croissance (μ_{max}).

Facteur	Souche S ₁				Souche S ₃			
	Ecart-type	DDL	F	Proba.	Ecart-type	DDL	F	Proba.
A:EOH	9,92 E -4	1	1007,1	0,0000	1,26 E -3	1	165,88	0,0000
B:T	8,09 E -4	1	3,45	0,0878	1,26 E -3	1	0,19	0,6670
C:pH	8,09 E -4	1	16,02	0,0018	1,26 E -3	1	0,12	0,7303
D:NaCl	8,09 E -4	1	1,66	0,2225	1,26 E -3	1	5,67	0,0346
AA	1,09 E -3	1	41,11	0,0000	3,33 E -3	1	40,70	0,0000
AB	5,99 E -4	1	0,83	0,3809	1,34 E -3	1	20,17	0,0007
AC	5,99 E -4	1	20,69	0,0007	1,34 E -3	1	3,50	0,0859
AD	5,99 E -4	1	203,14	0,0000	1,34 E -3	1	53,26	0,0000
BB	2,06 E -3	1	1,13	0,3089	3,33 E -3	1	0,27	0,6109
BC	8,24 E -4	1	0,09	0,7669	1,34 E -3	1	3,50	0,0859
BD	8,24 E -4	1	0,09	0,7669	1,34 E -3	1	1,72	0,2147
CC	2,06 E -3	1	27,66	0,0002	3,33 E -3	1	6,88	0,0223
CD	8,24 E -4	1	26,58	0,0002	1,34 E -3	1	4,24	0,0619
DD	2,06 E -3	1	1,13	0,3089	3,33 E -3	1	12,41	0,0042
Erreur totale	0,18917	12				12		
R		0,9912				0,9622		

Il est possible d'écrire l'influence de ces différents facteurs avec les modèles polynomiale simplifiés suivants:

$$\mu_{max}(S_1) = + 0,01801 - 0,00505 x_1 + 0,02123 x_3 + 0,00022 x_1^2 + 0,00023 x_1x_3 - 0,00053 x_1x_4 - 0,00240 x_3^2 - 0,00071 x_3x_4 \quad (I.5)$$

$$\mu_{max}(S_3) = - 0,0233392 - 0,0032363 x_1 + 0,0154106 x_4 + 0,000351393 x_1^2 - 0,0000606061 x_1 x_2 - 0,000443182 x_1x_4 - 0,00194239 x_3^2 - 0,00146759 x_4^2 \quad (I.6)$$

2.3.- Evaluation de l'effet combiné des quatre facteurs sur la phase de latence (λ) des deux souches

En examinant les diagrammes de Pareto présentant les interactions des quatre facteurs étudiés sur la durée de la phase de latence des deux souches, il est constaté que 4 termes linéaires (éthanol, température, NaCl, pH), 2 termes quadratiques [EOH²], [pH²] et 4 interactions [EOH-T], [EOH-pH], [EOH-NaCl], [pH-NaCl] sont significatifs positivement sur le taux de croissance des deux souches (S₁ et S₃). Les valeurs du test F révèlent de plus que l'éthanol est le facteur prépondérant parmi ceux étudiés.

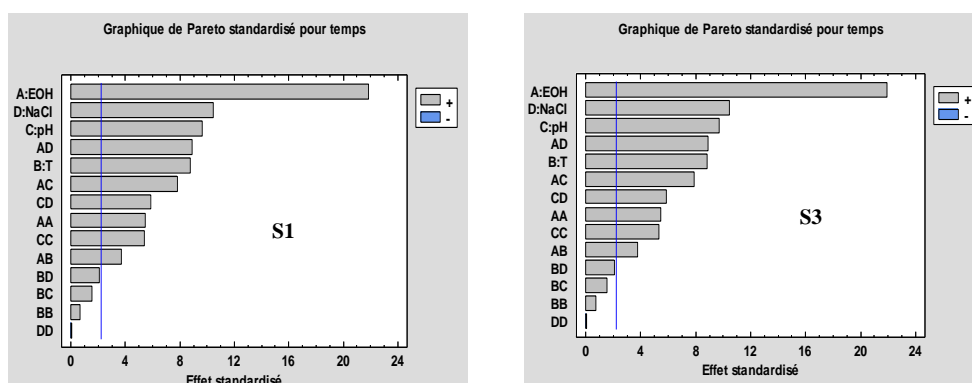


Figure 3.- Diagrammes de Pareto pour le temps de latence (λ) de S₁ et S₃

Tableau V.- Effet des paramètres environnementaux sur la phase de latence (λ)

Facteur	Souche S ₁				Souche S ₃			
	Ecart-type	DDL	F	Proba.	Ecart-type	DDL	F	Proba.
A:EOH	2,87927	1	477,07	0,0000	2,86501	1	481,83	0,0000
B:T	2,87927	1	77,11	0,0000	2,86501	1	78,19	0,0000
C:Ph	2,87927	1	93,45	0,0000	2,86501	1	94,76	0,0000
D:NaCl	2,87927	1	108,56	0,0000	2,86501	1	109,65	0,0000
AA	7,61782	1	29,63	0,0001	7,58011	1	29,95	0,0001
AB	3,05392	1	13,87	0,0029	3,03881	1	14,01	0,0028
AC	3,05392	1	61,12	0,0000	3,03881	1	61,73	0,0000
AD	3,05392	1	78,89	0,0000	3,03881	1	79,68	0,0000
BB	7,61782	1	0,43	0,5226	7,58011	1	0,52	0,4835
BC	3,05392	1	2,29	0,1558	3,03881	1	2,32	0,1539
BD	3,05392	1	4,36	0,0588	3,03881	1	4,40	0,0578
CC	7,61782	1	28,92	0,0002	7,58011	1	28,52	0,0002
CD	3,05392	1	34,26	0,0001	3,03881	1	34,60	0,0001
DD	7,61782	1	0,00	0,9453	7,58011	1	0,00	0,9466
Erreur totale		12				12		
R			0,9901				0,9902	

Il est possible d'écrire l'influence des différents facteurs sur S₁ et S₃ avec des modèles polynomial simplifiés suivant:

$$\lambda (S_1) = 356,388 - 20,7099 x_1 - 2,84727 x_2 - 101,839 x_3 - 20,9884 x_4 + 0,685399 x_1^2 + 0,114899 x_1x_2 + 1,44697 x_1x_3 + 1,23295 x_1x_4 + 9,1037 x_3^2 + 2,97917 x_3x_4 \quad (I.7)$$

$$\lambda (S_3) = 356,496 - 20,714 x_1 - 3,01091 x_2 - 100,85 x_3 - 21,0033 x_4 + 0,685644 x_1^2 + 0,114899 x_1x_2 + 1,44697 x_1x_3 + 1,23295 x_1x_4 + 8,99588 x_1^2 + 2,97917 x_1x_4 \quad (I.8)$$

3.- Discussion

La méthode utilisée dans cette étude consistant à déterminer les paramètres de croissance directement à partir de la courbe de croissance. Pour le coefficient de détermination R² qui exprime le pourcentage d'explication des valeurs expérimentales par le modèle polynomial, il est noté des valeurs entre 0,96 et 0,99 pour les différents modèles. Ceci signifie que les modèles polynomiaux identifiés à partir du plan d'expériences permettent de bien prédire les valeurs des variables de réponses dans le domaine exploré et cela implique que la justesse et la fiabilité des modèle choisi sont bonnes (R²> 0,9) [6].

En effet, pour le développement d'une population *Saccharomyces cerevisiae*, l'éthanol et la concentration en NaCl ont un effet appréciable, l'interaction de ces deux facteurs est également notable. A une concentration critique en éthanol et en NaCl la croissance est complètement inhibée pendant toute la culture ce qui conduit à une diminution de quantité de biomasse formée. L'effet de l'éthanol sur la synthèse de biomasse peut être expliqué par la consommation de substrat pour l'énergie de maintenance, cette énergie est dépensée pour assurer les fonctions de motilité, les régulations ATPasiques pour le maintien du potentiel transmembranaire, les flux de relargage d'excès de substrat [7,8]. Le pH est un facteur prépondérant affectant la densité cellulaire maximale des deux souches. En effet, l'étude a montré que les souches étudiée se développent convenablement à des pH allant de 4,5 à 6; par contre à pH 3 la croissance est complètement inhibée.

Concernant les valeurs de la biomasse maximales des deux souches, la souche S_1 prend une valeur maximale de ($X_{\max} \geq 4,3866 \text{ g/l}$) et de ($X_{\max} \geq 4,7308 \text{ g/l}$) pour la souche S_3 dans une zone optimale des quatre facteurs: $3\% \leq \text{EOH} \leq 8,5\%$; $28^\circ\text{C} \leq T \leq 33,3^\circ\text{C}$; $3,71 \leq \text{pH} \leq 4,94$ et $3\% \leq [\text{NaCl}] \leq 5,66\%$, de part et d'autre de cette zone, la croissance se ralentit.

Le taux spécifique maximum de croissance des deux souches étudiées est favorisé par un degré alcoolique faible, d'autre part il est observé un effet légèrement positif pour le pH. La sensibilité du taux de croissance des deux souches vis-à-vis de la concentration en chlorure de sodium est différente, car la souche S_1 montre une meilleure aptitude à la croissance en présence d'une concentration plus importante dans le milieu (5,994%) par rapport à la souche S_3 (4,614%) qui nécessite un ajustement de ce facteur. L'effet des interactions conjuguée [EOH-T], [T-pH] et [T-NaCl] sur la vitesse de la croissance maximale est quasi nulle. Ces résultats sont presque valables pour les deux souches. Par contre, les autres interactions sont statistiquement à la limite du seuil de signification et ont un effet moins important que la concentration en éthanol. Le taux de croissance maximum atteint son optimum ($\mu_{\max} = 0,0584 \text{ h}^{-1}$) pour S_1 et ($\mu_{\max} = 0,0538 \text{ h}^{-1}$) pour S_3 à une concentration d'éthanol d'ordre 3% et une température comprise entre [$27^\circ\text{C} - 31,5^\circ\text{C}$], pH entre [3,71 - 4,88] et concentration en chlorure de sodium entre [3% - 4,61%] dans le milieu.

La phase de latence est une phase d'adaptation des cellules de bactéries à leur environnement. Sa durée dépend en premier lieu de la physiologie des souches et leurs aptitudes à s'adapter aux conditions de culture. Le diagramme de Pareto montre que la durée de la phase de latence des deux souches, est affectée principalement par les quatre facteurs à la fois (l'éthanol, pH, température et concentration en NaCl), ils ont un effet très significatif (positif) selon le test de F (fig. 3). Une augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu, fait que les deux souches vont être soumises à une variation de l'osmolarité qui va affecter leur métabolisme et leur physiologie entière et conduit à un ralentissement de leur activités cellulaires et par conséquent un ralentissement de leurs aptitudes d'adaptation au milieu. Le temps de latence sera plus long.

Des études sur l'effet de la température d'incubation ont montré qu'une augmentation de ce paramètre favorise la croissance des micro-organismes par l'augmentation de la fluidité de membrane et donc l'augmentation du système de transport des protéines [9]. Par contre, la baisse de température entraîne des modifications physiologiques importantes, tout d'abord une diminution de la fluidité membranaire, une stabilisation des structures secondaires des acides nucléiques, ainsi qu'une diminution de l'efficacité de la réplication, de la transcription et un ralentissement du métabolisme, ce qui va prolonger le temps de latence [10]. Les interactions des facteurs sont également appréciables.

Conclusion

L'étude réalisée dans une gamme de condition de stress environnementaux potentiellement agressifs, a permis de mettre en évidence l'effet linéaires des quatre facteurs physicochimiques (concentration en éthanol, pH, température et concentration en NaCl) et de modéliser les effets des interactions conjuguées sur la croissance plus particulièrement les paramètres cinétiques de croissance (biomasse maximale, taux de croissance maximum et le temps de latence) de deux souches '*Saccharomyces cerevisiae*'.

Les résultats obtenus, pour chaque essai du plan d'expérience exécuté, ont montré que l'effet linéaire direct de la variable concentration en éthanol [EOH] est le plus important

parmi ceux étudiés. Des concentrations critiques de ce facteur diminuent la densité cellulaire finale et affectent négativement le taux de croissance spécifique, son maximum a été détecté au voisinage de 12% (v/v), ce qui provoque par la suite une augmentation dans la durée de l'adaptation des deux souches. Le taux de croissance des deux souches est affecté aussi par l'interaction significative conjuguée [EOH-NaCl]; il semble avoir un effet significatif (négatif) du pH de milieu et une interaction conjuguée [EOH-pH] significative (positif) qui se manifestent de façon similaire sur le taux de croissance de S₁, contrairement à ce qui avait été observé pour la souche S₃, les effets sont à la limite du seuil de signification. Les diagrammes de Pareto montrent de meilleures aptitudes de croissance de la souche S₁ par rapport à la souche S₃.

Références bibliographiques

- [1].- Benziouche S. E. et Cheriet F.; 2012.- Structure and constraints of the date chain in Algeria; *New Mediat; A Mediterranean Journal of Economics, Agriculture and Environment* ? N°4, Q 17, F 14: 49-51.
- [2].- Hoda S., Ghasem N., Sirous R. et Mazyar S., 2010.- Optimal growth of *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 24860) on pretreated molasses for ethanol production: Application of response surface methodology. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*; 16: 199–206.
- [3].- Chibi S., Rabet S. et El-Hadi D., 2016.- Etude des Paramètres Environnementaux sur la Croissance de "*Saccharomyces cerevisiae*" Isolée de rebuts de dattes; *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 2., N°3: 231-242.
- [4].- Yamaoka C., Kurita O. et Kubo T., 2014.- Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation; *Microbiological Research*; 169: 907–914.
- [5].- Audigie C., Dupont G. et Zonszain F., 1983.- Principals of analysing methods of biochemical. Ed. Doin, T. 2, Paris, 144p.
- [6].- Li Y., Lu J., Gu G. et Mao Z., 2005.- Characterization of the enzymatic degradation of arabinoxylans in grist containing wheat malt using response surface methodology; *Journal of the American Society of Brewing Chemists*; 63:171-176.
- [7].- Chi Z. et Arneborg N., 1999.- Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol*; 86: 1047–1052.
- [8].- You K. M., Rosenfield C. L. et Knipple D. C., 2003.- Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol*; 69: 1499–150.
- [9].- Nedwell D. B., 1999.- Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature; *FEMS Microbiology letters*; 30: 101-111.
- [10].- Raynaud S., 2006.- Metabolic and Transcriptomic Adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Biovar *diacetylactis* in Response to Autoacidification and Temperature Downshift in Skim Milk. *Applied and Environmental Microbiology*; 71(12): 8016-23.