ACADEMIE DE MONTPELLIER

Universite Montpellier II

- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC -

THESE

présentée à l'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II - SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC pour obtenir le DIPLOME DE DOCTORAT

SPECIALITÉ : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Formation doctorale : Sciences des Aliments

CONTROLE DU METABOLISME DE Schwanniomyces castellii CULTIVE SUR SUPPORT SOLIDE

par

Gerardo SAUCEDO-CASTAÑEDA

Professeur Associé D à l'Université Autonome Métropolitaine (México)

Soutenue le 5 Décembre 1991 devant le Jury composé de :

MM. NAVARRO, Jean Marie RAIMBAULT, Maurice PAREILLEUX, Alain BENSOUSSAN, Maurice

GUIRAUD, Joseph Pierre

Professeur, ISIM, Université Montpellier II Directeur Recherche, ORSTOM, Montpellier Professeur, INP, Toulouse Professeur, ENSBANA, Dijon Professeur, ISIM, Université Montpellier II

Rapporteur Rapporteur Examinateur

Président

ersité Montpellier II Examinateur H2000 - 72118

084 FERMENT SAU



Nor Mun F 40 353

A Gabriela, por su apoyo constante durante estos tres años

A mis padres, Rubén y Hortensia

A mis Hermanos y Hermanas y a toda la gran familia

AVANT-PROPOS

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM de Montpellier (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération) sous la direction scientifique du Dr. Maurice RAIMBAULT.

Ce travail a été effectué lors de mon séjour en France (Septembre 1988 à Décembre 1991), en tant que boursier du CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexique) et du CEFI (Comité d'Etudes sur les Formations d'Ingénieurs, France).

Cette thèse s'intègre également dans les activités du programme de formation de l'Universidad Autónoma Metropolitana (UAM, México). Partenaires scientifiques depuis plus de dix ans, l'UAM et l'ORSTOM mènent des programmes communs de recherche portant sur la Fermentation en milieu Solide. Ma thèse s'inscrit dans cette dynamique.

J'ai eu l'opportunité de collaborer pendant cinq (Mai-octobre 1991) avec le Dr. B.K. LONSANE du CFTRI (Central Food Technological Research Institute, Mysore, India), ce qui nous a permis d'établir de solides bases pour une meilleure coopération scientifiques entre les différents partenaires.

Je souhaiterais que ce travail puisse dorénavant permettre une plus large valorisation de la fermentation solide, plus spécialement au sein de notre équipe de recherche, et qu'il puisse constituer une aide à l'établissement de nouvelles voies pour l'exploitation de ces procédés.

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier Monsieur Maurice RAIMBAULT, pour sa direction scientifique, pour l'accueil dans son groupe de travail ainsi que pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de cette thèse, ce qui m'a permis de travailler dans de très bonnes conditions et de mener à bien cette étude.

Que Monsieur le Professeur J.M. NAVARRO qui me fait l'honneur de présider ce jury soit assuré de ma profonde gratitude. Je lui remercie de m'avoir accordé sa confiance. Pour ses conseils avisés et pour toute l'attention particulière qu'il y a porté au cours des corrections de cet ouvrage, je lui exprime ma gratitude.

Monsieur A. PAREILLEUX: je le remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et je lui suis très reconnaissant pour ses judicieuses suggestions.

Monsieur M. BENSOUSSAN: je le remercie pour avoir accepté de participer à ce jury et de juger mon travail en tant qu'examinateur.

Monsieur J.P. GUIRAUD: sa présence à ce jury m'honore.

Je tiens à exprimé ma profonde gratitude aux gouvernements Mexicain et Français pour leurs appuis lors de la réalisation de ce travail.

Est-il nécessaire de remercier très vivement les Drs. S. ROUSSOS et B.K. LONSANE pour l'ambiance de travail passionné et l'amitié crée ces derniers mois.

A tous mes collègues de l'UAM qui de loin m'ont soutenu pendant ces trois années.

C'est avec beaucoup de sympathie que je tiens à remercier E. GIRAUD, E. BRESSON et I. GAIME-PERRAUD pour la lourde charge de correction de mes manuscrits.

Toute ma reconnaissance à M. TREJO, C. BUTIN, L. SERRANO et C. SOCCOL pour leur gentillesse et leur précieuse aide. Je remercie également N. PUJET pour m'avoir procuré l'appui administratif nécessaire et pour sa compétence dans la recherche et l'organisation des références bibliographiques.

Je tiens à remercier M. ROSSI de l'Université Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, pour sa collaboration et pour la prise des images au microscope électronique à balayage.

A tous les gens qui ont participé de près ou de loin à ce travail de recherche je tiens à exprimer toute ma gratitude. Une mention spéciale pour J. ALVAREZ, V. CRASTRE et L. HANNIBAL pour leur participation étroite à la réalisation de ces recherches.

Est-il besoin de remercier Mme E. PELEGRIN, du service de Documentation de l'OR-STOM, pour m'avoir procuré des documents nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier M. AURIA pour la conception du fermenteur modulaire utilisé dans ce travail. Merci aussi à B. MARIN qui a toujours mis à ma disposition avec beaucoup de gentillesse son matériel et la documentation dont je pouvais avoir besoin pour la réalisation de cette étude.

Enfin je remercie tous ceux qui m'ont soutenu pendant la réalisation de ce travail.

CONTROLE DU METABOLISME DE Schwanniomyces castellii CULTIVE SUR SUPPORT SOLIDE

TABLE DES MATIERES

		3
	AVANT-PROPOS REMERCIEMENTS TABLE DES MATIERES INTRODUCTION APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE 2.1 Fermentation Solide (F.S.) 2.1.1 Généralités 2.1.2 Applications de la FS 2.1.3 Caractéristiques de la croissance des microorganismes 2.1.4 Importance de la quantité et de l'activité de l'eau (Aw) 2.1.5 Contrôle de l'environnement et des échanges gazeux 2.1.6 Contrôle de la température 2.1.7 Contrôle du pH 2.1.8 Détermination de la biomasse en FS 2.1.9 Production d'alcool en FS	6
1. INTROI	DUCTION	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
2. APERÇI	U BIBLIOGRAPHIQUE	15
2.1 Fermer	ntation Solide (F.S.)	16
2.1.1	Généralités	16
2.1.2	Applications de la FS	18
2.1.3	Caractéristiques de la croissance des microorganismes	20
2.1.4	Importance de la quantité et de l'activité de l'eau (Aw)	2
2.1.5	Contrôle de l'environnement et des échanges gazeux	22
2.1.6	Contrôle de la température	24
2.1.7	Contrôle du pH	20
2.1.8	Détermination de la biomasse en FS	20
2.1.9	Production d'alcool en FS	2
2.2 Schwar	nniomyces	3
2.2.1	Introduction	3
2.2.2	Production de protéine unicellulaire	32
	Système amylasique	34
2.2.4	Production d'alcool à partir d'amidon par Schwanniomyces	30
2.2.5	Production d'alcool à partir d'amidon par autres procédés	38
2.2.6	Tolérance à l'alcool	40
2.2.7	Rôle de l'O2 et du pH sur les amylases	4
2.3 Concl	usion	4:

3.	. MATER	IEL ET METHODES	44
	3.1 Microc	organisme	45
	3.2 Milieux	x de culture	45
	3.2.1	Milieu de conservation	45
	3.2.2	Milieu d'inoculation	45
	3.2.3	Milieu de base	46
	3.2.4	Traitement de la bagasse	46
	3.3 Condit	ions de culture	47
	3.3.1	Dispositif de fermentation à petite échelle	47
	3.3.2	Précultures et préparation de l'inoculum	49
	3.3.3	Mise en œuvre de la fermentation solide	49
	3.4 Prélève	ement et traitement des échantillons	50
	3.5 Techni	ques d'évaluation de la biomasse	52
	3.5.1	Comptage des cellules	52
	3.5.2	Turbidimétrie	53
	3.5.3	Détermination de la teneur en poids sec des levures	53
	3.5.4	Dosage des protéines par la méthode de Lowry	54
	3.5.5	Détermination de la composition en C, H et N	55
	3.5.6	Techniques de fixation pour la microscopie électronique à balayage	55
	3.6 Techni	ques colorimétriques pour le dosage des sucres	57
	3.6.1	Dosage des sucres réducteurs	57
	3.6.2	Dosage des sucres totaux	58
	3.6.3	Dosage de l'amidon	5 9
	3.7 Méthod	des physico-chimiques	59
	3.7.1	Matière sèche	59
	3.7.2	Mesure du pH	60
	3.8 Dosage	des substrats et des produits de la fermentation par HPLC	60
	3.9 Mesure	es des activités amylasiques	61
	3.9.1	α amylase	61
	3.9.2	amyloglucosidase	62

3.10 Analy	yse des gaz	62
3.10.1	Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	63
3.10.2	Mesure de l'O2 par polarographie et du CO2 par infrarouge	64
3.11 Expre	ssion des résultats	66
3.11.1	Evaluation de la biomasse, des substrats et des produits	66
3.11.2	Calculs des rendements des fermentations	67
3.11.3	Résultats des analyses des gaz	68
3.11.4	Résultats des activités enzymatiques	69
METAB	U POINT D'UNE TECHNIQUE DE SUIVI EN LIGNE DU SOLISME DANS LES FERMENTATIONS SOLIDES PAR SE DES GAZ	71
4.1 Introdu	ction	72
4.1 IIII.00u	CHOIL	12
4.2 Automa	atisation de la mesure de gaz	73
4.2.1	Acquisition des données à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse	73
4.2.2	Acquisition des données et pilotage à l' aide d'analyseurs spécifiques	76
4.3 Mise au	ı point d'un fermenteur prototype	81
4.3.1	Description du fermenteur	81
4.3.2	Comparaison des deux systèmes d'analyse des gaz	83
4.3.3	Différents modes opératoires du prototype de fermentation	84
4.4 Conclu	sion	86
5. ADAPTA	ATION DE Schwanniomyces castellii A LA CULTURE EN FS	88
5.1 Influen	ce de l'inoculum	89
5.1.1	Effet du taux d'inoculation	89
5.1.2	Effet de l'âge de l'inoculum	94

	, 9	Table des matièr
5.2 Contro	ole du pH dans les cultures de Schw. castellii en FS	96
5.2.1	Influence du pH initial	96
5.2.2	Effet de l'utilisation de différents tampons	98
5.3 Défini	itions des facteurs essentiels pour la croissance de Schw. castellii	99
5.3.1	Etude nutritionnelle	100
5.3.2	Effet de l'addition de vitamines et d'oligoéléments	105
5.4 Cinéti	ques de Schwanniomyces castellii en FS	106
5.5 Valida	ation expérimentale du calcul de μ par l'analyse du CO2	108
5.6 Concl	usion	109
	ATION DES METABOLISMES RESPIRATOIRE E ENTAIRE DE Schw. castellii PAR L'ENVIRONNEME	
GAZEU	X	110
6.1	Effet du taux d'aération sur la croissance	111
6.2	Pilotage du fermenteur en conditions non limitantes en O2	115
6.3	Changement du métabolisme aérobie en anaérobie	121
6.4	Conclusion	125
7 PPODI	CTION D'ALCOOL PAR Schw. castellii EN FS	104
7. PRODU	CHOND ALCOOL PARSCAW, castellit EN FS	126
7.1 Optim	isation de la production d'alcool en conditions mixtes d'aération	127
7.1.1	Influence de la teneur en urée, de l'aération et du pH initial	128
7.1.2	Effet de la teneur en urée et du pH initial	132
7.2 Potent	iel d'utilisation de Schwanniomyces castellii en FS	137
7.2.1		137
7.2.2	Fermenteurs utilisés	138
7.2.3	Bilan et cinétiques de la fermentation	139
7.2.4	Caractéristiques de la croissance et du support solide inerte	143
7.2.5	Discussion	147

7.3		Effet de la concentration en amidon, du rapport C/N et de l'O2	150
	7.3.1	Effet de la teneur en amidon	151
	7.3.2	Effet du rapport C/N	153
	7.3.3	Effet de l'oxygène	153
	7.3.4	Extraction de l'alcool	156
	7.3.5	Discussion	158
7.4	Concl	usion	158
		RVATION DES BILANS DE CHALEUR ET D'EAU	
CO	MMI	E CRITERE D'EXTRAPOLATION DE LA PRODUCTION	
D'H	ETHA	NOL PAR Schwanniomyces castellii EN FS	160
8.1	Formul	ation du critère d'extrapolation	161
8.2	Justific	ation de l'approche expérimentale	165
8.3	Fermer	ateurs utilisés	168
8.4	Evalua	tion expérimentale du critère d'extrapolation	169
	8.4.1	Profiles de température et d'humidité	169
	8.4.2	Comparaison des bioréacteurs petits et moyens	173
	8.4.3	Comparaison des bioréacteurs moyen, grand et pilote	175
8.5	Conclu	sion	178
9.	CON	CLUSION GENERALE	179
10.	REF	ERENCES	183
	ANN	EXE	198

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

L'amidon est l'une des molécules les plus abondantes dans la nature. Par voie de conséquence il constitue une source potentielle de sucres non négligeable. En effet, l'hydrolyse de l'amidon par les amylases et sa décomposition en sucres plus simples peut contribuer à résoudre des problèmes variés (production des aliments, contrôle de l'environnement par la maîtrise de la pollution, etc...).

Après les deux chocs pétroliers, un regain d'intérêt pour l'utilisation de ressources renouvelables a été constaté dans la communauté scientifique et industrielle dans le monde entier. Certes, l'amidon est beaucoup moins abondant que la cellulose mais son hydrolyse peut être réalisée d'une manière très efficace. De plus il constitue un substrat de choix bon marché pouvant être utilisé dans différents procédés développés en Biotechnologie et notamment dans la fermentation solide (FS).

Les Biotechnologies ont été employées depuis très longtemps aussi bien pour la préparation d'aliments fermentés, de fromages ainsi que pour le compostage. La découverte de la pénicilline et le développement d'une production efficace ont mené à l'utilisation intensive de la fermentation submergée (FSm) (HESSELTINE, 1987), à tel point qu'après la seconde guerre mondiale, la FS a été remplacée par la FSm dans les pays occidentaux (LONSANE et coll., 1991a). Un regain d'intérêt de la FS au cours de ces 10 dernières années a été observé dans le monde entier. Cependant l'exploitation commerciale des systèmes du type FS manque totalement de développement (LONSANE et coll., 1985), malgré les nombreux avantages que présente ce système sur la FSm conventionnelle (MITCHELL et LONSANE, 1991). A l'heure actuelle, les applications industrielles de la FS restent presque totalement confinées aux pays orientaux.

Les utilisations de la FS dans le cas des levures sont limitées. Par contre, pour les champignons filamenteux, elles sont nombreuses. Le domaine le plus important d'utilisation de cette méthode pour les levures concerne la production d'alcool. Seules les souches de *Saccharomyces* spp ont été utilisées, jusqu'à présent.

La production d'éthanol à partir de produits agricoles a développé un regain d'intérêt pour réduire la dépendance économique de chacun vis-à-vis du pétrole. En plus de la FSm conventionnelles, les systèmes du type FS constituent une autre solution, notamment dans le cas de l'utilisation directe de matériaux et sous-produits agricoles comme source carbonées (par exemple, la 13 Introduction

canne à sucre, la betterave, le sorgho doux, divers produits amylacés, etc...). Leur haute teneur en fibres et en solides n'est pas une limitation pour la FS. La fermentation directe de ces produits évite la dilution de l'éthanol obtenu par fermentation alcoolique (GIBBONS et coll. 1984).

Au cours de ces dernières années, Schwanniomyces castellii est apparu comme l'une des meilleures alternatives à l'emploi de Saccharomyces cerevisiae, classiquement utilisée pour la production d'éthanol à partir d'amidon voire de substrats amylacés (INGLEDEW,1987; DE MOT, 1990; CALLEJA et coll., 1982; LONSANE et coll., 1991b). Schwanniomyces castellii présente en effet de nombreux avantages d'ordre pratique et économique tels que l'absence d'une hydrolyse préalable de l'amidon en glucose, le caractère homofermentaire de la culture, et la production d'éthanol par fermentations associées ou mixtes. Par contre, sa faible tolérance à l'éthanol est un de ses points faibles. Elle peut-être surmontée en piégeant l'éthanol en continu. Ainsi conçu, ce procédé permet de réduire le coût de la distillation (SATO et coll., 1988).

L'utilisation des levures du genre Schwanniomyces en FS semble donc très intéressante pour la conversion directe d'amidon en alcool. Il s'agit d'une d'originalité de ce travail. A notre connaissance il n'existe aucune référence qui porte sur l'utilisation de levures amylolytiques à capacité fermentaire pour la production d'alcool en FS. Aussi, avons-nous retenu cette approche pour réaliser l'étude décrite dans ce mémoire.

Nos travaux ont porté sur l'utilisation de la bagasse, résidu de l'extraction du sucre à partir de la canne, comme support solide inerte de la fermentation, celle-ci étant imprégnée d'une solution nutritive à base d'amidon qui sert de source de carbone pendant la fermentation.

Nous avons considéré que la mesure des gaz en continu pourrait constituer un outil fiable, pratique et précis pour suivre le déroulement des fermentations en milieu solide. Il nous est apparu ainsi intéressant d'exploiter un tel système pour l'étude de l'adaptation de Schwanniomyces castellii à la culture en FS.

A ce titre, nous avons développé deux systèmes automatisés d'analyse des gaz permettant de suivre simultanément le déroulement de plusieurs fermentations, ainsi que de piloter des fermenteurs en conditions non limitantes en oxygène. Ces systèmes d'analyse permettent de se situer en temps réel dans le processus fermentaire.

14 Introduction

Nous avons entrepris des études visant à contrôler le métabolisme de *Schwanniomyces castellii* en FS par l'environnement gazeux, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. Ceci a été possible grâce à la mise en oeuvre d'un nouveau fermenteur prototype et à l' utilisation des systèmes d'analyse des gaz développés au cours de cette étude.

L'oxygène constitue un des facteurs limitants dans le cas des fermentations menées en conditions d'aérobiose. A cet effet, il nous est apparu important de mettre en place un système de régulation de la FS en conditions non limitantes en oxygène. La culture de *Schwanniomyces castellii* en FS nous a permis d'en décrire les principales caractéristiques.

La transformation d'amidon directement en alcool par Schwanniomyces castellii comprend deux étapes: Une étape correspondant à l'hydrolyse de l'amidon et une autre spécifique de la production d'alcool. Des travaux ont été réalisés pour étudier ces phénomènes en FS. Le potentiel d'utilisation des levures du genre Schwanniomyces a été estimé pour la conversion directe d'amidon en alcool par FS. Des études sur la production et l'extraction en continu de l'alcool sont décrités. Elles font l'objet de discussions en relation avec des travaux en cours actuellement.

Il nous est apparu important d'étudier la morphologie des cellules de *Schwanniomyces* castellii et leur mode d'attachement sur la bagasse, utilisée comme support. Une telle approche n'avait jamais été réalisée dans cette optique.

Une méthodologie nouvelle pour l'extrapolation (Scale-up) des FS, est présentée et discutée. Elle est basée sur la conservation des équilibres dans les bilans "chaleur" et "matière" (d'eau) dans le milieu solide. Ce critère d'extrapolation est original et représente un intérêt scientifique et industriel, car il ouvre une nouvelle voie pour l'exploitation industrielle de la FS.

APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

2. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

Cet aperçu bibliographique est divisé en deux parties : une première partie qui présente les concepts généraux de la fermentation solide et une deuxième partie qui décrit les caractéristiques du système amylasique et la capacité fermentaire de *Schwanniomyces*.

2.1 Fermentation solide (FS)

Nous présenterons des généralités, des applications et des synthèses approfondies sur les paramètres importants de la fermentation solide et nous nous attarderons sur la fermentation alcoolique réalisée en phase solide.

2.1.1 Généralités

La FS a été utilisée par l'homme depuis très longtemps aussi bien pour la préparation d'aliments fermentés, de fromages que pour le compostage. La découverte et le développement de la pénicilline ont conduit à l'utilisation extensive de la fermentation submergée (FSm) (HESSELTINE, 1987), au point qu'après la deuxième guerre mondiale, la FS a été remplacée par la FSm dans les pays occidentaux (LONSANE et coll., 1991a). A l'heure actuelle, les applications industrielles et l'automatisation de la FS restent presque totalement confinées aux pays orientaux.

Définition

Le terme "fermentation solide" est la traduction de l'anglais "solid state culture" ou "solid state fermentation", et il a fait l'objet de nombreuses définitions : pour HESSELTINE (1972) il s'agit d'une fermentation où le substrat est humidifié, plus tard il précise (1977a,b) que le substrat solide peut être en suspension. MOO-YOUNG et coll. (1983) désignent la FS comme un procédé où le microorganisme utilise un substrat insoluble dans l'eau. Pour AIDOO et coll. (1982) la FS se développe dans un matériel solide ou semi-solide et la fermentation est menée dans une matrice plus ou moins poreuse.

Nous retiendrons la définition proposée par LONSANE et coll., (1985) et reprise par ORIOL, (1987), à savoir: la FS concerne un procédé microbien où la culture se développe non seulement en surface mais aussi à l'intérieur d'une matrice poreuse solide et en l'absence d'écoulements de liquides. La matrice poreuse peut être constituée d'un substrat humide *per se* où d'un support inerte capable d'absorber les nutriments qui se trouvent dissous en solution.

Classification par rapport à la nature de la phase solide

Plusieurs classifications de la FS peuvent être établies en fonction du mode d'agitation, du type de microorganisme utilisé, de ses applications, etc.: (HESSELTINE, 1987; AIDOO et coll., 1982), dans le cadre de notre travail nous avons choisi une classification en fonction de la nature de la phase solide, on distingue alors deux types de fermentations:

*Milieu de culture imprégné sur un support inerte :

Dans ce type de fermentation, la phase solide n'est pas une source de substrat pour les microorganismes, les nutriments se trouvent dans une solution qui est adsorbée sur le support, p.e., bagasse de canne à sucre, polyuréthane, écorce de bois, éponge, amberlite, vermiculite, etc. (DU-FOUR, 1990; ORIOL et coll., 1988b; BARRIOS-GONZALEZ et coll., 1988; AURIA et coll., 1990; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1991b; GONZALEZ-BLANCO et coll., 1990).

* Culture solide d'une phase substrat-support :

La phase solide est constituée à partir d'un matériel assurant à la fois la fonction de support et de source de nutriments, à ce dernier cas correspondent la plupart des procédés de FS.

Avantages et inconvénients de la FS

La comparaison de la FS et la FSm a été souvent évoquée par plusieurs auteurs (MUDGETT, 1986; HESSELTINE, 1987; LONSANE et coll 1985):

Parmi les avantages de la FS on peut citer :

- * Simplicité du milieu de culture, souvent il suffit d'ajouter de l'eau
- * Diminution des contaminations résultant de la faible humidité du milieu de culture

- * Diminution des effluent liquides à traiter
- * Difficultés minimales pour une conduite des procédés en continu ou en semi-continu
- * Conditions de culture de la FS proches de celles des milieux naturels
- * Pour les fermentations traditionnelles la microflore du support sert d'inoculum
- * Aération facile due à la porosité du matériel
- * Utilisation directe des solides fermentés
- * Volume du fermenteur plus petit que dans la culture liquide, à quantité égale de substrat.

Inconvénients de la FS

- * Probablement le principal inconvénient est le risque d'une élévation excessive de la température
- * Régulation difficile des paramètres de culture
- * Prétraitements des supports
- * Problèmes de perte d'humidité pour les fermentations de longue durée
- * Inoculation très importante lorsqu'on n' utilise pas la microflore naturelle
- * Le rôle essentiel de l'humidité et de l'activité de l'eau

On note actuellement un regain d'intérêt pour la FS, aussi de très nombreux articles de recherche et de divulgation ont été publiés ces dernières années. Plusieurs mises au point bibliographique sur la FS sont également apparues dans la littérature, regroupant les caractéristiques des FS, les dispositifs et les procédés utilisés, les aspects fondamentaux du transfert de masse et de chaleur, le dessin des bioréacteurs, et d'autres aspects fondamentaux et appliqués (HESSELTINE, 1972; HESSELTINE, 1977; CANNEL et MOO-YOUNG, 1980a,b; KNAPP et HOWELL 1980; AIDOO, 1982; MOO-YOUNG et coll., 1983; LONSANE et coll., 1985; DOELLE, 1985; MUD-GETT, 1986; HESSELTINE, 1987; MITCHEL et LONSANE, 1991; LONSANE et coll., 1991a).

2.1.2 Applications de la FS

L'utilisation des cultures en phase solide n'est pas récente. De nombreuses fermentations alimentaires et agricoles basées sur ce principe ont été pratiquées traditionnellement depuis long-temps dans le monde entier. La diversité des applications industrielles de la FS fait apparaître un nombre très important de domaines d'applications. Des exemples sont donnés dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 Domaines d'application de la fermentation solide.

Domaine d'application	Produit	Microorganismes	Référence
Aliments fermentés	Fromages	Penicillium spp	LARROCHE et GROS, 1989
	Koji	Aspergillus orizae	RAIMBAULT, 1980
	Pozol	Lactobacillus spp et levures	SAUCEDO-CASTANEDA, 1987
	Pain	Levures	
	Cacao	Levures et Acetobacter spp	SANCHEZ, 1983
Aliments fermentés	A partir des fibres	Aspergillus terreus	GONZALEZ-BLANCO et coll, 1990
enrichis en protéines (AFEP)	A partir des amylacés	Aspergillus niger	RAIMBAULT, 1980
Production d'enzymes	Amylases	Aspergillus	ORIOL et coll., 1988a
	Proteases	Aspergillus	FUKUSHIMA, 1982
	Cellulases	Trichoderma	ROUSSOS, 1985
	Pectinases	Aspergillus	DUFOUR, 1990
Métabolites secondaires	Arômes	Penicillium et Propinebacterium	REVAH et LEBEAULT, 1988
	Pénicilline	Penicillium	BARRIOS-GONZALEZ et coll., 1988
	Tétracycline	Streptomyces viridifaciens	YANG et LING, 1989
	Aflatoxines	Aspergillus flavus	BARRIOS-GONZALEZ et coll., 1990
Acides organiques	Acide citrique	Aspergillus niger	HANG et WOODADAMS, 1987
	Acide gallique	Aspergillus niger	RAIMBAULT, 1980
	Acide gibérellique	Giberella fujikori	KUMAR et LONSANE, 1987a, b
Production d'alcool	Ethanol	Saccharomyces spp	GIBBONS et WETSBY, 1988a
Production de spores	Inoculum	Penicillium spp	LARROCHE et coll., 1986
	Lutte biologique	Trichoderma harzianum	ROUSSOS, 1985
Compostage	Compost	Flore mixte	AIDOO et coll., 1982
Ensilage	Ensilage	Lactobacillus spp	SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990a, c
Champignons supérieurs	Pleurotus	Pleurotus spp	ZADRAZIL, 1975
Filtres Biologiques	Eaux traités	Flore mixte	AIDOO et coll., 1982

Parmi les microorganismes impliqués dans les procédés de FS on constate que les champignons filamenteux, constituent la flore microbienne prédominante. Par ailleurs le rôle des levures est intéressant dans certaines applications, spécialement dans les aliments fermentés, ainsi que dans la production d'éthanol en culture en phase solide.

Cependant, nous avons constaté qu'en dehors de la fermentation alcoolique, l'utilisation des levures en FS est limitée. Les rares exemples rencontrés dans la littérature concernent l'enrichissement en protéine et la production d'enzymes (GRANT et coll., 1978; TANNER et coll., 1980; ROSSI et CLEMENTI, 1985; YANG, 1988; SATO et coll., 1983).

Tous ces exemples d'application de la FS nécessitent la connaissance ou la maîtrise d'un certain nombre de paramètres : caractéristiques de la croissance, importance de la quantité et de l'activité de l'eau, contrôle de l'environnement et des échanges gazeux, contrôle de la température, rôle du pH et estimation de la biomasse. Ces paramètres ont été considéré comme essentiels pour la FS. Ils feront l'objet de développements ultérieurs. Cependant, il existe d'autres paramètres importants tels que les problèmes d'extrapolation, la production d'inoculum, etc., qui ont déjà été évoqués dans la bibliographie (AIDOO, 1982; MOO-YOUNG et coll., 1983; LONSANE et coll., 1985; DOELLE, 1985; MUDGETT, 1986; HESSELTINE, 1987; LONSANE et coll., 1991c).

2.1.3 Caractéristiques de la croissance des microorganismes

Les champignons filamenteux, sont les mieux adaptés à la culture en FS grâce a leur capacité à coloniser les surfaces solides. Caractéristique rarement présente dans les bactéries et les levures. La colonisation s'opère par allongement apical et ramification des filaments. Cette croissance, permet l'approvisionnement en nutriments du mycélium au cours de la fermentation (RAIMBAULT, 1980) en particulier lorsque le substrat joue également le rôle de support.

Les bactéries et les levures, se développent non seulement à la surface mais aussi et surtout dans les cavités du support utilisé (RAMESH et LONSANE, 1991; ROSSI et CLEMENTI, 1985).

Il est probable que les gradients à l'intérieur de la matrice solide, affectent le développement microbien, aussi bien pour les champignons que pour les bactéries et les levures.

2.1.4 Importance de la quantité et de l'activité de l'eau (Aw)

En FS la capacité de rétention d'eau du support détermine la quantité maximum de liquide présent dans la phase solide. Selon DOELLE (1985) l'exigence en eau des microorganismes peut être exprimée quantitativement en se référant à l'activité de l'eau (Aw). Le rapport sigmoïde (isothermes de sorption) entre la quantité d'eau (humidité) et l'activité de l'eau définit trois régions de disponibilité de l'eau pour les microorganismes: une première zone dans laquelle la disponibilité est quasi-nulle ($0 \le Aw \le 0.2$), une seconde à disponibilité intermédiaire ($0.2 \le Aw \le 0.6$) et une dernière zone où l'eau libre ($0.6 \le Aw \le 0.99$) autorise la croissance. C'est dans cette dernière région (humidité $\ge 50\%$) que le développement microbien peut se faire en FS.

D'une manière générale les exigences en eau libre des bactéries $(0.85 \le Aw \le 0.99)$ sont bien supérieures à celles des levures $(0.75 \le Aw \le 0.9)$ et des champignons $(0.60 \le Aw \le 0.9)$. L'eau intervient dans la constitution des microorganismes, mais aussi en FS dans la diffusion des enzymes, des nutriments et des produits au travers la matière solide (ORIOL, 1987). Il est important de remarquer que l'eau libre ne doit pas être trop abondante pour ne pas réduire la porosité du matériel et par conséquence diminuer les échanges gazeux.

Etant donné l'importance cruciale de l'humidité du milieu de culture et de l'Aw dans la FS, un grand nombre d'auteurs ont entrepris des études visant à mettre en évidence le rôle de ces deux paramètres (RAIMBAULT, 1980; ORIOL, 1988a; GERVAIS et BAZELLIN, 1986). D'autre part, SATO et coll. (1983) ont mis au point un modèle mathématique pour étudier la croissance des microorganismes en FS en utilisant comme support la pulpe de bois imprégnée de milieu de culture. Les résultats obtenus avec *Candida lipolytica*, ont montré que l'augmentation du taux spécifique de croissance est directement liée à l'humidité du milieu de culture ainsi qu'à l'humidité relative de l'air passant à travers le fermenteur. Suite à cette observation NARAHARA et coll. (1984) ont proposé un nouveau système de ravitaillement en eau qui consiste à introduire de l'air humidifié dans le fermenteur.

Les résultats antérieurs ont permis de concevoir de nouveaux systèmes de régulation de l'humidité et de la Aw au cours de la FS. La méthode la plus simple consiste à utiliser des réacteurs agités (RHODES et NORTON, 1975; RAIMBAULT, 1980; DURAND et CHEREAU, 1988) permettant d'homogénéiser le milieu de culture, d'y ajouter de l'eau et de contrôler la température. Le

principal inconvénient de cette méthode est la détérioration du mycélium des champignons, problème qui ne se pose pas pour les cultures de levures (SATO et coll., 1988; GIBBONS et coll., 1984).

Dans le cas des fermenteurs statiques, la seule possibilité de réguler l'humidité et l'Aw au cours de la FS est de modifier l'équilibre entre la phase solide humide et l'humidité relative de l'air passant à travers le fermenteur. Ceci peut être obtenu en modulant la température et l'humidité relative de l'air à l'entrée du fermenteur. A cet effet, plusieurs systèmes de régulation automatique de l'humidité s'appuyant sur des propriétés comme le point de rosé et la chaleur latente d'évaporation de l'eau on été proposés (GERVAIS et BAZELIN, 1986; BARSTOW et coll. 1988; RYOO et coll., 1991).

Les systèmes de contrôle des FS doivent toujours prendre en compte simultanément l'humidité du milieu et la température.

2.1.5 Contrôle de l'environnement et des échanges gazeux

Dans la plupart des procédés de FS, aussi bien au niveau du laboratoire qu'au stade industriel, l'aération des milieux de culture se fait par injection d'air comprimé stérile à travers les fermenteurs. Les échanges gazeux sont réalisés entre l'air et la matrice solide. En faisant une analogie avec les réacteurs catalytiques MOO-YOUNG et coll. (1983) distinguent deux types de mécanismes dans le transfert de gaz :

- * Le transfert inter-particule qui concerne les échanges de masse par convection entre la phase gazeuse et l'interphase gaz-solide. La porosité interparticulaire est définie comme l'espace vide occupé par l'air au sein du support. Cette porosité est fonction aussi bien de la nature du matériau utilisé comme support, que de la quantité de milieu de culture et de la vitesse de l'air traversant le fermenteur.
- * Le transfert intra-particulaire concerne la diffusion de l'O2 et du CO2 entre l'interphase solide-gaz et l'intérieur de la matrice solide.

La quantité d'eau absorbée sur le support doit être suffisamment abondante pour faciliter la diffusion dans la phase solide sans pour autant diminuer la porosité et le transfert de masse par convection.

Par ailleurs, la composition en CO2 et en O2 de la phase gazeuse affecte d'une manière importante le métabolisme des microorganismes cultivés en FS. RATHBUN et SHULER (1983) ont mesuré des gradients très importants pendant la fermentation du tempeh. En oxygénant un lit de 6,3 cm d'épaisseur avec de l'air ils observent que le gaz effluent ne contient plus que 2 % d'O2 et 21 % de CO2. BAJRACHRYA et MUDGET (1980) ont mis en évidence l'effet positif de l'O2 sur la synthèse d'amylases chez Aspergillus oryzae. De même, NARAHARA et coll. (1982) obtiennent de meilleurs rendements de production pour une pression partielle en CO2 relativement faible (2-5 %). Une production élevée d'enzymes ou d'autres métabolites est directement liée à l'aération. Grâce à cette observation, la conception de divers systèmes de régulation de l'aération a abouti au renouvellement complet de l'atmosphère gazeuse dans le fermenteur, ce qui induit une amélioration des échanges gazeux et par voie de conséquence des performances des FS.

Le transfert de masse interparticulaire est un de paramètre à considérer pour le contrôle de la FS. Ainsi, une méthode pour la détermination du KIa (coefficient volumique du transfert de masse) a été proposé par DURAND et coll. (1988). Les résultats obtenus démontrent que l'augmentation du KIa est dûe aussi bien à l'augmentation de la vitesse de l'air qu'à la diminution de l'humidité du milieu (Tableau 2.2).

Tableau 2.2.- Influence du débit d'aération et de l'humidité du milieu sur le Kia en FS (d'après DURAND et coll. 1988)

Débit d'air, (l/min)*	Kla, (h ⁻¹)	Humidité, %	Kla, (h-1)**
2	1140	75,0	1175
5	1175	70,0	1880
10	2650	67,5	2280
15	3050	65,0	2350

^{*} à 75 % d'humidité

^{**} à un débit d'air de 5 l/min

Les valeurs du Kla obtenues en FS sont beaucoup plus importantes qu'en FSm. Ces résultats confirment que l'aération des cultures ne pose pas un problème grave pour la FS. L'existence d'une interphase gaz-solide et le transfert de masse à travers un film hypothétique (couche limite) rend le problème de l'aération moins aigu qu'en FSm.

2.1.6 Contrôle de la température

Le contrôle du dégagement de la chaleur produite par l'activité microbienne au cours de la fermentation a été qualifié par HESSELTINE (1987) comme le principal problème de la FS. Ceci est dû aux concentrations en substrat et en microorganismes localement très élevées, à la faible teneur en eau, à l'absence de mélange dans les FS statiques, ainsi qu'à la faible conductivité thermique des matériaux biologiques (MOO-YOUNG et coll., 1983; GRAJEK, 1988; BARSTOW et coll., 1988; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1990b; GONZALEZ-BLANCO et coll., 1990).

La production de chaleur dans la fermentation solide peut atteindre 3200 Kcal/kg de matière sèche (de substrat qui tient lieu également du support) (RATHBUN et SHULER, 1983), tandis que la vitesse de génération de chaleur est de l'ordre de 80 Kcal/hr kg de matière sèche (RAIM-BAULT, 1980). Ceci provoque des phénomènes de surchauffe au sein de la masse de la FS, qui influent directement sur l'activité microbienne. En fonction des conditions de culture, divers gradients de température dans le lit de fermentation sont rapportés: 3°C/cm (RATHBUN et SHULER, 1983); 2,5°C/cm (RAIMBAULT, 1980; HUERTA, 1984); 4-5°C/cm (SAUCEDO-CASTA-NEDA et coll., 1990b; GONZALEZ-BLANCO et coll., 1990).

L'énergie produite au cours de la FS doit être éliminée aussitôt, car l'augmentation excessive de la température affecte négativement la croissance microbienne (LONSANE et coll. 1985). Dans la pratique, le contrôle de l'air traversant dans le fermenteur est le meilleur moyen de réguler simultanément la température et l'humidité, (GRAJEK, 1988). La régulation de la température est effectivement possible en utilisant le refroidissement évaporatif, "evaporative cooling", (BAR-STOW et coll. 1988; RYOO et coll., 1991). En effet, grâce à la chaleur latente d'évaporation de l'eau (580 Kcal/mole) il est possible d'absorber la chaleur métabolique. Par exemple, si était le seul mécanisme d'évacuation de la chaleur, il faudrait évaporer environ 100 g d'eau par Kg de ma-

tière sèche, soit environ 10 % de l'eau initialement présente dans la FS.

A cet effet plusieurs études ont été réalisées pour mieux comprendre et améliorer le transfert de chaleur dans la FS.

LONSANE et coll. (1985) soulignent l'absence de modèles mathématiques relatifs à ces effets d'évaporation et concernant la FS. En fait étant donné l'hétérogénéité des milieux de culture rencontrés en FS, l'établissement de modèles mathématiques est difficile. FINGER et coll. (1976) proposent et vérifient un modèle diffusif pour le transfert de chaleur et de masse au cours du compostage. Ce modèle permet aussi bien de prédire les régions où la dégradation de la paille est maximale que de simuler les profils de température à l'intérieur du compost. LAI et coll. (1989) proposent une méthodologie pour l'estimation de la diffusivité thermique, paramètre important dans les études du transfert de chaleur. Un peu plus tard SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll. (1990b) proposent un modèle pour estimer la génération et le transfert de la chaleur dans la FS. La modélisation fait une analogie entre la FS et la catalyse hétérogène en considérant autant le transfert de chaleur par convection que par conduction. La vérification expérimentale de ces deux mécanismes mène à l'estimation quantitative des nombres adimensionnels Peclet (Pe), et Biot (Bi) de chaleur. Les résultats obtenus démontrent que le transfert de chaleur à travers la masse de FS est la principale limitation au dégagement de la chaleur.

Par ailleurs, d'un point de vue pratique, plusieurs auteurs ont établi des stratégies pour la régulation de la température, la plupart axées sur une convection forcée d'air à travers le fermenteur. Plusieurs auteurs (GERVAIS et BAZELIN, 1986; BARSTOW et coll., 1988; DURAND et CHEREAU, 1988; RYOO et coll., 1991; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1991b) mettent en oeuvre des systèmes automatiques de régulation de l'humidité et de la température en utilisant les propriétés refroidissantes de l'évaporation de l'eau dans la FS. GRAJEK (1988) préfère l'utilisation de microorganismes thermo-résistants pour qui les exigences en air de refroidissement sont deux fois plus faibles que celles relevées au cours de cultures mésophiles.

2.1.7 Contrôle du pH

L'hétérogénéité et la faible teneur en eau du milieu de culture constituent des obstacles à une mesure satisfaisante du pH. Pour les études en laboratoire et dans la majorité des cas, le pH est mesuré après la mise en suspension de l'échantillon solide dans un volume plus important d'eau (5 à 10 fois). Cette méthode permet de mesurer un pH global. Cependant, elle ne tient pas compte des gradients de pH dans la matrice solide dûs aux gradients de concentration d'ions et de CO2 résultants des réactions biologiques. Le contrôle du pH dans la FS peut être réalisé aussi bien en intervenant sur les valeurs du pH initial que par l'utilisation de sels minéraux qui confèrent au milieu un pouvoir tampon. RAIMBAULT (1980) a démontré qu'un mélange salin de sulfate d'ammonium et d'urée, en proportions adéquates, permet de maintenir le pH à des valeurs favorables pour la croissance de *A. niger*. Par la suite, cette technique a été utilisée également par d'autres auteurs: HUERTA, 1984; ROUSSOS, 1985; ORIOL, 1987; DUFOUR, 1990.

Dans le but de réaliser une régulation directe du pH, RAIMBAULT (1980) a utilisé une sonde en verre, le pH du milieu est corrigé par addition d'une solution d'urée, ainsi une régulation à 0,2 unité de pH est obtenue dans un fermenteur pilote (1200 l). Un peu plus tard, DURAND et CHEREAU (1988) rapportent l'utilisation directe d'une sonde de pH conventionnelle pour réaliser les mesures sur pulpe de betterave (76 - 78% d'humidité). Les mêmes auteurs indiquent que le film de liquide à la surface de la pulpe est suffisant pour permettre d'atteindre l'équilibre ionique, nécessaire pour la mesure du pH.

2.1.8 Détermination de la biomasse en FS

La mesure de la biomasse pour suivre la croissance des champignons filamenteux cultivés par FS reste un point délicat. Les techniques couramment utilisées en FSm sont inutilisables en FS. Dans la plupart des cas on est obligé d'utiliser des méthodes indirectes de détermination de biomasse. Les dosages sont difficiles à cause des risques d'interférence des méthodes chimiques augmentés par l'hétérogénéité du milieu. Les méthodes de dosage les plus couramment utilisées sont le dosage de protéines, de la glucosamine, des acides aminés (Ninhydrine), des acides nucléiques et la précipitation des protéines à l'acide trichloroacétique (ORIOL, 1987).

Dans le cas de la culture de levures en FS, la détermination de la biomasse pose moins de problème. L'analyse est réalisée après la mise en suspension de l'échantillon. Une forte agitation en présence de Tween 80 (0,01%) permet de séparer les cellules du support solide. La suspension cellulaire est récupérée par simple filtration. On peut appliquer à cette suspension cellulaire les méthodes de dosage couramment utilisées en FSm (SATO et coll., 1983; SATO et YOSHIZAWA., 1988; BRYAN, 1990).

Récemment AURIA et coll. (1990) ont proposé d'utiliser la chute de pression à l'intérieur du fermenteur pour suivre la croissance de A. niger cultivé sur amberlite.

Par ailleurs, plusieurs auteurs préconisent la mesure des gaz (CO2 et O2) au cours de la fermentation comme une méthode indirecte de suivi en ligne de l'avancement de l'activité microbienne. A partir des teneurs en CO2 et O2 on peut prédire l'évolution de la biomasse (GRANT et coll. 1978; RAMSTACK et coll., 1979; NISHIO et coll., 1979; OKASAKI et SUKAMA, 1979; RAIMBAULT, 1980; SATO et coll., 1983; SATO et YOSHIZAWA, 1988).

Les méthodes de dosage les plus couramment utilisées sont la chromatographie en phase gazeuse et l'emploi d'analyseurs spécifiques pour l'O2 et le CO2.

2.1.9 Production d'alcool en FS

La production d'éthanol à partir de produits agricoles a connu un regain d'intérêt pour réduire la dépendance économique du pétrole. Les systèmes de FS représentent une alternative à la FSm conventionnelle, notamment dans le cas de l'utilisation directe de matériaux et sous-produits agricoles comme sources de carbone, p.e., la canne à sucre, la betterave, le sorgho doux, ainsi qu'une grande variété de produits amylacés riches en carbohydrates. Leur haute teneur en fibres et en solides ne sont pas une limitation pour la FS. La fermentation directe de ces produits par FS, évite la dilution de l'éthanol obtenu lors de la fermentation alcoolique; même une concentration apparente des carbohydrates peut être réalisée par déshydratation partielle des substrats agricoles (GIB-BONS et coll. 1984). Il faut rappeler qu'une concentration en éthanol de 8-10 % (v/v) est nécessaire dans l'industrie pour rendre rentable la distillation (De MOT et coll., 1985).

Dans le tableau 2.3 sont rassemblés quelques exemples de production d'éthanol par FS. Parmi les substrats utilisés comme source de carbohydrates on retrouve: Betterave, déchets de raisin, manioc, riz, maïs, déchets de pomme de terre et sorgho doux. Le microorganisme le plus couramment utilisé est *Saccharomyces cerevisiae*. De part la nature de la FS, les teneurs en substrats et en alcool sont exprimées par rapport au poids de solide mis en jeu.

De nombreux travaux de recherche ont été réalisés dans ce domaine. Parmi ceux-ci on peut remarquer les activités du groupe de W.R GIBBONS et C.A. WESTBY (1986) présentant un intérêt particulier. Ils ont mis au point un fermenteur continu, de type vis sans fin (longueur 4.7 m x 15.2 cm diamètre) à échelle "intermédiaire" qui permet la production d'éthanol à partir de sorgho par FS. La récupération de l'alcool est réalisée par distillation. La production est de 177 l d'éthanol /tonne de sorgho, soit un rendement de 85 % par rapport au rendement théorique. La pasteurisation et l'acidification du substrat ont permis de remédier au développement des contaminants et à la difficulté de contrôle du pH, problèmes majeurs rencontrés lors de l'adoption de ce système. Ainsi il ont pu maintenir la fermentation stable pendant 200 heures.

La production d'éthanol par la FS peut également se faire en utilisant un fermenteur à recirculation du gaz. Ce procédé chinois, mis au point par la brasserie Kaoliang à été repris par HES-SELTINE (1987) et LAI et coll. (1989). Au cours de la fermentation, l'éthanol est récupéré en continu grâce à la recirculation du gaz à travers un condenseur ; ainsi, on diminue le problème d'inhibition de l'éthanol. FUJIO et coll. (1984) ont adapté ce système de fermenteur pour la production d'alcool par *Rhizopus koji* à partir de manioc.

Par la suite K. SATO et coll. (1985 et 1988) ont mis au point un fermenteur pilote d'une capacité de 20 kg, utilisant la même technique. Les rendements de production d'éthanol sont de l'ordre de 80% par rapport au rendement théorique (Tableau 2.3). L'efficience de récupération de l'éthanol est de 96 % pour un condensat à 223 g/l. Les principaux inconvénients de ce procédé sont d'une part une fermentation de longue durée (11-16 jours) et d'autre part la nécessité d'utiliser des enzymes exogènes afin d'hydrolyser l'amidon. Par ailleurs, les résultats obtenus par SATO et YOSHIZAWA (1988) ont démontré que le rendement de conversion de l'amidon en alcool dépend directement de l'humidité du substrat. Ceci confirme le rôle important de l'eau dans les FS.

Tableau 2.3 .- Systèmes de production d'alcool par fermentation solide.

Système de fermentation			Humidité	Humidité Substrat			Ethanol		Référence
Hydrolyse du substrat		e du substrat Fermentation		ubstrat Fermentation Source Teneur		Teneur Rendement			
Enzymes	Microorganisme	Microorganisme	(%)				*	(h)	
-	-	S. cerevisiae	75	Betterave	-	-	92	-	KIRBY et MARDON, 1980
-	-	S. cerevisiae	-	Ananas	-	4 % (v/v)		24	LATENGAN et coll., 1984
-	-	S. cerevisiae	≈ 83	Betterave	11,5 % (p/p)	8 % (v/v)	-	-	GIBBONS et coll., 1984
-	Rhizopus koji	Rhizopus koji	≈ 70	Manioc	-	14 % (v/v)	83	96	FUJIO et coll., 1984
amylase	A. saitoi	S. cerevisiae	52	Riz	869 g/kg MSI	-	78	360	SATO et coll., 1985
amylase	A. saitoi	S. cerevisiae	55	Maïs	817 g/kg MSI	-	81	384	SATO et coll., 1985
amylase	A. saitoi	S. cerevisiae	55	Pomme terre	887 g/kg MSI	-	77	384	SATO et coll., 1985
amylase	A. saitoi	S. cerevisiae	56	Manioc	873 g/kg MSI	-	81	384	SATO et coll., 1985
-	-	S. cerevisiae	70	Sorgho	150 g/kg MSI	6,7 % (v/v)	69	40	KARGI et coll., 1985
-	-	S. cerevisiae	65	Sorgho	150 g/kg MSI	9,6 % (p/p)	87	70	KARGI et CURME, 1985
-	-	S. cerevisiae	≈ 7 0	Raisin	137 g/l	5.3 % (p/p)	82	96	HANG et coll., 1986
-	-	S. cerevisiae	≈ 83	Sorgho		6 % (v/v)	85	72	GIBBONS et coll., 1984
-	-	S. cerevisiae	≈ 83	Betterave		-	80	40	GIBBONS et WETSBY, 1986
-	-	S. cerevisiae	-	Glucose	200 g/l	-	90	-	ROTTENBACHER et coll., 198
amylase	-	S. cerevisiae	≈ 70	Manioc	165 g/l	5.3 % (p/p)	65	72	JALEEL et coll., 1988
-	-	S. cerevisiae	≈ 7 2	Betterave	-	8,3 % (v/v)	80	24	COCHET et coll., 1988
-	-	S. cerevisiae	≈ 83	Betterave	-	9 % (v/v)	-	264	GIBBONS et coll., 1988
Amyloglud	cosidase	S. cerevisiae	57	Maïs	818 g/kg MSI	-	87	264	SATO et coll., 1988
Amyloglu	cosidase	S. cerevisiae	30-70	Maïs	-	-	31	288	SATO et YOSHIZAWA, 1988
-	-	S. cerevisiae	≈ 70	Sorgho	-	6.7 % (p/p)	80	40	BRYAN, 1990

^{*:} Rendement de conversion d'alcool par rapport au rendement théorique de 56 g d'alcool par 100 g d'amidon.

MSI: Matière séche initiale

En ce qui concerne le taux d'inoculation en levures, plusieurs études proposent (Tableau 2.4), des valeurs oscillant aux alentours de 1 x 10⁷ cellules par g. Ceux-ci sont très proches du taux d'inoculation couramment utilisés avec des spores de champignons filamenteux en FS (RAIM-BAULT, 1980; ROUSSOS, 1985).

Enfin il est important de remarquer que l'utilisation d'enzymes ou de microorganismes, externes à la fermentation, pour hydrolyser l'amidon à été envisagée par différents auteurs (Tableau 2.3). A notre connaissance il n'existe aucune référence qui porte sur l'utilisation de levures amylolytiques à capacité fermentaire pour la production d'alcool en FS. Aussi nous avons retenu cette approche comme vecteur de la présente étude, le microorganisme retenu étant *Schwanniomyces castellii*.

Tableau 2.4 Taux d'inoculation en levures utilisés dans la fermentation alcoolique en phase solide.

Référence		Taux d'inoculation
KIRBY et MARDON	1980	9 g/l
LATENGAN et coll.	1984	1 x 10 ⁷ cellules par g
KARGI et coll.	1985	7 x 108 cellules par g
SATO et YOSHIZAWA	1988	1 x 10 ⁶ cellules par g
COCHET et coll.	1988	1 x 108 cellules par g
BRYAN	1990	0,2 % (p/p)

2.2 Schwanniomyces

Au cours de cet aperçu bibliographique nous soulignerons les caractéristiques spécifiques de Schwanniomyces, en particulier sa capacité à hydrolyser l'amidon et à produire de l'alcool simultanément. Nous discuterons également de la toxicité de l'alcool vis à vis de la viabilité cellulaire ainsi que de l'activité et de la biosynthèse des amylases.

2.2.1 Introduction

Le genre Schwanniomyces appartient au groupe des levures ascoporogéniques, dont les caractéristiques ont été décrites par PHAFF et MILLER (1984). Ce genre de levures a été identifié en 1909 par KLOECKER, qui a nommé comme Schwanniomyces occidentalis une levure isolée du sol de St. Thomas. Plus tard, en 1957, A. CAPRIOTTI de l'Université de Perugia (Italie), isole d'autres levures du sol en Espagne, et propose une nouvelle espèce, Schwanniomyces castellii. D'après la classification actuelle (KREGER VAN RIJ, 1984) le genre ne comprend plus qu'une espèce, divisée en deux variétés Schwanniomyces occidentalis Klöecker var. occidentalis et Schwanniomyces occidentalis Klöecker var. personii.

A partir des années 70 de nombreuses études fondamentales et appliquées ont été réalisées concernant les levures du genre *Schwanniomyces*. Les premiers travaux ont porté sur la production de protéines unicellulaires, suivis très rapidement par la caractérisation biochimique de son système enzymatique, les mécanismes d'excrétion et d'action des différentes enzymes, la production d'alcool à partir de matériaux amylacés, les rôles de différentes voies respiratoires, ainsi que sur les améliorations génétiques des souches.

Le système amylasique chez Schwanniomyces, sa capacité fermentaire, ainsi que ses propriétés nutritionnelles sont des facteurs qui ont contribué à l'intérêt croissant de la communauté scientifique et industrielle, notamment depuis le début des années 80. D'ailleurs, cette levure à été qualifiée de "super levure" par INGLEDEW (1987). Notre recherche bibliographique nous permet d'affirmer qu'il existe plus de cent travaux scientifiques publiés dans différents journaux et congrès nationaux et internationaux. Une dizaine de brevets ont été déposés en France, aux Etats Unis, en Autriche, au Canada et au Japon.

Suite à cette introduction nous allons présenter les aspects les plus remarquables de Schwanniomyces en vue de sa culture en phase solide.

2.2.2 Production de protéine unicellulaire

Dans les années 70, plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'utilisation de ces levures pour la production d'aliments à partir d'amidon (MENEZES et coll., 1972; OTENG-GYANG, 1979).

Quelques exemples de telles applications en FSm sont rassemblés dans le Tableau 2.5. Il est à remarquer que le rendement de formation de biomasse (Yx/s) reste relativement constant dans des valeurs variant de 0,4 à 0, 6 environ, tandis que la concentration en substrat utilisé est relativement faible (< 10 % P/V). Néanmoins, il a été indiqué qu'une diminution sensible du rendement en biomasse peut être observée en présence de concentrations plus importantes en amidon (MO-RESI et MEDICI, 1989). Par ailleurs, MORESI et MEDICI (1989) ont récemment publié des données concernant les rapports stœchiométriques de la conversion d'amidon en biomasse de Schw. castellii.

Tableau 2.5.- Exemples de production de protéine unicellulaire de *Schwanniomyces* cultivé sur différents substrats en culture submergée.

Sou	che	Subst	trat	I	Biomasse		Référence
		Source	Teneur	Y x/s	Azote	Protéine	
			g/l		%	%	
Schw. castellii	UCD587	Glucose	20,0	-	7,2	39,8	MARTINI et coll., 1975
Schw. castellii	UCD587	Glucose	20,0	-	7,8	37,0	MARTINI et MARTINI, 1976
Schw. castellii	UCD587	Glucose	20,0	-	7,2	42,0	MARTINI et coll., 1979
Schw. castellii	CBS 2863	Amidon-YNB	4,0	0,45	-	42,0	TOUZI et coll., 1982
Schw. castellii	CBS 2863	Manioc	15,0	0,44	-	41,0	TOUZI et coll., 1982
Schw. castellii	CBS 2863	Inuline	5,0	0,45	6,0	35,5	APAIRE et coll., 1983
Schw. castellii	IMAT 3754	Pomme terre	100,0	0,38	7,8	40,5	CLEMENTI et ROSSI,1985
Schw. castellii	IMAT 3754	Amidon-YNB	20,0	0,44	-	30,2	CLEMENTI et ROSSI,1985
Schw. castellii	IMAT 3754	Pomme terre	35,0	0,42	7,6	47,4	MORESI et coll., 1983
Schw. castellii	CBS 2863	Amidon soluble	100,0	0,49	-	-	MALFAIT, 1986
Schw. alluvius	ATCC 26074	4 Pomme terre	40,0	0,51	8,4	52,7	CALLEJA et coll., 1986a
Schw. castellii	CBS 2863	Amidon soluble	10,0	0,59	-	-	BOZE et coll., 1987a
Schw. castellii	IMAT 3754	Pomme terre	3,0	0,75	7,5		MORESI et MEDICI, 1989
Schw. castellii	IMAT 3754	Pomme terre	30,0	0,50	8,1	-	MORESI et MEDICI, 1989
schw. castellii	IIVIA 1 3/34	гонине исте	30,0	0,30	0,1	-	MOREST ET MEDICI, 1989

Y x/s: Rendement de conversion du substrat en biomasse, g substrat consommé/ g biomasse formée

La plupart des publications concernent la culture submergée, exception faite de deux travaux où la culture a été réalisée en phase solide (Tableau 2.6), où elle s'opère soit en colonnes (YANG, 1988), soit en pétrin (ROSSI et CLEMENTI, 1985); dans le dernier cas l'enrichissement en protéine peut atteindre 12.7 % par rapport à la matière sèche, le substrat utilisé étant de la pomme de terre.

Tableau 2.6.- Exemples de production de protéine unicelluraire de *Schwanniomyces* cultivé sur différents substrats en culture en milieu solide.

Souche		Su	bstrat		Biomasse		Référence	
		Source	Humidité	Y x/s	Protéine, % N	4S *		
			%		Augmentation	Final		
Schw. castellii	IMAT 3754	Pomme terre	-		12,7	16,5	ROSSI et CLEMENTI, 1985	
Schw. castellii	IMAT 3754	Manioc	-	-	6,0	9,4	ROSSI et CLEMENTI, 1985	
Schw. castellii	IMAT 3754	Blé	-	-	10,1	19,2	ROSSI et CLEMENTI, 1985	
Schw. castellii	IMAT 3754	Maïs			4,0	11,8	ROSSI et CLEMENTI, 1985	
Schw. castellii	CBS 2863	Pomme terre	65,5	0,24	2,3	-	YANG, 1988	

Y x/s: Rendement de conversion du substrat en biomasse, g substrat consommé/ g biomasse formée

En ce qui concerne la teneur en protéines et en azote les valeurs moyennes restent respectivement aux alentours de 40 et 7.4 % (Tableau 2.5). Cependant, l'observation de plus hautes concentrations en protéines est probablement due à leur estimation à partir du contenu total en azote. L'examen des acides aminés contenus dans les protéines de *Schwanniomyces* (Tableau 2.7) révèle une bonne représentation des acides aminés essentiels, cependant à un niveau légèrement inférieur à celui des normes de la FAO/WHO (d'après CALLEJA et coll., 1986a). Néanmoins, comme pour la plupart des levures utilisées pour la production de protéines unicellulaires, son utilisation pour des applications alimentaires est limitée par sa faible concentration en acides aminés soufrés. Parmi les nombreuses applications potentielles de *Schwanniomyces*, l'incorporation de cette biomasse à l'alimentation animale semble être une des principales voie de sa valorisation.

La teneur en protéines est donnée par rapport à la matière sèche du produit fermenté

Tableau 2.7.- Composition en acides aminées des protéines de Schwanniomyces

Acide amin	né		Souches de Schwanniomyces							
		Schw. caste	llii	Schw. cas	tellii	Schw. castellii	Schw. alluvius			
		UCD 587	(A)	CBS 2863	(B)	IMAT 26074 (C)	ATCC 26074 (D)			
Ile	+ 0	1	2,6		5,1	4,8	5,5	6,6		
Leu	+ 0		8,4		7,8	7,0	7,7	8,8		
Lys	+ 0		4,4		8,4	9,4	7,8	6,4		
Phe	+ 0		4,7		4,7	5,5	4,0	5,8		
Tyr	+		4,2		3,6	1,5	3,2	4,2		
Thr	+ 0		5,3		5,4	4,2	4,5	5,1		
Trp	+ 0		0,9		1,8	1,2	1,1	1,6		
Val	+ 0		6,5		5,5	5,7	5,5	7,3		
Cys	+		1,9		1,5	1,8	1,7	2,4		
Met	+ 0		1,2		1,8	1,0	1,1	3,1		
Asp		1	0,2		11,6	8,9	11,1	-		
Ser			5,1		5,8	4,6	4,4	-		
Glu		1	1,6		13,4	18,2	12,4	-		
Gly			4,9		4,8	4,8	4,3	-		
Ala			6,0		5,6	8,4	10,2	-		
Pro			3,5		4,1	4,3	3,0	-		
His	0		1,9		2,6	1,7	2,1	-		
Arg	0		5,3		6,3	5,3	10,5	-		

A:MARTINI et coll., 1979; B: APAIRE et coll., 1983; C: ROSSI et CLEMENTI, 1985; D: CALLEJA et coll., 1986a

2.2.3 Système amylasique

Schwanniomyces possède un système enzymatique particulier pour l'hydrolyse de l'amidon, constitué d'une α amylase et d'une amyloglucosidase (AUGUSTIN et coll., 1978; OTENG-GYANG, 1979). Cette caractéristique est rarement rencontrée chez d'autres microorganismes, en plus de Schwanniomyces, seulement deux levures, Lipomyces et Endomycopsis (levure non fermentaire), possèdent à la fois ces deux types d'amylases (AUGUSTIN, 1978; INGLEDEW, 1987). Ces amylases sont inductibles par différents substrats comme, l'amidon, les dextrines et le maltose (CLEMENTI et coll., 1980; OTENG-GYANG et coll., 1980a,b). Par ailleurs, il a été démontré que les enzymes de Schwanniomyces n'attaquent pas seulement les liaisons glucosidiques α-1,4 mais aussi les liaisons α-1,6. Ceci permet une hydrolyse complète de l'amidon (WILSON et INGLEDEW, 1982; SILLS et coll., 1984a et b). De plus, il a été démontré que la capacité d'exporter les amylases à l'extérieur de la cellule augmente de façon significative à la fin de la phase

^{*:} Protéine de l'oeuf entier utilisée comme référence par la FAO/WHO (1965)

^{+:} Acides aminés essentiels; o Acide aminé essentiel pour l'alimentation animale (d'après CALLEJA et coll., 1986)

exponentielle de croissance pour être maximale pendant la phase stationnaire (CLEMENTI et ROSSI, 1986; CALLEJA et coll., 1984; LUSENA et coll., 1985; CALLEJA et coll., 1986b).

Le système amylasique de *Schwanniomyces* a été l'objet de plusieurs études de caractérisation biochimique, dont les résultats sont rassemblés dans le Tableau 2.8.

Tableau 2.8.- Système amylolytique des levures appartenant au genre Schwanniomyces

Souche	Enzyme	Poids	pH		Température, °C		Référence
		Moléculaire	Ontinum	Non	Optimum	Non	
		Moleculaire	Opumum	dénaturant	Оринин	dénaturante	
Schw. castellii	α amylase	40 000	6	-	60		OTENG-GYANG
CBS 2863	amyloglucosidase I	90 000	6	-	60	-	et coll., 1981
	amyloglucosidase II	45 000	6	-	60	•	
Schw. alluvius	α amylase	61 900	6,3	4,5-7,5	40	< 40	WILSON et
UCD5843	amyloglucosidase	155 000	5	4-8	50	< 60	INGLEDEW, 1982
Schw. alluvius	α amylase	62 0000	6,3	4-7	40	-	SIMÕES-MENDES,
IGC 2829	amyloglucosidase	117 000	4,5	4-6	50	-	1984
Schw. alluvius	α amylase			5,5-6,5	30-40	< 60	SILLS et coll., 1984a
ATCC 26077	amyloglucosidase	-		4,2-5,5	40-50	< 60	
Schw. castellii	α amylase	-	4,5-7,2	6-7	45		CLEMENTI et
IMAT 3754	amyloglucosidase	-	4,2-5,5	-	45-52	-	ROSSI, 1986
Schw. castellii	α amylase	47 000			-	-	DOWHANICK
ATCC 26076	amyloglucosidase	122 000	-		-	-	et coll., 1988

La purification et la séparation des amylases de Schwanniomyces ont permis de confirmer l'existence de deux différents types d'enzymes: α amylase et amyloglucosidase (Tableau 2.8). Bien que OTENG-GYANG et coll. (1981) aient trouvé deux différents types d'amyloglucosidases, résultats non confirmés par d'autres auteurs, la variabilité observée dans les poids moléculaires peut être dûe aux différentes méthodologies d'analyse, ainsi qu'aux différentes souches utilisées.

D'après l'analyse du Tableau 2.8 on constate que, les deux enzymes sont thermolabiles, et qu'au dessus de 60 °C on observe une perte importante de leur activité. Le pH optimum d'activité de l'amyloglucosidase varie de 4,5 à 5, tandis que celui de l' \(\alpha \) amylase se situe aux environs de 6.

Plusieurs travaux traitant à la fois des paramètres cinétiques et du mode d'action des enzymes

ont été menés (BOZE et coll., 1988; PASARI et coll., 1988; DUBREUCQ et coll., 1989). Ainsi que pour l'amélioration génétique de *Schwanniomyces* en vue d'augmenter la production des amylases ont été importants. (DHAWALE et INGLEDEW, 1983; KATE et BARNETT, 1984; SILLS et coll., 1984; BOZE et coll., 1987; ABARCA et coll., 1988; BOZE et coll., 1989).

2.2.4 Production d'alcool à partir d'amidon par Schwanniomyces

Grâce à la capacité amylasique et fermentaire de *Schwanniomyces*, plusieurs travaux de recherche concernant la transformation directe de l'amidon en alcool par FSm, ont été rapportés depuis 1982. Ces études relatives à *Schwanniomyces* sont résumées dans le Tableau 2.9.

Tableau 2.9.- Performances de la fermentation alcoolique de *Schwanniomyces* avec différents substrats

Souche	Substrat		Ethanol		Temps	Référence			
	Source	Teneur	Teneur	Rendement	-				
		g/l	g/I	*	h				
Schw. alluvius ATCC26074	Amidon soluble	25,0	13,9	99,3	72	CALLEJA et coll., 1982a			
Schw. castellii	Amidon soluble	150,0	50,5	69,9	96	FRELOT et coll., 1982			
Schw. castellii CBS 2863	Inuline	140,0	51,2	40,5	168	GUIRAUD et coll., 1982			
Schw. alluvius IGC 2829	Amidon soluble	92,5	30,0	57,9	300	WILSON et coll., 1982b			
Schw. alluvius IGC 2829	Amidon soluble	20,0	7,9	70,3	-	WILSON et coll., 1982b			
Schw. alluvius IGC 2829	Amidon de blé	20,0	7,5	67,4	30	WILSON et coll., 1982b			
Schw. castellii CBS 2863	Dextrines	225,0	43,0	60,9	-	DeMOT et coll., 1985			
Schw. castellii CBS 2863	Dextrines	150,0	46,3	60,4	-	AMIN et coll., 1985			
Schw. castellii CBS 2863	Amidon soluble	100,0	33,6	77,0	28	MALFAIT, 1986			
Schw. castellii R 69	Mélasses	40-80	-	-	-	SENTRACHEM, 1986			
Schw. castellii CBS 2863	Amidon de Blé	172,0	-	-	70	ZAIRE et coll., 1988			
Schw. castellii CBS 2863	Amidon soluble	150,0	60,0	71,4	-	LERMINET, 1987			
Schw. castellii CBS 2863	Amidon de Blé	75,0	28,0	71,4	-	LERMINET, 1987			
Schw. castellii ATCC 1	Amidon soluble	25,0	14,1	99,3	72	CALLEJA et coll., 1982b			
Co-cultures de Schwanniomyces									
Saccharomyces uvarum	Amidon soluble	92,5	35	69,1	-	WILSON et coll., 1982b			
Saccharomyces diastaticus	Dextrine	225	91	71,5	-	DeMOT et coll., 1985			
Saccharomyces diastaticus	Dextrine	200	80,6	78,8	-	AMIN et coll., 1985			
Saccharomyces diastaticus	Amidon soluble	200	82,5	80,7		AMIN et coll., 1985			

^{*} Rendement apparent de conversion d'alcool par rapport au rendement théorique de 56 g d'alcool par 100 g d'amidon

L'effet Pasteur est la diminution de la vitesse de consommation du glucose lors du passage du métabolisme fermentaire au métabolisme respiratoire (LEHNINGER, 1975). L'effet Crabtree (glucose) est traduit par une diminution de l'activité du système enzymatique respiratoire par des hautes teneurs en sucre (De DEKEN, 1966). La souche sauvage de *Schw. castellii* est caractérisée par l'absence d'effet Crabtree et la présence d'un fort effet Pasteur. Ces caractéristiques donne lieu à un pouvoir fermentaire faible en aérobiose mais élève en anaérobiose (INGLEDEW, 1987).

Les premiers travaux rapportés (CALLEJA et coll., 1982a,b; FRELOT et coll.,1982; WIL-SON et coll., 1982b) ont mis en évidence la conversion d'amidon en alcool, en notant le caractère homofermentaire du procédé et en évitant l'utilisation d'enzymes exogènes pour l'hydrolyse de l'amidon. Un rendement de production d'alcool très élevé a été obtenu à de faibles concentrations en substrats (2.5 %; CALLEJA et coll., 1982b). L'examen du Tableau 2.9 fait ressortir qu'à des concentrations élevées en amidon (>10 %), les rendements de conversion en alcool sont relativement bas et fluctuent de 57,9 à 71,4 % par rapport au rendement théorique. Cette limitation est probablement imposée par la croissance cellulaire et la biosynthèse d'enzymes nécessaires à l'hydrolyse de l'amidon. Les concentrations en alcool atteintes sont inférieures à 8 %, valeur minimum nécessaire pour obtenir une fermentation rentable au stade industriel (De MOT et coll., 1985).

De MOT et coll. (1985) ont réalisé une évaluation de plusieurs levures amylolytiques capables de produire de l'éthanol à partir d'amidon. Ils ont trouvé que les levures possédant une plus forte capacité d'hydrolyse de l'amidon ont une faible tolérance à l'alcool et vice-versa. Pour la souche *Schw. castellii* CBS 2863 la production d'alcool a été de 60 et 67 % par rapport au rendement théorique, à partir de dextrines (225 g/l) et de glucose (180 g/l) respectivement. Les meilleurs résultats ont été trouvés avec la souche *Saccharomyces diastaticus* pour laquelle une conversion de 70 % a été obtenue; toutefois une quantité importante de carbohydrates n'a pas pu être utilisée, à cause de son système enzymatique déficient en α amylase.

Afin d'augmenter le rendement, des fermentations en culture mixte de Schw. alluvius avec Sacc. uvarum ont été mise en oeuvre (Tableau 2.10). Pour ces cultures un rendement de 69,5 % a été obtenu (WILSON et coll., 1982b) en utilisant 92.5 g/l d'amidon soluble. Ces auteurs ont également démontré que l'addition d'amyloglucosidase fongique peut augmenter le rendement à 86,2 %. D'autres co-cultures de Schw. castellii et Sacc. diastaticus ont permis une conversion de 71.5 %

et une concentration de 91 g/l d'éthanol pour un milieu de culture contenant 225 g/l de dextrines (De MOT et coll., 1985).

Il est important de noter que la souche *Schw. castellii* CBS 2863 possède aussi une capacité inulasique (GUIRAUD et coll., 1982). Par ailleurs, *Schwanniomyces* a été utilisée pour l'amélioration du rendement de la fermentation alcoolique à partir de mélasses contenant de l'amidon (SENTRACHEM, 1986).

Néanmoins les rendements de production d'alcool sont relativement bas, à cause de la faible tolérance de *Schwanniomyces* vis à vis de l'alcool. Cet aspect est présenté plus en détail dans la section suivante. Il est toutefois important de remarquer que même si le rendement de production d'alcool est faible, l'utilisation de *Schwanniomyces* peut modifier nettement les procédés de production d'alcool à partir d'amidon, en évitant d'une part la dépendance vis à vis d'enzymes exogènes mais surtout en éliminant les étapes des procédés destinées à réaliser l'hydrolyse de l'amidon.

2.2.5 Production d'alcool à partir d'amidon par autres procédés

Nous avons voulu comparer les performances des procédés de production d'alcool à partir d'amidon avec *Schwanniomyces* (Tableau 2.9) et avec d'autres microorganismes (Tableau 2.10) cultivés sur divers substrats amylacés.

Vue l'abondance et la variété des matériaux amylacés, on peut noter que beaucoup d'efforts ont été réalisés pour utiliser l'amidon comme substrat dans la fermentation alcoolique. Pour la plupart de ces procédés (Tableau 2.10) la fermentation est réalisée après une hydrolyse préalable de l'amidon, à l'aide des enzymes exogènes, où par des enzymes provenant de la culture mixte avec d'autres microorganismes non fermentaires. Bien sûr, les rendements de conversion de l'amidon en alcool sont plus importants. Lors des calculs, il n'est généralement pas pris en compte la quantité de carbone consommé pour la biosynthèse des amylases nécessaires. Actuellement le marché des amylases est très répandu et offre des produits variés, ce qui n'empêche pas d'avoir un procédé dépen dant des enzymes exogènes pour l'hydrolyse de l'amidon.

TABLEAU 2.10 Comparaison de performance de production d'alcool à partir de matériaux amylacés

Système de fermentations			Substrat		I	Ethanol		Références	
Hydrolyse du substrat		Fermentation	Source	Teneur	Teneur	Rendement			
Enzyme	Microorganisme	Microorganisme		g/l	g/l	%,*	h		
amyloglucosidase		Z. mobilis	AS	200	95	83,9	35	LEE et coll	1983
-	A. awamori	S. uvarum inuliticus	ΑI	-	148	-	120	FLOR et HAYASHIDA	1983
amyloglucosidase	-	S. cerevisiae	Banane	-	-	95	10	IIZUKA et coll.	1985
amylases-acide	-	S. cerevisiae	Manioc	-	-	95	120	LEE et coll,	1987
-	A. niger	S. cerevisiae	Al	100	48	85,7	96	ABOUZIED et REDDY	1986
-	S. fibuliger	Z. mobilis	AS	30	4,7	85,7	24	DOSTALEK et HAGGTROM	1983
-	A. awamori	Z. mobilis	AS	100	25	67,9	-	TANAKA et coll.	1986
amyloglucosidase		Z. mobilis	Al	200	89,6	94,2	30	RHEE ct coll	1986
amylases	A. niger	S. cerevisiae	ΑI	100	61,6	-	70	WELLER et coll.	1983
amyloglucosidase		S. cerevisiae	Maïs	135	-	75	-	PARK et coll.	1987
amyloglucosidase	-	S. cerevisiae	Manioc	210	88,5	75,3	96	NAM et coll.	1988
-	A. awamori	S. cerevisiae	AS	40	12,3	55,5	60	KUROSAWA et coll.	1989
amyloglucosidase	-	S. cerevisiae	AS	50	19,6	69,6		INLOW et coll	1988
amylases	-	Z. mobilis	Maïs	200	9,31	96	30	DOELLE et coll.	1989
-		C. thermohydrosulfuricum	Al	70,4	29,9	76,3		MORI et INABA	1990
α-amylase	-	S. cerevisiae	ΑI	100	37	66,1	24	HOSHINO et coll.	1990
-	S. diastaticus	S. diastaticus	AS	100	50	89,3	-	DEBNATH et coll	1990

^{* :} Rendement apparent de conversion d'alcool par rapport au rendement théorique de 56 g d'alcool par 100 g d'amidon Al : Amidon insoluble ; AS : Amidon soluble

Par ailleurs, les co-cultures de microorganismes sembleraient être une alternative prometteuse, bien que la maîtrise des paramètres de fermentation est difficile car un compromis entre les divers microorganismes et les phases de la fermentation doivent être établies. Probablement, comme cela a été évoqué par De MOT et coll. (1985), les limites d'utilisation des levures amylolytiques pourraient être levées par l'amélioration génétique de souches, ainsi que par l'utilisation des nouvelles technologies et méthodes de fermentation.

2.2. 6 Tolérance à l'alcool

Bien que l'alcool soit facilement produit par les levures, il devient rapidement toxique pour les cellules. Le niveau d'éthanol toléré par les levures dépend principalement de la nature et de la physiologie de chaque souche. Vu l'intérêt de la production de l'alcool (combustible, alcool de bouche), les études sur la tolérance des levures à des concentrations élevées en alcool ont fait l'objet d'un grand intérêt de la part de la communauté scientifique et industrielle. D'autant plus qu'une concentration de 8 % (v/v) est nécessaire dans l'industrie pour rendre économiquement rentable le procédé de distillation (STEWART et coll., 1984). L'effet de l'inhibition des levures par l'éthanol a été l'objet de nombreux travaux de recherche et plusieurs mises au point bibliographiques existent dans la littérature (STEWART et coll., 1984). Dans cette étude, nous évoquerons seulement les concepts généraux et nous analyserons plus en détail l'effet toxique de l'éthanol sur la viabilité cellulaire et sur la biosynthèse et l'activité des amylases chez Schwanniomyces.

La tolérance à l'alcool est directement liée à son excrétion de la cellule. L'éthanol est une molécule de faible masse molaire qui possède une extrémité hydrophobe et une autre hydrophile. La membrane cellulaire de la levure, constituée partiellement d'acides gras insaturés, joue un rôle très important dans l'excrétion de l'alcool. En fonction de la composition de la membrane, l'éthanol peut être plus où moins facilement expulsé de la cellule, faisant ainsi varier l'effet de l'inhibition de l'alcool (NAVARRO, 1980). Les acides gras insaturés sont les principaux, composants de la membrane cellulaire qui interviennent de manière importante dans la tolérance à l'éthanol. Par ailleurs, il a été démontré d'une part que l'oxygène favorise la biosynthèse des acides gras et d'une autre que la présence de traces d'O2 stimulent la fermentation (NAVARRO, 1980). Par ailleurs, WILSON et coll. (1982b) reportent que la croissance de *Schwanniomyces* est inhibée à 4.7 % (p/v), tandis que MALFAIT et coll. (1986) démontrent qu'à des concentrations en alcool supérieures à 3 % (v/v) la mortalité de cellules est très élevée et qu'à 6% (v/v) aucune cellule ne survie. MALFAIT et coll. (1986) précisent également que la croissance est fortement inhibée à faibles concentrations en alcool (2-3 %; v/v), tandis que la production de CO2 pendant est moins affectée. Par ailleurs, la biosynthèse et l'activité des amylases sont affectées en présence de l'éthanol: Une perte de 50 % d'activité en α amylase est observée à 5 % (v/v) d'éthanol, alors que l'amyloglucosidase a encore 80 % de son activité à 8 % (v/v) d'éthanol. La synthèse de l'α amylase et de la amyloglucosidase sont sévèrement diminuées à 4 % (v/v) d'alcool.

Un point très important à remarquer est l'effet réversible de l'inhibition de l'éthanol sur l'activité des amylases (MALFAIT et coll., 1986), propriété qui pourrait être utilisée au profit de la fermentation alcoolique en phase solide.

2.2.7 Rôle de l'O2 et du pH sur les amylases

Parmi les facteurs intervenant sur l'expression de l'activité et de la biosynthèse des amylases chez *Schwanniomyces*, le pH et l'O2 semblent être des paramètres les plus importants à contrôler au cours de la fermentations.

OTENG-GYANG et coll. (1980) ont évoqué pour la première fois l'importance du contrôle du pH. Une augmentation des activités enzymatiques a été observée par addition de tampons au milieu de culture. L'effet a été attribué à l'addition des tampons *per se* et non au contrôle même du pH. Les résultats obtenus par CLEMENTI et ROSSI (1986) ont démontré que le pH optimum pour l'excrétion des deux enzymes se trouve entre 5,5 et 7. BOZE et coll., (1987a), à l'aide de la culture en continu, confirment que les productions maximales de l'a amylase et de l'amyloglucosidase s'obtiennent pour des pH 4,5-6,5 et 4-6,5, respectivement. A des pH de 3,5, une perte très importante d'activité (>90 %) est observée pour les deux enzymes. Par la suite BOZE et coll., (1989) ont mis en évidence le rôle simultané de l'O2 dissous et du pH dans la culture en continu de *Schwanniomyces castellii* CBS 2863. (Tableau 2.11). Les résultats ont démontré que la synthèse de l'amyloglucosidase semble être beaucoup moins sensible que l' a amylase aux variations du pH et de

l'oxygène dissous. Il semblerait que l'O2 soit indispensable pour la synthèse de l' α amylase. Pour ces deux enzymes l'effet adverse d'un pH bas est diminué quand le taux d'aération devient plus important. Le maximum de production enzymatique est obtenu à pH 5,4.

Par ailleurs , il a été indiqué à plusieurs reprises (CALLEJA et coll.,1986b et 1987; LUSENA et coll., 1985) que le transfert d'enzymes de la cellule vers le milieu de culture se réalise en fin de la phase exponentielle et augmente graduellement pour être maximum pendant la phase stationnaire. Une quantité minimale d'O2 dissous (10 %) dans le milieu de culture est nécessaire pour faciliter l'exportation des enzymes, spécialement dans le cas de l' α amylase. Même une très courte durée (3 h) d'anaérobiose peut arrêter l'excrétion de l' α amylase. Ces résultats ont aussi confirmé par d'autres auteurs (BOZE et coll., 1989). Il est aussi important de signaler que l'agitation *per se* n'est pas obligatoire pour l'excrétion des enzymes. Les souches produisent une quantité d'enzymes comparable en boîte de Pétri ci celles relevées en fioles agitées (CALLEJA et coll., 1986b). Au contraire, l'effet négatif de l'agitation sur l'excrétion des enzymes pendant la phase stationnaire a été démontré en culture en fiole (CALLEJA et coll. 1984).

Tableau 2.11 - Effet de l'oxygène dissous et du pH sur la production d'amylases chez Schwanniomyces (d'après BOZE et coll., 1989)

O2 dissous	pН			pH ·			
%	5,4	4	3,5	5,4	4	3,5	
	Activités α amylase, U/ g MS			Activité amy	Activité amyloglucosidase, U/ g MS		
80	1800	1400	306	68	68	68	
50	1100	600	70	57	57	57	
20	360	150	18	46	46	46	

2.3 Conclusion

Le rappel bibliographique concernant la FS, nous a permis de constater que les applications des cultures de levures en FS sont limitées, alors que pour les champignons filamenteux elles sont nombreuses. Le domaine plus important d'utilisation des levures concerne la production d'alcool par FS. Bien que seulement les souches de *Saccharomyces* spp ont été essayées.

L'aperçu bibliographique relatif à *Schwanniomyces*, nous a indiqué que le potentiel de son utilisation réside d'abord, dans la haute performance de son système amylolytique, constitué d'une α-amylase et d'une amyloglucosidase (caractéristique rare dans la nature) et ensuite dans sa capacité fermentaire moyenne. Par ailleurs, la biomasse, sous-produit obligatoire de toute fermentation, peut être utilisée pour l'alimentation du bétail. De très nombreuses études ont été réalisées en FSm, alors que les travaux concernant des applications de *Schwanniomyces* en FS sont plus rares.

Les substrats amylacés représentent une énorme source de carbohydrates pour la production d'alcool par FS, mais une hydrolyse préalable est nécessaire avant la fermentation. L'utilisation des levures du genre *Schwanniomyces* semble donc être intéressante pour la conversion directe d'amidon en alcool par FS. Une étude des paramètres permettant l'adaptation de *Schwanniomyces* à la culture en milieu solide s'avère donc nécessaire.

Le transfert des gaz au cours de la FS, semble être suffisant pour répondre aux exigences en O2 de *Schwanniomyces* pendant la synthèse des amylases. Par ailleurs, la sensibilité des amylases aux variations de pH et le contrôle de ce paramètre en FS, semblerait être un problème important à résoudre au cours de ce travail.

L'effet réversible de l'inhibition de l'alcool sur les amylases pourrait être mis au profit des performances de la fermentation alcoolique en phase solide. L'utilisation des fermenteurs à recirculation des gaz peut palier à la faible tolérance à l'alcool de *Schwanniomyces* grâce à l'extraction en continu de l'alcool produit au cours de la fermentation.

La maîtrise de l'environnement gazeux dans la FS sera un des outils importants pour mieux valoriser les performances de *Schwanniomyces* cultivée en milieu solide. A ce propos le développement de systèmes automatiques de suivi en temps réel des FS semble être indispensable.

MATERIELS ET METHODES

3. MATERIELS ET METHODES

3.1 Microorganisme

La souche utilisée est répertoriée actuellement au Centraal bureau Voor Schimmelcultures (Delft, Hollande) sous le nom de Schwanniomyces castellii CBS 2863. En tenant en compte de la nouvelle classification de KREGER CAN RIJ (1984) la souche Schw. castellii fait partie de l'espèce Schwanniomyces occidentalis Klocker. Au cours de ce travail pour de raisons de simplification nous utiliserons le nom de Schwanniomyces castellii.

3.2 Milieux de culture

3.2.1 Milieu de conservation

La souche est conservée sur un milieu gélosé en tubes incliné. Le milieu de conservation est celui décrit par SILLS et coll. (1984b). Sa composition est la suivante (g/l): Peptone de caséine: 3,5; Extrait de levure: 3; KH2PO4: 2; MgSO4·7H2O: 1; (NH4)2SO4: 1; Glucose: 20 et Agar: 20. Le milieu de culture est ajusté à pH 5,2 et ensuite stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 15 min. Les tubes inoculés sont incubés à 28 - 30 °C pendant 48 h, puis conservés à 4°C.

3.2.2 Milieu d'inoculation

Le milieu de culture utilisé pour la préparation des inoculas a la même composition que celle reportée par OTENG - GYANG (1979). Sa composition est la suivante (g/l): Acide tartrique 3,75; Na2HPO4·2H2O 8,9; Amidon 50; Extrait de levure 10. Ce milieu est tamponné à pH 5,4 avec un tampon tartrate (0,025 M) - phosphate (0,05 M) et stérilisé à 120 °C pendant 15 minutes. Tous les essais ont été réalisés avec de l'amidon soluble Prolabo (Réf. 21 152 291).

3.2.3 Milieu de base

D'après la composition élémentaire de *Schwanniomyces* (MORESI et MEDICI, 1989), un milieu de base a été utilisé pour la culture sur support de *Schw. castellii*. Sauf indication contraire, la composition est la suivante (g/l): MgSO4·7H2O 2; NaCl 1; KH2PO4 5; Extrait de levure 1; Peptone de caséine 1; Urée 10 et Amidon: 100. Tous les essais ont été réalisés avec de l'amidon Prolabo (Réf. 21 152 291).

Le milieu de culture est ajusté à pH 3,5 et chauffé au four de micro-ondes pour assurer la dissolution de l'amidon. Le pH acide empêche la précipitation des sels du milieu de culture, ainsi que l'hydrolyse et la perte d'urée pendant l'autoclavage. Le milieu de culture est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 15 minutes.

Après refroidissement et en fonction des essais, des vitamines et d'oligo-éléments peuvent être additionnés au milieu de culture à raison de 2 ml/l à partir des solutions mères reportées par ROUSSOS (1982) et dont les compositions sont :

- Oligo-éléments (g/l): FeSO4·7H2O; 5; MnSO4·H2O; 1,6; ZnSO4·7H2O 1,4; CaCl2: 2.
- Vitamines (mg/l): Biotine: 20; Acide folique: 20; Pyrodoxine-HCl: 100; Thiamine-HCl: 50; Riboflavine: 50; D-L Pantothénate de Ca: 50; Vitamine B12: 1; Acide Paminobenzoïque: 50 et acide lipoïque: 50.

3.2.4 Traitement de la bagasse

Le support utilisé est la bagasse, résidu lignocellulosique de la canne à sucre, recueilli après l'extraction du saccharose. La bagasse provient de la sucrerie "Emiliano Zapata" à Zacatepec de l'état de Morelos au Mexique. A cette usine la bagasse est tamisée à la sortie des moulins en obtenant deux fractions: les fibres longues sont destinées à la fabrication du papier et les fibres courtes ou "bagacillo", constituées essentiellement de moëlle, sont utilisées pour la préparation des aliments pour bétail. C'est ce dernier produit, soigneusement lavé pour éliminer l'excès de cendres et de phosphates issus de la récolte de la canne et de l'extraction de sucre, qui est utilisé comme support de la fermentation.

La bagasse est tamisée et les particules retenues entre les tamis 20 et 50 sont sélectionnées. Leur taille varie de 0,3 à 0,8 mm. La bagasse ainsi sélectionnée est lavée trois fois avec de l'eau de robinet et rincée 2 fois avec de l'eau déminéralisée. Elle est ensuite stérilisée par l'autoclave pendant 30 min à 120° C. Enfin elle est séchée à 60 °C puis stockée jusqu'à son utilisation.

3.3 Conditions de culture

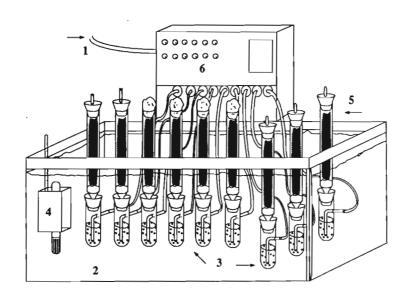
3.3.1 Dispositif de fermentation à petite échelle

Au cours de ce travail deux types différents de fermenteurs ont été utilisés. D'une part de petits réacteurs tubulaires et d'autre part un réacteur modulaire. Ce dernier est un prototype nouveau développé et mis au point au cours de ce travail, il fera donc l'objet d'une présentation dans le chapitre 4. Les petits réacteurs ont été déjà décrits à plusieurs reprises (RAIMBAULT, 1980; HUERTA, 1984; TREJO, 1986; ROUSSOS, 1985; ORIOL, 1987; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1987; DUFOUR, 1990).

Ils sont constitués de petites colonnes de verre de 4 cm de diamètre et 20 cm de longueur, leur volume utile est voisin de 250 ml. Une fois garnies avec le support, les colonnes sont introduites dans un bain thermostaté à 30°C. Le dispositif permet le contrôle et le suivi de la fermentation (Figure 3.1).

L'aération dans les fermenteurs se fait grâce à une canalisation à haute pression. A la sortie du manodétendeur, la pression de l'air est réglée à 0,2 bar. L'air est ensuite humidifié deux fois à la température ambiante à l'aide de bulleurs en verre fritté et distribué en passant par un ballon à fond rond muni d'une entrée et de plusieurs sorties.

L'aération est donc assurée par un flux d'air saturé en humidité qui parcourt les différentes colonnes après avoir été contrôlé par l'intermédiaire de vannes à pointeaux. Afin de s'assurer de la saturation et de la mise à température de l'air, un petit bulleur est disposé sous chaque colonne. Le débit d'air est ajusté à la sortie de chaque colonne. Pour notre étude, le flux d'air utilisé est voisin de 4-5 ml /min et par g Matière Sèche Initiale (MSI).



- 1: Entrée d'air
- 2: Bain-thermostaté
- 3: Humidificateur
- 4: Resistance chauffante
- 5: Colonnes de fermentation
- 6: Microvannes d'aération

Fig 3.1: Dispositif d'incubation de la Fermentation Solide

3.3.2 Précultures et préparation de l'inoculum

Deux précultures sont réalisées sur le milieu d'inoculation avant de les utiliser pour ensemencer la FS. Dans un premier temps, un milieu gélosé est ensemencé à partir du tube de conservation. Après 48 heures d'incubation à 28 - 30 °C, cette préculture sert d'inoculum pour une deuxième préculture en milieu liquide. Les cultures submergées sont réalisées en fioles d'Erlenmeyer à baffles de 250 ml remplies avec 30 ml de milieu de culture. Les fioles sont incubées à 28 - 30 °C pendant 24 heures avec une agitation de 130 tpm.

3.3.3 Mise en œuvre de la fermentation solide

La veille de la fermentation, la quantité de bagasse nécessaire est mise à l'étuve à 100°C pendant 24 h; une fois refroidie elle est prête à l'emploi. Cette opération permet de diminuer les contaminations et de considérer l'humidité de la bagasse comme étant proche de zéro. Le volume de milieu de base est vérifié, les vitamines et oligo-éléments sont additionnés et le pH ajusté à la valeur souhaitée.

Sauf indication contraire, le milieu de culture est ensemencé avec la préculture obtenue dans les fioles à baffles à raison de 2 x 10⁷ cellules/ml, soit 10 % (v/v) et proche de 1 g/l de biomasse; Le pH du milieu ainsi inoculé est vérifié et ajusté. Il a été vérifié que la présence de la bagasse ne modifie pas le pH du milieu.

Le milieu inoculé est incorporé à la bagasse en mélangeant constamment à l'aide d'un batteur de ménage, jusqu'à ce que l'ensemble soit homogène.

Le support imprégné est introduit dans les fermenteurs avec une compactation de 0.35 g/ml. Du coton ainsi qu'une rondelle de maille en acier inoxydable sont introduits au fond de colonnes pour faciliter la distribution de l'air à travers la colonne.

3.4 Prélèvement et traitement des échantillons

A la différence des fermentations liquides, la prise d'échantillons au cours des FS est très difficile. En effet, pour étudier la production de métabolites ou de la biomasse en fonction du temps, il est nécessaire de sacrifier une colonne complète pour un temps de fermentation donné. Par exemple, pour une cinétique de fermentation il est donc indispensable de préparer autant de colonnes que de points souhaités. Pour traiter tous les échantillons dans les mêmes conditions, ceux-ci sont portés au congélateur à -30°C au fur et à mesure des prélèvements.

Les échantillons prélevés au cours de la fermentation sont soumis à un traitement standard permettant la réalisation des analyses biochimiques. La méthodologie suivie pour la préparation des échantillons est schématisée sur la figure 3.2.

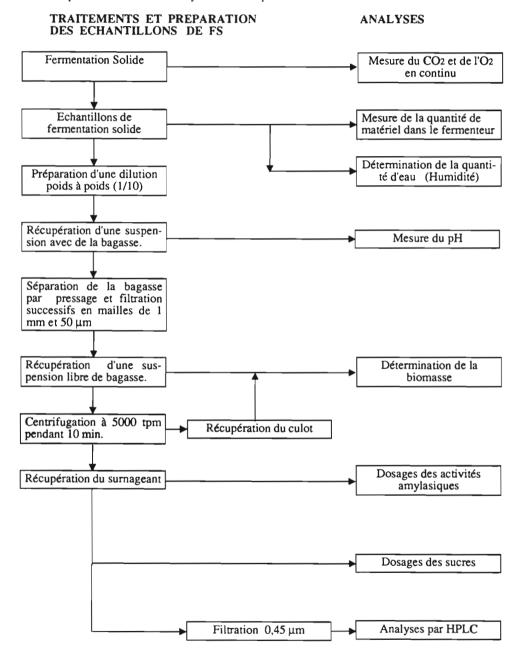
Tout d'abord, le contenu de la colonne est pesé au début de la fermentation et au moment du prélèvement afin de calculer la perte de poids sec du matériel.

Ensuite une portion de l'échantillon d'environ 6-8 g (soit 10-12 % de la colonne) de matériel provenant du prélèvement est destinée à la détermination de l'humidité, c'est-à-dire de la quantité d'eau présente dans l'ensemble du milieu de culture.

Une autre portion d'environ 4 g (soit environ 8 % de la colonne) est utilisé pour faire une dilution en poids (1/10) qui servira aux analyses biochimiques ultérieures (Fig. 3.2). La dilution est préparée dans de l'eau additionnée d'une goutte de Tween 80 pour aider à la séparation des levures de la bagasse. Il a été vérifié que l'addition du Tween 80 n'interfère pas dans les analyses.

S'agissant d'une fermentation solide, la dilution poids à poids est très importante pour exprimer les résultats par rapport à la matière sèche. Le pH de la suspension est mesurée directement après une forte agitation pendant 5 min à l'aide d'un barreau aimanté. Pour les analyses à réaliser il est nécessaire de séparer la bagasse. Ceci est obtenu par pressage à la main en utilisant successivement des mailles métalliques de 1 mm et 50 µm de diamètre de pore.

Fig. 3.2.- Schéma de traitement et préparation des échantillons de la fermentation solide pour les différentes analyses biochimiques.



Un fois la bagasse séparée, le protocole de traitement des échantillons est analogue à celui des cultures submergées. A partir de la suspension libre de bagasse de la FS il est possible d'estimer la biomasse par des méthodes comme le comptage des cellules ou le dosage de protéines.

Après centrifugation à 5000 tpm pendant 20 min le surnageant et le culot sont séparés. Le surnageant servira pour la plupart des analyses biochimiques des substrats et des produits, tandis qu'à partir des culots on évaluera la biomasse par mesure du poids sec ou par l'analyse élémentaire de Carbone, d'hydrogène et de l'azote (CHN).

Il est important de remarquer que l'estimation de la biomasse en FS est un problème difficile à résoudre. L'utilisation de cette méthodologie à permis de réaliser une estimation directe de la biomasse en FS d'une manière comparable à la culture liquide. Une méthodologie similaire a été précédemment mise au point pour effectuer l'estimation de la biomasse en FS (SATO et coll., 1983; SATO et YOSHIZAWA, 1988; BRYAN, 1990). Dans notre étude, il a été vérifié qu'en utilisant cette technique au moins 95 % des cellules sont récupérées.

3.5 Techniques d'évaluation de la biomasse

L'estimation de la population microbienne peut être réalisée soit à partir de la suspension cellulaire sans bagasse soit à partir du culot (Fig. 3.2).

3.5.1 Comptage des cellules

Le nombre des cellules par gramme de matière sèche a été obtenu par comptage sur cellule de Malassez. Le comptage est effectué à partir de la suspension sans bagasse. Le comptage est direct si la population n'excède pas 20-30 x10⁶ cellules par ml, autrement une dilution convenable est indispensable (SATO et YOSHIZAWA, 1988).

3.5.2 Turbidimétrie

L'absorbance des suspensions cellulaires a été mesurée à 650 nm avec un spectrophotomètre Milton Roy Spectronic 401. Les lectures sont réalisées pour des valeurs de densité optique entre 0,1 et 0,6. Des dilutions sont effectuées si nécessaire pour rester dans cette zone.

3.5.3 Détermination de la teneur en poids sec des levures

Un volume de 10 ml de la suspension cellulaire sans bagasse est centrifugé à 5000 tpm pendant 20 min dans des tubes à essai préalablement tarés. Les cellules sont lavées à l'eau distillée et placées à l'étuve à 105°C pendant 24 h (SATO et coll., 1983). L'ensemble est pesé jusqu'à valeur constante. Les relations entre les résultats obtenus avec les trois méthodes décrites précédemment sont explicitées sur la figure 3.3.

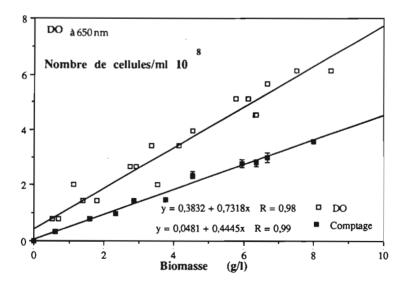


Fig. 3.3 Relation entre la densité optique et le comptage de cellules avec la biomasse de Schwanniomyces castellii

3.5.4 Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Les protéines réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu, pour donner un complexe bleu, dû à la réaction du cuivre alcalin avec la protéine. L'intensité de la couleur dépend du nombre d'acides aminés aromatiques présents et du nombre de liaisons peptidiques: change suivant la nature de la protéine (LOWRY et coll., 1951). Les résultats sont sensibles au pH, au temps de réaction et à la concentration des réactifs et peuvent être faussés par des interférences provenant des sucres et des produits cellulosiques. Cette méthode est déconseillée sur des échantillons contenant une forte teneur en lignocellulose et en phénols ; dans notre cas, les traitements suivis par l'échantillon élimine ces risques (Fig. 3.2.).

Réactifs: - Solution A: 20 g de carbonate de calcium dans 1 l de NaOH 0,1 N

- Solution B: 1 g de sulfate de cuivre dans 100 ml d'eau distillée

- Solution C : 2 g de tartrate de sodium et potassium dans 100 ml d'eau distillée

- Réactif de Folin-Ciocalteu : diluer 1:2 au moment de son utilisation

- NaOH 1 N

- Solution étalon de sérum albumine bovine à 300 mg/l.

Le dosage des protéines est effectué dans une plage de concentration 0 à 300 mg/l sur 1 ml de l'échantillon convenablement dilué ou sur 1 ml de la solution étalon. La courbe étalon et les échantillons subjessent alors le traitement suivant :

- -Ajouter 1 ml d'une solution de NaOH 1 N et porter à ébullition pendant 5 min
- -Refroidir les tubes dans un bain d'eau froide
- -Préparer un mélange contenant 50 ml de solution A, 1 ml de solution B et 1 ml de solution C
- -Ajouter 5 ml de ce mélange à chaque tube
- -Agiter au vortex et laisser reposer 30 min à l'obscurité
- -Ajouter 1 ml du réactif de Folin dilué, agiter et laisser reposer 30 min à l'obscurité
- -Lire à 750 nm contre le blanc

3.5.5 Détermination de la composition en C, H et N

Les compositions élémentaires en carbone, hydrogène, azote de la biomasse et de la bagasse ont été déterminées grâce à un analyseur "LECO" CHN 600.

L'analyse est réalisée par combustion dans l'oxygène pur à 950°C d'un échantillon séché et finement moulu grâce au broyeur Tecator. Environ 100 à 150 mg sont introduits dans des capsules d'étain (catalyseur de la réaction de combustion) et placés dans la chambre de combustion. Le CO2, la vapeur d'eau, les oxydes d'azote, l'azote et les oxydes de soufre sont les composés pouvant provenir de cette combustion. Les oxydes de soufre sont retenus par de la chaux dans un second four de façon à éviter la formation d'acide sulfurique avec la vapeur d'eau résultant de la réaction. Les gaz restants sont recueillis et mélangés.

Après mélange des gaz de combustion une fraction de 10 ml est prélevée pour l'analyse d'azote. Elle est entraînée par de l'hélium et traverse un train de purification constitué de tournure de cuivre porté à 800°C pour éliminer l'oxygène et transformer les oxydes d'azote en azote, d'ascarite et d'anhydrone pour retenir le CO2 et l'H2O. L'azote est alors dosé dans une cellule de conductibilité thermique. Le carbone et l'hydrogène sont analysés par des cellules infrarouges sur une autre partie aliquote. Cette méthode d'analyse donne le pourcentage total de carbone, d'hydrogène et d'azote d'un échantillon exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche.

Les analyses ont été réalisées au Laboratoire de Pedologie du Centre ORSTOM de Montpellier grâce à la collaboration de Mme GAVINELLI.

3.5.6 Techniques de fixation pour la microscopie électronique à balayage

Les échantillons destinés à la microscopie électronique doivent être fixés dans le but d'éviter toute déformation des structures qui sont complètement déshydratés pour obtenir une métallisation homogène. Tous les échantillons doivent être traités au même moment. Pour établir une cinétique de croissance il est donc nécessaire de prévoir des inoculations des milieux de culture échelonnés dans le temps, afin de pouvoir en disposer au même moment. Deux techniques de fixation diffé-

rentes ont été utilisées par fixation au formaldéhyde et au glutaraldéhyde (BLAHA et PARIS; 1987).

Fixation au formaldéhyde

La composition du fixateur est la suivante : Aldéhyde formique (FAA) à 40 % 10 ml; Acide acétique pur : 10 ml et éthanol pur: 85 ml.

Les échantillons sont introduits dans des petits paniers grillagés et immergés dans le fixateur FAA pendant 12 h sous vide (afin d'éliminer les bulles d'air de la bagasse et faciliter la pénétration du fixateur au sein de l'échantillon), dans une petite enceinte close (dessicateur branché sur une trompe à vide).

Les paniers sont introduits dans quatre bains successifs d'éthanol à 80 %, d'une demie -heure. Là aussi le vide est rétabli entre chaque changement de bain. Puis les échantillons sont passés dans 2 bains successifs d'alcool à 95 % et 2 bains d'éthanol absolu. Les échantillons sont conservés dans de l'alcool absolu jusqu'à la métallisation qui se réalise au Laboratoire de microscopie électronique à l'Université Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc (UM II).

Fixation au glutaraldéhyde

La composition du fixateur est la suivante : Glutaraldéhyde à 25 % : 1 ml ; Tampon cacodylate 4 ml et eau distillée 1 ml. Le glutaraldéhyde utilisé est du glutaraldéhyde très pur (grade I) à 25 % en solution aqueuse pour la microscopie électronique (SIGMA G-5882). Le tampon cacodylate est préparé à partir d'acide cacodylique à 16 g/l à pH 7,5.

Les échantillons sont placés, dans des petits paniers grillagés et immergés dans le fixateur pendant 12 h sous vide. Le bain de fixateur est renouvelé 2 fois à une demi-heure d'intervalle avec mise sous vide; puis les échantillons sont rincés dans 2 bains de tampon cacodylate (avec mise sous vide de 10 min entre chaque bain). Les échantillons sont ensuite portés 12 h sous vide dans

du tampon cacodylate.

Suite à la fixation, on procède à la phase de déshydratation. Les échantillons sont transférés dans des bains successifs d'alcool de concentrations croissantes 10, 20, 40, 60, 80, 95 % et enfin dans de l'éthanol absolu. Pour chaque concentration 2 bains avec mise sous vide d'une demieheure sont réalisés.

Quelle que soit la méthode utilisée, les échantillons sont conservés dans de l'alcool absolu jusqu'à la métallisation à l'or réalisée à l'UM II. L'opération de métallisation des structures est réalisée après élimination totale de l'alcool. Pour ce faire les petits paniers contenant les échantillons sont introduits dans un appareil à déshydratation par la méthode du point critique (Balzers). Du CO2 liquide recouvre les échantillons et remplace totalement l'alcool. A pression atmosphérique le CO2 est dégazé et les échantillons desséchés sont prêts pour la métallisation. Ceux-ci sont déposés sur du ruban adhésif double face et montés sur des plots disposés dans un appareil à pulvérisation cathodique. Une fine pellicule d'or d'environ 200-250 Angstroms se dépose alors et les préparations deviennent conductibles (Polaron, Model E 5000).

Les échantillons sont alors prêts pour l'observation au microscope électronique à balayage. L'examen par balayage a été effectué en utilisant le microscope électronique JEOL J.S.M.35. Les analyses ont été effectuées grâce à la collaboration de MM. ROSSI et DATAS de l'UM II.

3.6 Techniques colorimétriques pour le dosage des sucres

3.6.1 Dosage des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs sont dosés par la méthode de MILLER (1959). Le pouvoir réducteur des sucres permet de réduire l'acide 3-5 dinitrosalycilique en acide 3-amino-5-nitrosalycilique à chaud et en milieu basique. Le produit de la réaction présente une coloration jaune orangé présentant un maximum d'absorption à 575 nm. La méthode permet de doser des solutions de concentrations comprises entre 0 et 2 g/l de glucose. La présence de fortes concentrations en protéines peut interférer dans la lecture.

La composition du réactif DNS est la suivante (g/l): Acide 3, 5 dinitrosalycilique 10, 0; Hydroxyde de sodium 10, 0; Sulfite de sodium 0, 5 g; Phénol 2,0 g.

L'échantillon à doser est dilué de façon à obtenir une concentration en sucres réducteur voisine de 1 g/l. A 1 ml de cette dilution on ajoute 1 ml du réactif au DNS, le mélange est porté à ébullition 5 minutes et refroidi rapidement. Après addition de 8 ml d'eau distillée, le contenu des tubes est homogénéisé au vortex, et la densité optique est lue à 575 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Milton Roy Spectronic 401. Une courbe étalon de glucose de 0 à 2 g/l est réalisée pour chaque série de mesure pour pouvoir exprimer les résultats en g/l de sucres réducteurs.

3.6.2 Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux est effectué d'après la méthode de DUBOIS et coll. (1956) en utilisant le réactif d'anthrone. Une hydrolyse des polysaccharides est réalisée en milieu acide à chaud. L'anthrone réagit avec les hexoses et aldopentoses pour donner une coloration bleu-verte très intense, présentant une absorbance maximale à 625 nm. La présence de protéines contenant du tryptophane donne une couleur rouge à l'échantillon et interfère avec la réaction.

Cette méthode de dosage est une méthode très sensible car elle permet de doser les sucres dans une plage de concentration comprise entre 0 et 50 mg/l. Du fait de la très grande sensibilité de la méthode, il est nécessaire d'effectuer des dilutions souvent très importantes des échantillons à doser. De plus les tubes utilisés doivent être d'une extrême propreté et exemptes de toute trace de poussière. Il est recommandé de laisser tremper les tubes à essai pendant une nuit dans de l'acide sulfurique dilué puis de les rincer et sécher soigneusement.

Le réactif est préparé en dissolvant 200 mg d'anthrone dans 100 ml d'acide sulfurique pur.

A 2,5 ml de l'échantillon préalablement dilué on ajoute 5 ml de réactif à l'anthrone. Les tubes sont agités avec soin et portés à ébullition pendant 10 min. La réaction est stoppée par refroidissement en plaçant les tubes dans un bain marie à 0°C. L'absorbance est lue à 625 nm.

3.6.3 Dosage de l'amidon

Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur la coloration bleue développée lors de la formation du complexe amidon-iode (SMITH et ROE, 1957). Le réactif iode-iodure est préparé par dilution à 4 % de la solution de base suivante (g/l): KI 30 et I2 3. La réaction colorée est obtenue en ajoutant 0,1 ml d'échantillon convenablement diluée à 2,4 ml de ce réactif. La gamme étalon va jusqu'à une concentration en amidon soluble (Prolabo) jusqu'à 10 g/l. La densité optique est lue à 620 nm.

3.7 Méthodes physico-chimiques

3.7.1 Matière sèche

En fermentation solide, il est indispensable de suivre l'évolution de la matière sèche du milieu de culture. La dégradation des substrats carbonés produisant de l'eau, la perte de poids sec due à la respiration, ainsi que le transfert de l'eau par le courant d'air conduisent à des variations de l'humidité au cours de la fermentation. Cette mesure d'humidité permet d'exprimer la quantité de métabolites produit par rapport au substrat carboné initial ou par rapport à la matière sèche initiale. Des bilans matières peuvent ainsi être réalisés.

Le poids sec est évalué par différence de pesée. Environ 6-8 g d'échantillon (matière fraîche) sont pesés à l'aide d' une balance de précision Sartorius R160D; l' échantillon est mis à sécher pendant 24 h à 105°C, (SATO et coll., 1983). Une fois sec et refroidi dans une ambiance sèche (dessicateur contenant du silicagel), il est à nouveau pesé sur la même balance. La perte d'eau de l'échantillon ainsi calculée permet d'exprimer la matière sèche (quantité de solides pour 100 g d'échantillon frais), ou la teneur en eau (masse d'eau contenue dans 100 g de matière fraîche). Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche ou en pourcentage d'humidité.

Maiériels et Méthodes

3.7.2 Mesure du pH

La détermination du pH est effectuée directement sur la suspension obtenue avec l'échan-

60

tillon de fermentation solide (Fig. 3.2) La mesure est réalisée à l'aide d'un pH mètre digital Knick

muni d'une électrode combinée Ingold. L'étalonnage de l'appareil est réalisé au moyen des solu-

tions tampon (Schott-Geräte) de pH 4 et 7 à 25 °C.

3.8 Dosage des substrats et des produits de la fermentation par HPLC

Au cours de ce travail nous avons mis au point une méthodologie analytique par HPLC per-

mettant la séparation et la quantification simultanée d'un certain nombre de composants produits

lors de la fermentation, en particulier des sucres, des acides organiques et des alcools. Les échan-

tillons de fermentation sont centrifugés puis filtrés sur filtre $0,45~\mu m$ (Fig. 3.2). Les filtrats sont

dilués afin d'obtenir des concentrations en sucres comprises entre 0 et 10 g/l.

Les composants ont été séparés sur une colonne "Biorad" Aminex HPX87H. Cette colonne

sépare les solutés par l'action combinée d'une interaction hydrophobe et d'un échange d'ions. La

résine greffée H⁺ est un copolymère de styrène et de sulfonate de divinyl benzène.

Deux détecteurs sont branchés en série en sortie de colonne : un réfractomètre pour détecter

des sucres et quelques acides organiques et un détecteur UV à 210 nm qui met en évidence les

substances présentant des doubles liaisons. L'analyse est effectuée au moyen d'un appareillage mo-

dulaire, constitué d'une pompe LDC Constametric 3200, un four Jones Chromatography, d'un dé-

tecteur réfractomètre Philips PU 4026 et un détecteur ultraviolet LDC Spectromoniton 3100. Les

signaux provenant des détecteurs sont traités par un logiciel d'intégration informatisé nommé

CHROMA et commercialisé par la Société Biosystème. Les conditions opératoires sont les sui-

vantes (GIRAUD et coll., 1991):

- Détecteurs :

Réfractomètre et ultraviolet à 210 nm

- Solvant-éluant :

H2SO4 6 mM

- Débit du solvant :

0.8 ml/min

Pression :

800 - 900 PSI ou MegaPa

Volume injecté :

20 µl

Le tableau 3.1 montre la liste de composants détectés et possible de quantifier aussi que ses temps respectifs de rétention.

TABLEAU 3.1. Composants séparés par l'HPLC et quantifiés sur un détecteur ultraviolet et à index réfractométrique

	UV	Réfractomètre	
Composant	Temps de rétention (min)	Temps de rétention (min)	
Amidon		4,63	
Acide Oxalique	5.09	5,36	
Glucose		6,80	
Acide Malique	7,09	7,21	
Acide Lactique	9,53	9,67	
Acide Acétique	11,22	11,35	
Acide Propionique	13,16	13,30	
Acide Isobutyrique	14,73	14,88	
Méthanol		14,89	
Acide Butyrique	15,95	16,10	
Ethanol		17,00	
Acide Isovalérique	18,25	18,42	
Acide Valérique	21,55	21,74	

3.9 Mesures des activités amylasiques

3.9.1 α amylase

Les dosages sont effectués après dilution (1/10) de l'échantillon (Fig 3.2). Les réactions sont réalisées dans des tubes à essai de 5 ml contenant : 0,2 ml de l'échantillon et 1,6 ml d'une solution d'amidon soluble (Prolabo) à 10 g/l, tamponnée à pH 6,5 à l'aide de phosphates (1/15 M, soit KH2PO4 : 6,389 g/l et Na2HPO4·2H2O : 3,5195 g/l; OTENG-GYANG, 1979).

Les cinétiques de réaction sont réalisées sur 30 min à 40 °C. Toutes les 5 minutes la réaction d'un tube différent est bloquée par l'addition de 0,2 ml de HCl 1 N. L'activité α amylasique est do-sée en mesurant la concentration en amidon de la solution par le dosage à l'iode.

Une unité α amylase est définie comme la quantité d'enzyme hydrolysant 10 mg d'amidon en 30 min dans ces conditions (OTENG-GYANG, 1979).

3.9.2 Amyloglucosidase

Les dosages sont effectués après dilution de l'échantillon (Fig 3.2). Les réactions ont été effectuées dans des tubes à essai de 5 ml contenant : 0,2 ml de l'échantillon et 1,6 ml d'une solution d'amidon soluble (Prolabo) à 10 g/l, tamponnée à pH 5 avec sels de phosphates (1/15 M, soit KH2PO4 9,0 g/l et Na2HPO4·2H2O 0,095 g/l).

Les cinétiques de la réaction sont suivies sur 60 min à 50 °C. Toutes les 10 min. la réaction d'un tube différent est bloquée par l'addition de 0,2 ml de NaOH 1 N. L'activité amyloglucodasique est dosée en mesurant la libération de sucres réducteurs par la méthode de MILLER (1959). Les sucres sont exprimés en équivalent de glucose. L'unité internationale (UI) amyloglucosidase est définie comme étant la quantité d'enzyme libérant 1 µmol de glucose par minute (ALAZARD et RAIMBAULT, 1981). L'activité amyloglucosidase peut aussi être définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 10 mg de glucose en 30 min (U; OTENG-GYANG, 1979).

3.10 Analyse des gaz

Deux systèmes différents d'analyses des gaz ont été utilisés : le premier est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG) muni d'un détecteur à conductivité thermique. Le deuxième système est doté d'une détection infrarouge pour le CO2 et d'un polarographe "Beckman" pour l'O2. Avant que ce travail n'ait été réalisé, les différents types d'analyse des gaz étaient réalisés de façon conventionnelles à l'aide d'enregistreurs analogiques. Un effort considérable a été mené dans cette étude afin d'automatiser la prise de données. Ainsi, chaque système d'analyse est couplé à un ordinateur permettant de suivre l'évolution des gaz tout au long de la FS.

Le couplage de cet appareillage avec des fermenteurs en culture solide et la mise au point de l'automatisation informatisée de la prise des données, constitue un partie très importante du travail de la thèse. Etant considéré comme le développement d'une méthodologie nouvelle, la présentation en sera faite dans un chapitre suivant. Nous nous contenterons dans ce chapitre, d'en expliquer le principe de détection et la calibration des appareils.

3.10.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Le chromatographe IGC 11 de DELSI utilisé est un chromatographe à colonne concentrique, équipé d'un détecteur à catharomètre et d'un four permettant de régler de façon isothermique, la température de la colonne et celle du détecteur. Il n'y a pas de régulation de température au niveau de l'injecteur. Cet appareil est utilisé en continu grâce à un injecteur automatique.

Les catharomètres sont des cellules de conductivité thermique. La température, prise par un fil métallique chauffé électriquement, dépend de la conductivité thermique du gaz qui l'entoure. Comme la résistance électrique d'un conducteur métallique varie avec la température, la résistance du conducteur d'une cellule de catharomètre variera avec la nature du gaz qui la traverse. Le détecteur catharométrique est constitué de deux cellules montées en pont de Wheatstone; l'une, la cellule de référence est traversée par le seul gaz vecteur; l'autre, la cellule de mesure, est traversée par la phase mobile et le soluté. Le pont est équilibré au préalable; lorsqu'un soluté traverse la cellule de détection, le pont est déséquilibre, la tension de déséquilibre est amplifiée et enregistrée. Le déséquilibre est proportionnel à la quantité de gaz passant sur les filaments. La température de la résistance influe sur la sensibilité de l'appareil, elle augmente lorsque la température décroît.

La colonne utilisée pour séparer les composants est une colonne concentrique "Alltech" CTR I. La colonne extérieure est remplie d'un support jouant le rôle de tamis moléculaire 5A, tandis que la colonne centrale est remplie à l'aide de Porapak, polymère poreux ne retenant pas les gaz. Les conditions opératoires de la CPG sont les suivantes:

Détecteur :

Conductivité thermique

Température :

60°C isothermique

Phase mobile:

Hélium

Débit de l'éluant :

35 ml/min

Tension du :

160 mA

Pression de l'éluant :

1 bar

Volume injecté:

0,3 ml

Chaque gaz présente une conductibilité thermique différente, il est donc nécessaire d'étalonner le détecteur avant de procéder à l'analyse des gaz à mesurer (CO2, O2, N2). Pour ce faire, des mélanges étalons sont utilisés et des courbes de calibrations sont établies pour chaque gaz. Cette colonne double permet de séparer les composants suivants:

Composants	Séparation	Temps de rétention (min)	
Air	Colonne porapak	0,38	
Méthane	Colonne porapak	- '	
Dioxyde de carbone	Colonne porapak	0,60	
Oxygène	Colonne tamis moléculaire	1.50	
Azote	Colonne tamis moléculaire		
Méthane	Colonne tamis moléculaire		
Monoxyde de carbone	Colonne tamis moléculaire	-	

Après intégration et calcul des pourcentages des différents gaz on trace les cinétiques de production de CO2 ou de consommation d'O2 rapportées aux débits d'air traversant les colonnes de fermentation.

3.10.2 Mesure de l'O2 par polarographie et du CO2 par infrarouge

Ce système d'analyse est constitué par des analyseurs de gaz "Beckman" et commercialisés par la Société Physio-Systèmes en France. Il s'agit des appareils à vocation médicale mais ils ont été adaptés à l'étude des FS. L'O2 est mesuré par polarographie et le CO2 par infrarouge. Cet appareil permet de réaliser le suivi des gaz provenant d'une seule fermentation. Le deux détecteurs sont reliés au même ordinateur. L'ordinateur utilisé en acquisition de données, saisit en continu les différentes valeurs des gaz en fonction du temps. Un enregistreur conventionnel peut être branché pour tracer la teneur des gaz au cours de la fermentation. Le détail de la mise en oeuvre de cette technique est exposé dans le chapitre suivant.

L'analyseur d'oxygène Beckman modèle OM11 mesure la pression partielle en oxygène grâce à une électrode polarographique noyée dans un gel d'électrolyte. L'électrode est composée d'une cathode en or, d'une anode en argent et d'un électrolyte de KCl retenu par une fine membrane. Cette membrane sépare le compartiment de mesure du compartiment détecteur. Elle est perméable à l'oxygène et préserve le gel d'électrolyte de toute contamination. Une faible tension est appliquée en permanence entre les pôles, l'oxygène qui diffuse dans le gel est réduit sur la cathode induisant un léger courant électrique. Ce dernier est directement proportionnel à la pression partielle d'oxygène. Ce courant éléctrique est amplifié et converti de façon à donner un affichage numérique représentant la pression partielle d'oxygène.

La cellule est très sensible aux variations de pressions. L'air ambiant contient environ 21 % d'oxygène quelle que soit la pression totale. La somme des pressions partielles des gaz secs est égale à la pression totale (loi de Dalton). Par contre la dissolution des gaz dans les liquides est directement proportionnelle à la pression exercée sur ces liquides (loi de Henry). A 2 bars le détecteur sera donc en présence de deux fois plus d'oxygène et indiquera par conséquent 42 % d'O2 dans l'air ambiant. Pour pallier à ce problème, une calibration préalable à toute analyse est réalisée avec les mêmes débits et la même pression que ceux utilisés au cours de la fermentation. De plus cette calibration est réalisée à l'aide de gaz étalon de composition et de concentration connues.

L'analyseur de dioxyde de carbone Beckman modèle LB2 mesure la pression partielle en gaz carbonique à l'aide d'un détecteur infrarouge. Certaines molécules de gaz absorbent l'énergie infrarouge. Chaque gaz présente un spectre d'absorption différent. Cette propriété des gaz à été mise à profit pour concevoir des détecteurs spécifiques permettant de déterminer la teneur d'un constituant dans un mélange de gaz.

Deux cellules, l'une de référence, l'autre de mesure, sont positionnées sur un compartiment cloisonné en deux parties par une fine lame métallique contenant du CO2. Le rayonnement infrarouge traverse à la fois la cellule de mesure et la cellule étalon. Lorsque le gaz est le même dans les deux cellules, le rayonnement infrarouge atteignant le compartiment cloisonné (situé à l'arrière et contenant le gaz carbonique) est le même de part et d'autre de la cloison métallique : il n'y a pas de déformation de la lame de métal. Lorsque le gaz à analyser contient du gaz carbonique, celui-ci

absorbe l'infrarouge. L'intensité du rayonnement lumineux atteignant le compartiment cloisonné situé derrière la cellule de mesure est moindre.

Comme l'absorption de l'infrarouge, induit une agitation moléculaire importante des molécules de CO2, la pression augmente. La pression est plus forte dans le compartiment situé derrière la cellule étalon puisque l'intensité lumineuse reçue est plus grande. La lame métallique s'incurve vers le compartiment de mesure ou la pression est la plus faible ; la déformation du diaphragme modifie une capacité existante entre lui et une lame fixe du compartiment détecteur. Une lame de Chopper tournant à 2700 t pm interrompt le faisceau infrarouge 2 fois par tour. Ceci produit un signal modulé à 90 Hz dont l'amplitude moyenne est proportionnelle à la concentration du gaz dans la cellule échantillon. Ce signal est amplifié, démodulé et filtré pour donner à la sortie une valeur en pourcentage du gaz analysé.

Comme pour l'analyseur d'oxygène une calibration est réalisée à l'aide de gaz étalon dans des conditions identiques à celle utilisées ultérieurement. La variation dans le temps est beaucoup moins grande, car elle ne dépend pas de l'état d'oxydation d'une électrode ou de la qualité d'un électrolyte. Là aussi les résultats sont enregistrés et saisi en continu.

3.11 Expression des résultats

3.11.1 Evaluation de la biomasse, des substrats et des produits

Les résultats expérimentaux sont exprimés par rapport à la matière sèche initiale (MSI). Il est donc nécessaire de tenir compte de la perte de poids sec due à la respiration des microorganismes ainsi que des dilutions effectuées pendant les analyses. La technique utilisée pour développer les formules de calcul a été basée sur l'analyse dimensionelle. Par exemple le calcul d'évaluation de la biomasse par augmentation en poids sec sera :

Matériels et Méthodes

où X est la biomasse (mg/ml) estimée à partir de la suspension libre de bagasse (Fig 3.2); D est l'inverse de la dilution effectuée de l'échantillon de la fermentation (ml/g de matière fraîche); le % MS est la teneur en matière sèche exprimée en pourcentage, % Perte est le pourcentage de poids sec perdu jusqu' au moment du prélèvement (100 * (g MSI - g MS)/ g MSI).

Ce calcul est également valable pour le comptage des cellules, le dosage des sucres et d'autres produits de la fermentation tels que les alcools et les acides organiques.

3.11.2 Calculs des rendements des fermentations

Les rendements sont calculés en tenant compte de l'augmentation de la biomasse, de la quantité de substrat consommé et des produits formés :

Yx/s: g de biomasse produite par g de substrat consommé

Yp/s: g de produit formé par g de substrat consommé

Dans les cas des fermentations réalisées en conditions mixtes d'aération, aérobiose puis anaérobiose (§ 6.3 et 7), les rendements en alcool peuvent être exprimés comme un rendement apparent, c'est-à-dire, le rendement est calculé en prenant en compte la consommation totale de glucides pendant les deux phase de la fermentation.

Dans le cas de la transformation d'amidon en éthanol le rendement théorique de la fermentation est calculé selon l'équation :

soit 1 g d'amidon permet la formation de 0,568 g d'éthanol ou 1 g de glucose donne 0,511 g d'alcool (STEWART et coll., 1984b).

68

3.11.3 Résultats des analyses des gaz

Les résultats de la respirométrie (mesures de l'O2 et du CO2) ont toujours été exprimés par rapport à la matière sèche initiale. Les analyses permettent de mesurer directement la vitesse instantanée (dérivée) de l'évolution des gaz ou de déterminer leur production globale (intégrale).

La mesure directe de la vitesse instantanée (dérivée) de la production ou de la consommation des gaz est réalisée par l'échantillonnage d'un courant d'air provenant de la fermentation. Les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche initiale selon l'équation suivante :

où CO2 et O2 sont les teneurs des gaz dans l'air, exprimées en pourcentage (p.e. CO2 ≈ 0% et O2 ≈ 21 % au début de la fermentation), le débit de l'air est exprimé en ml/min, le poids du contenu de la colonne est exprimé en gramme et la teneur en matière sèche initiale exprimée en pourcentage (% MSI).

L'accumulation ou la consommation total des gaz peut être calculée en intégrant les données de la vitesse par la règle du trapèze selon la formulation suivante :

$$\Delta t * C_i + (C_{i+1} - C_i) * \Delta t * 0.5$$

ou Δt est l'intervalle de temps entre deux analyses, i et i+1, Ci est la valeur de la concentration du gaz au début de l'intervalle du temps, et C i+1 est la valeur du gaz à la fin du même intervalle.

La mesure directe de la production ou de la consommation globale (intégrale) des gaz est réalisée dans un volume confiné avec recirculation d'air. Dans ce cas le calcul des teneurs des gaz s'effectue selon l'équation suivante :

où CO2 et O2 sont les pourcentages des gaz donnés par l'analyse, V est le volume total (ml), le Poids initial représente la masse du contenu de la colonne de fermentation exprimé en grammes, % MSI est le pourcentage de matière sèche initiale de la fermentation.

Par ailleurs, le quotient respiratoire est donné par la relation :

3.11.4 Résultats des activités enzymatiques

Les dosages des activités enzymatiques ont été exprimés également par rapport à la matière sèche initiale. L'équation utilisée pour effectuer les calculs est la suivante :

$$\frac{\text{Pente * D_1 * D_2 * 100 (1-\% Perte/100)}}{\text{U * \% MS}} = \frac{\text{U } \alpha \text{ amylase}}{\text{g MSI}}$$

où Pente est la valeur de la dérivée calculée à partir des cinétiques enzymatiques (mg/ ml min); D1 est la dilution entre le milieu réactionnel et le surnageant de l'échantillon ; D2 est la dilution en poids de la fermentation solide (ml/g Matière fraîche); U est la définition de l'unité enzymatique donnée dans le § 3.9.1; % MS et % Perte ont les mêmes définitions que dans 3.11.1

Les résultats des activités amyloglucosidasiques ont été exprimés par rapport à la matière sèche au moyen de l'équation suivante :

Pente *
$$D_1$$
 * D_2 * 1×10^6 * $100 (1-\% \text{ Perte}/100) = UI \text{ amyloglucosidasique}$
% MS * 180 g MSI

où Pente est la valeur de la dérivée calculée à partir des cinétiques enzymatiques (g/ l min), D1, D2, % MS et % Perte ont la même définition que pour le cas de la α amylase. En multipliant le résultat par un facteur égal à 0,54 on obtient la valeur de l'activité amyloglucosidase exprimée par rapport à la définition donnée par OTENG-GYANG (1979).

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE SUIVI EN LIGNE DU METABOLISME DANS LES FERMENTATIONS SOLIDES PAR ANALYSE DES GAZ

4. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE SUIVI EN LIGNE DU METABOLISME DANS LES FERMENTATIONS SOLIDES PAR ANALYSE DES GAZ

4.1 Introduction

L'adhésion intense des champignons filamenteux sur le support de FS rend extrêmement difficile l'estimation de la biomasse par les méthodes couramment utilisées en FSm. Dans le cas des cultures de levures par FS le problème semble être moins grave, car il est tout à fait possible de séparer et de récupérer les cellules pour leur analyse ultérieure. Néanmoins, dans tous les cas l'analyse des gaz se révèle être un outil auquel on a souvent recours pour le suivi des FS, car l'hétérogénéité de la FS provoque des difficultés de dosage et d'échantillonnage. Les teneurs en gaz carbonique et en oxygène effluent de la fermentation solide sont directement liées à l'activité microbienne. Ces analyses de gaz permettent de suivre les différentes phases de fermentation, *in situ*, en continu et de façon non destructive.

Plusieurs auteurs ont expérimenté la méthode d'analyse de gaz qui semble être bien adaptée pour suivre le déroulement de la FS (GRANT et coll., 1978; RAMSTACK et coll., 1979; NISHIO et coll., 1979; OKASAKI et SUGAMA, 1979; SATO et coll., 1983; SATO et YOSHIZAWA, 1988). Cette technique d'analyse a été utilisée à plusieurs reprises dans notre équipe de recherche (RAIMBAULT, 1980; HUERTA, 1984; ROUSSOS, 1985; ORIOL, 1987; SAUCEDO-CASTA-ÑEDA, 1987; DUFOUR, 1990). Pour la plupart des cas mentionnés, la prise de données est réalisée aussi bien à l'aide d'un enregistreur analogique que par la lecture directe des mesures à partir de panneaux d'affichage.

Nous avons voulu mettre à profit cette étude pour améliorer d'une manière importante les techniques de suivi des FS.

Tout d'abord nous avons automatisé l'analyse des gaz de la FS. Ensuite, à l'aide de ces systèmes, nous avons mis au point un bioréacteur prototype de FS permettant d'étudier l'effet de l'environnement gazeux sur le déroulement des FS.

4.2 Automatisation de la mesure de gaz

Le développement des systèmes de suivi en temps réel de la FS, à été réalisé d'une part en utilisant la chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à catharomètre et d'autre part en utilisant des analyseurs spécifiques pour l'O2 et le CO2. Ces appareillages ont été connectés à des microordinateurs. Ces deux systèmes sont présentés ci-dissous.

4.2.1 Acquisition des données à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Un chromatographe "DELSI" IGC 11 muni d'un détecteur à conductivité thermique, d'un injecteur automatique et équipé d'une colonne concentrique qui permet de séparer l'O2 et le CO2, a été utilisé. Ce chromatographe a été connecté à un ordinateur (COPAM 386SXB/16) muni d'un programme d'intégration de chromatogrammes CHROMA de la société BIOSYSTEME.

Le logiciel d'intégration a également la capacité de contrôler des événements externes au travers de la programmation en BASIC, permettant l'échantillonnage. Nous avons développé un programme en BASIC permettant d'analyser jusqu'à 8 fermentations simultanément. Il est constitué d'une succession de 8 boucles d'analyse et de purge. Le nombre de fermentations à analyser peut être variable. L'organigramme permet de mieux comprendre le fonctionnement de ce programme (Fig. 4.1). Le programme utilisé pour l'échantillonnage des gaz est donné en annexe.

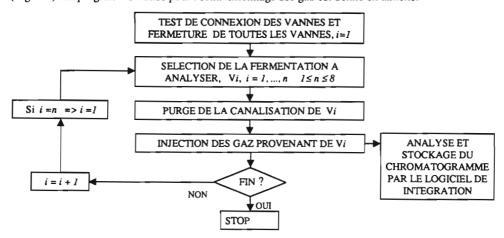


Fig.4.1 - Organigramme du programme d'échantillonnage des gaz de la FS.

Afin d'étudier la respiration sur plusieurs colonnes de fermentation simultanément (Fig. 4.2), un échantillonneur ainsi qu'un boîtier de commande de l'injecteur automatique sont utilisés. L'air effluent des différentes colonnes (8 au maximum) est collecté et séché puis acheminé par l'intermédiaire d'un cathéter vers l'échantillonneur automatique.

L'ordinateur commande la sélection d'une vanne de l'échantillonneur et son ouverture vers l'injecteur du chromatographe. Par la suite cette vanne est mise en position repos et une nouvelle vanne est sélectionnée en recommençant le cycle. Un balayage des différentes canalisations est réalisé en continu. Les vannes de l'échantillonneur sont connectées suivant un schéma de type arbre binaire. Les vannes sont à trois voies: une entrée et deux sorties. Lors qu'une vanne est sélectionnée pour l'analyse, une des sorties est automatiquement connectée vers l'injecteur; dans le cas contraire, les gaz sont ventilés vers l'atmosphère. Un temps de purge est nécessaire entre chaque injection. Le temps minimal nécessaire pour effectuer l'analyse et la purge est d'environ 3 minutes.

La composition en gaz de l'effluent d'une fermentation, peut ainsi être déterminée toutes les 3 minutes environ si une seule colonne est analysée où bien toutes les 30 minutes si les effluents provenant des 8 colonnes de fermentation sont analysés.

Les chromatogrammes sont stockés avec la date et l'heure exacte d'injection dans un fichier correspondant à la colonne considérée, soit 1 fichier différent par fermentation. En général il est souhaitable de ne pas dépasser 150 analyses par fichier, car au dessus de ce nombre le traitement ultérieur des données devient problématique. En effet il faut tenir compte du fait que les informations relatives à chaque analyse occupent environ 10 K octets.

Les résultats sont immédiatement disponibles sous forme de fonction: concentration en gaz (%) = f (temps). Ces résultats sont stockés sous un format texte (ASCII) permettant le transfert des données pour son traitement ultérieur. Ainsi les cinétiques de production de CO2 ou de consommation d'O2 peuvent être rapportées aussi bien aux débits d'air traversant les colonnes de fermentation qu'à la quantité de matière sèche initiale.

L'humidité de l'air provenant de la fermentation interfère avec le dosage des gaz, en diminuant le pourcentage volumique des gaz. Ce problème a été résolu en passant les gaz par un condenseur pour éliminer l'excès d'humidité, puis les traces d'eau sont captées par une colonne en silicagel.

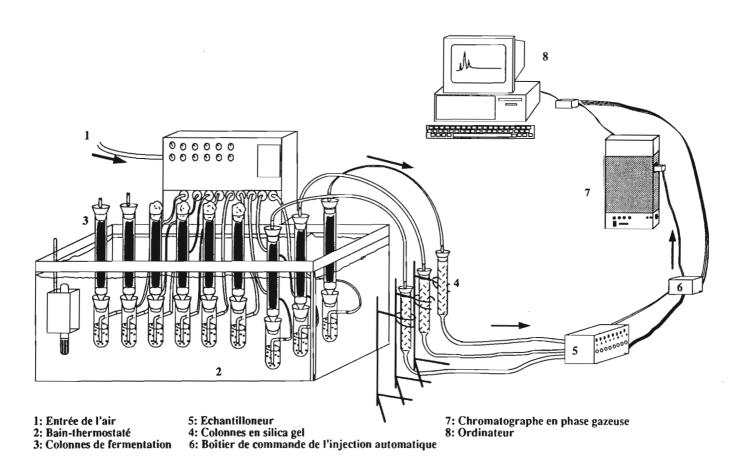


Fig 4.2: Dispositif d'analyse automatisé des gaz de la fermentation solide utilisant un chromatographe des gaz

La détermination de la concentration des gaz est directement liée au débit d'aération passant par le fermenteur, p.e., le CO2 produit ou l'O2 consommé sont plus ou mois dilués en fonction du débit de l'air. Pour palier à ce problème deux manodétendeurs sont placé en amont du système d'aération du dispositif d'incubation. Enfin, le débit de chaque colonne à analyser est contrôlé à la sortie de l'injecteur à l'aide d'un débimètre à bille.

4.2.2 Acquisition des données et pilotage à l'aide d'analyseurs spécifiques

Suite au système précédemment décrit nous avons voulu non seulement réaliser le suivi automatique de FS, mais aussi tenter de valider un nouveau système de pilotage pour les FS aérobies, toujours basées sur l'analyse des gaz. Nous ne reviendrons pas sur le suivi en temps réel qui a été déjà sufissament expliqué (§ 4.2.1). L'objectif du pilotage est de maintenir des conditions d'aération non limitantes pour la croissance. Le système a été spécialement conçu pour le fermenteur décrit dans le sous-chapitre suivant (§ 4.3), mais il peut s'appliquer à d'autres fermenteurs de culture en phase solide, en particulier le fermenteur statique nommé Zymotis (ROUSSOS, 1985).

Stratégie de pilotage

Le but du pilotage pour les FS aérobies est de faire varier le ravitaillement en O2 au fur et à mesure des exigences des microorganismes. L'aération sera faible pendant la phase de latence, elle augmentera graduellement jusqu'à un maximum au cours de la phase exponentielle, puis diminuera progressivement jusqu'à la phase stationnaire. Ce système permet de maintenir une faible teneur en CO2 et une forte concentration en O2 à la sortie du fermenteur.

La sélection du paramètre de contrôle a impliqué deux types de considérations: l'une d'ordre technique liée aux appareils d'analyse et l'autre d'ordre microbiologique.

La précision et la vitesse de réponse des appareils de mesure des gaz ont été comparées. L'analyseur infrarouge présente une résolution de 0,01 % ainsi qu'une vitesse de réponse rapide (0,13 s) pour l'analyse du CO2 dans l'air. Parallèlement pour l'O2 la précision et la vitesse de réponse sont de 0,1 % et de 1 seconde, respectivement. Par ailleurs, les gammes de mesure sont de 0 à 10 % et de 0 à 25 % pour le CO2 et le O2, respectivement.

Dans les processus de FS en aérobiose, l'épuisement de l'O2 conduit à des très hautes concentrations en CO2, conditions qui deviennent défavorables pour la flore microbienne. Le contrôle d'un de ces deux gaz pourrait servir de paramètre de régulation de la fermentation. En tenant compte de la précision et de la vitesse des appareils de mesure, c'est le CO2 qui a été choisi comme le paramètre à réguler pendant le pilotage des FS.

La teneur en CO2 dans le fermenteur a été régulée en augmentant ou en diminuant le débit d'air entrant dans le fermenteur. Dans le cas d'une teneur en CO2 supérieure à celle du point de consigne, le débit d'air doit être augmenté; il sera diminué si la concentration en CO2 mesurée est égale ou inférieure au point de consigne. Pour ce faire, un jeu de quatre vannes à pointeau et de quatre électrovannes a été mis en œuvre. Le débit diffère sur chaque électrovanne et est égal au double du débit délivré par l'électrovanne précédente, p.e., 100, 200, 400, 800 ml/min. Pendant le pilotage, l'ordinateur peut commander l'ouverture ou la fermeture de vannes de manière à obtenir 15 débits différents, variants de 100 à 1500 ml.min⁻¹, par paliers de 100 ml.min⁻¹. Le débit délivré pendant le pilotage est également stocké dans le fichier de résultats. La troisième électrovanne fonctionne à l'inverse des autres: lorsqu'elle se trouve en repos elle laisse passer l'air, dès qu'elle est activée elle bloque le passage de l'air. Ce choix d'inverser une électrovanne fut opté dans le souci d'éviter le manque d'oxygène au microorganisme lors d'une éventuelle coupure d'électricité. Le libre réglage des électrovannes permet d'appliquer ce système à d'autres tailles de fermenteur.

Description des programmes

La mesure des gaz est basée sur l'analyse polarographique pour l'oxygène (OM11) et par infrarouge pour le dioxyde de carbone (LB2). Les deux analyseurs ont été connectés à un ordinateur Apple IIe au moyen d'une carte d'interphase qui permet la conversion de signaux analogiques en données numériques. La carte a été fournie par DIGIMETRIX elle porte la référence GS-ADC12B16V4G. Par ailleurs, cinq sondes de température ont été couplées au système par leur connexion à la carte d'interphase. Le logiciel utilisé est donné en annexe.

Nous avons développé un programme spécialement conçu pour réaliser aussi bien l'acquisition des données (CO2, O2 et 5 températures) que le pilotage du fermenteur. Ce dernier a été déclaré comme optatif. Le programme est divisé en deux parties : la première est programmée en

langage BASIC et la seconde en langage ASSEMBLEUR.

Le programme en BASIC permet de réaliser un certain nombre d'opérations comme: a) initialiser les paramètres d'acquisition (nom du fichier, temps de suivi, intervalle d'échantillonnage, nombre de mesures à réaliser), b) établir l'option de pilotage et initialiser les paramètres (le point de consigne pour le CO2 % et le débit d'air au début de la fermentation), c) charger le programme en ASSEMBLEUR, d) créer et mettre à jour un fichier destiné à stocker les paramètres d'acquisition, e) commencer ou arrêter la prise de données, f) visualiser les données acquises en mode numérique ou graphique, et g) quitter le programme.

Le programme en ASSEMBLEUR permet de: a) calculer la gestion du temps réel (durée totale du suivi, intervalle d'échantillonnage et nombre de mesures à réaliser), et b) commander les électrovannes pour le pilotage du fermenteur.

L'exécution des programmes est schématisée dans la figure 4.3. Le mode d'opération des deux programmes est le suivant: le programme BASIC tourne en continu, tandis que le programme en ASSEMBLEUR balaye les valeurs données par les capteurs. Au moment de la prise de données l'ASSEMBLEUR envoie l'ordre au BASIC d'interrompre son exécution et de stocker les mesures. Par la suite le programme BASIC tourne à nouveau jusqu'à une nouvelle interruption pour la prise de nouvelles données. Ce mode opératoire a été choisi de manière à utiliser l'ordinateur pour l'acquisition de données, le moins de temps possible, tout en permettant de surveiller le déroulement de la fermentation la majeure partie du temps.

Dans le cas de l'utilisation du pilotage, le programme ASSEMBLEUR compare la valeur actuelle du CO2 avec le point de consigne, et commande les électrovannes afin de faire varier le débit d'air à l'entrée du fermenteur.

Le programme est prévu pour un démarrage automatique lors d'une éventuelle coupure d'électricité. Les paramètres d'acquisition sont stockés dans un fichier temporaire, pendant toute la durée de la fermentation. Au cours de la prise de données le nombre de mesures à réaliser est mis à jour après chaque acquisition. Ce fichier temporaire est détruit seulement par l'arrêt volontaire ou automatique de l'acquisition. Si au démarrage ce fichier existe déjà le programme suit les instructions contenues dans le fichier jusqu'à la fin de la prise de données.

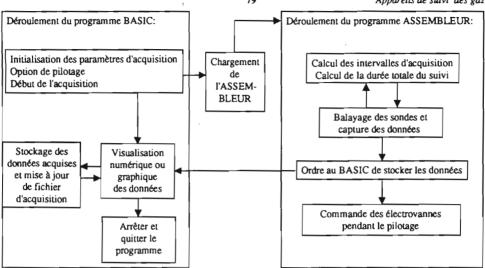
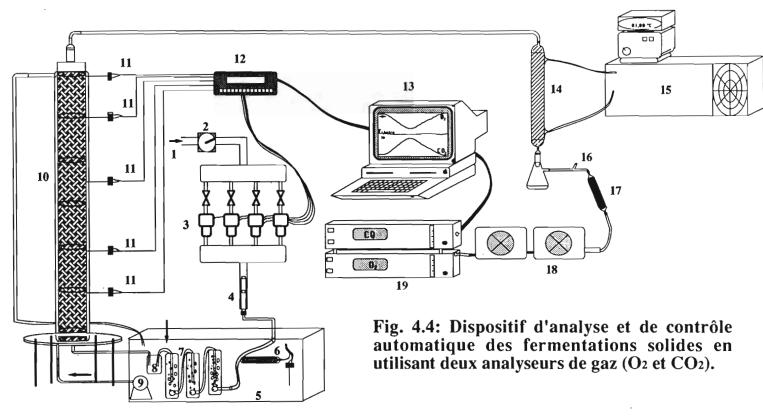


Fig. 4.3 Schéma d'exécution et d'interaction des programmes en BASIC et en ASSEMBLEUR pendant l'acquisition et pilotage du fermenteur à l'aide des analyseurs spécifiques.

Description de l'ensemble du dispositif expérimental

Les principales caractéristiques de ce système automatique de suivi de l'évolution des gaz et de pilotage sont schématisées à la figure 4.4. Les détails du fermenteur et les résultats en l'absence et en présence de pilotage sont respectivement présentés ci-dessous (§ 4.3.1, 4.3.2 et 4.3.4).

Le système d'analyse n'est fiable que pour des débits d'air compris entre 100 et 500 ml.min⁻¹ (Fig. 4.4). Le courant d'air provenant des fermenteurs est acheminé vers les cellules d'analyse. Cet air est préalablement séché car la condensation de l'eau causerait la détérioration des cellules de mesure. Pour ce faire, l'air à analyser traverse un réfrigérant à 2° C, puis une colonne de silicagel préalablement déshydratée à l'étuve à 105° C pendant 48 h. Une pompe permet d'échantillonner un débit constant du flux d'air provenant du fermenteur, puis de l'acheminer vers les cellules de mesure. Le débit de cette pompe est toujours inférieur à celui des colonnes de fermentation afin de ne pas diluer l'effluent avec de l'air ambiant. L'excédent d'air est éliminé vers l'atmosphère. Pour permettre de conserver tout au long de la fermentation les mêmes conditions opératoires, les cellules de mesure sont thermostatées, ainsi que les cathéters acheminant les gaz. Deux cellules de mesure différentes sont utilisées : l'une pour la mesure de la teneur en oxygène, l'autre pour la mesure de la teneur en gaz carbonique.



- 1: Entrée d'air
- 2: Manodetendeur
- 3: Jeu d'électrovannes
- 4: Débimètre
- 5: Bain-thérmostaté
- 6: Résistance chauffante
- 7: Humidificateur
- 8: Piège d'eau

- 9: Pompe à eau
- 10: Fermenteur
- 11: Sonde de température
- 12: Interphase analogique numérique
- 13: Ordinateur 16: Purge de ventilation

14: Réfrigerant

15: Cryostat

- 17: Colonne en silica gel
- 18: Cellules d'analyse pour le CO2 et l'O2
- 19: Pompes d'aspiration d'air

Bien entendu le système précédemment décrit peut être utilisé aussi bien en mode d'acquisition seul qu'en mode d'acquisition et de pilotage. D'autre part, il est tout à fait possible d'analyser les gaz effluents des petites colonnes de fermentation (Fig. 4.2). La seule limite étant le débit faible, il suffit de rassembler l'air provenant de plusieurs colonnes afin d'obtenir un débit fluctuant entre 100 et 500 ml.min⁻¹.

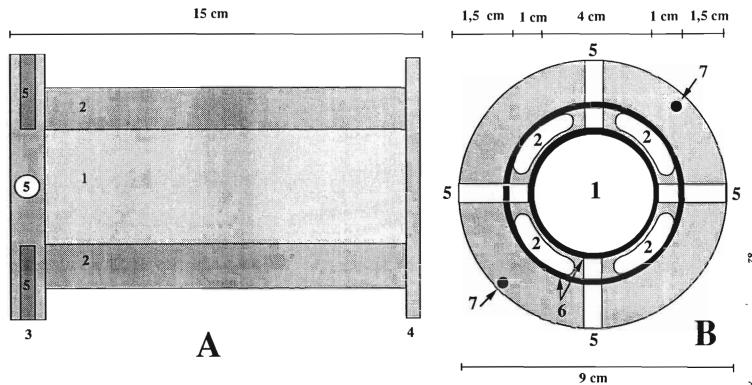
4.3 Mise au point d'un fermenteur prototype

Au cours de cette étude nous avons mis au point un bioréacteur prototype de FS permettant la mise en évidence de l'effet de l'environnement gazeux sur le métabolisme microbien. A ce propos, les deux techniques automatisées précédemment décrites ont été utilisées. Dans les quatre souschapitre suivants, nous présenterons la description du fermenteur, la comparaison des deux systèmes d'analyses (CPG et analyseurs spécifiques) ainsi que les différents modes opératoires du fermenteur.

4.3.1 Description du fermenteur

Le bioréacteur est composé de six segments de 15 cm de long chacun et de 4 cm de diamètre, soit une hauteur globale de 90 cm. Le détail d'un de ces modules est schématisé dans la Fig. 4.5. Chaque module est constitué d'un tube interne de verre et d'un tube externe d'acrylique. Des brides en acrylique permettent l'assemblages des tubes. Des ouvertures sont pratiqués dans ces rondelles permettant la circulation de l'air et de l'eau. La bride inférieure est munie de quatre ouvertures permettant l'insertion des différents capteurs. Un système de tenon/mortaise fait coïncider les modules entre eux. L'étanchéité est assurée par des joints toriques. Les modules sont empilés et assemblés au fur et à mesure sur un support approprié. Quatre tiges filetées sont fixées au support de telle sorte que les modules sont maintenus fermement ensemble par des écrous sur la partie supérieure. Les entrées d'eau et d'air sont situées dans la partie inférieure du fermenteur, tandis que les sorties se trouvent dans la partie supérieure.





- A: vue latérale et B: vue transversale.
- 1: Chambre de fermentation
- 2: Double paroi (circulation d'eau) 3: Platine inférieure

- 4: Platine supérieure
- 6: Joints toriques
- 5: Ouvertures pour l'insertion des capteurs 7: Vis-trou d'assemblage des modules

Fig 4.5: Détail d'un segment du fermenteur prototype

Le fermenteur complètement assemblé a un volume de 1.1 l environ et une capacité utile de 370 g de milieu solide humide. L'humidification de l'air est réalisée par passage de l'air au travers de trois colonnes successives contenant de l'eau (Fig. 4.4). Pour un fonctionnement satisfaisant du fermenteur, plusieurs accessoires périphériques sont nécessaires : a) un jeu d'électrovannes, disposé avant les humidificateurs, permettant de varier l'alimentation d'air, b) un système de chauffage de l'eau de circulation et de l'air humidifié; c) un piégeage de l'eau de condensation de l'air est placé après la sortie du fermenteur, le condensateur permet d'éliminer l'excès d'eau dans l'air évacué; d) une colonne de silicagel pour le séchage final de l'air évacué; e) une pompe à membrane pour le prélèvement de l'air provenant du fermenteur, f) puis finalement les cellules d'analyse.

4.3.2 Comparaison des deux systèmes d'analyse des gaz

La comparaison entre les deux systèmes d'analyse, CPG et analyseurs spécifiques, a été possible par la connexion en série des deux appareillages. L'évolution des gaz au cours de la FS de *Schwanniomyces*, mesurée à l'aide de la CPG et des analyseurs Beckman, est montrée dans la Fig. 4.6. Le détail des conditions de culture seront données dans le chapitre 6.1.

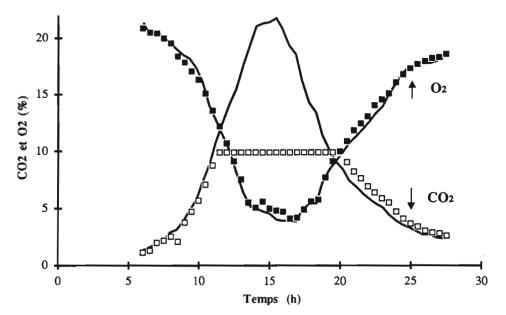


Fig. 4.6.- Evolution du CO2 et de l' O2 à la sortie du fermenteur lors de la culture de Schwanniomyces castellii en milieu solide. Les lignes correspondant aux analyses réalisées par CPG et les symboles par les analyseurs Beckman.

D'après l'analyse de la Fig. 4.6, on a pu vérifier que pour les deux systèmes d'analyse le calcul du temps réel de la fermentation est tout à fait équivalent. Le moment d'inoculation du milieu de culture par les cellules de *Schwanniomyces* est considéré comme le temps zéro de la fermentation. Par ailleurs la précision des analyses des gaz, réalisées aussi bien par la CPG que par les analyseurs Beckman, se révèlent tout à fait similaires.

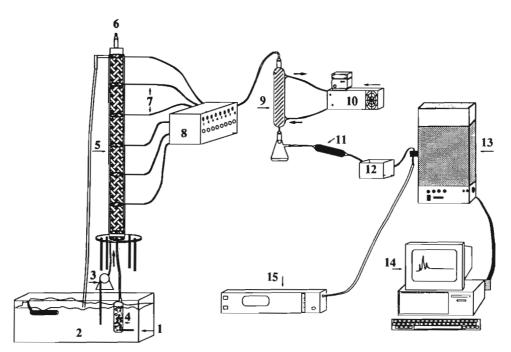
Les résultats obtenus ont confirmé les limites de l'analyseur du CO2 à doser des concentrations en gaz carbonique supérieures à 10 %. Cette limitation imposée par l'appareil empêche de suivre les FS à haute teneur en CO2. La technique par CPG est quant à elle tout à fait capable de surmonter cette limitation (Fig. 4.6).

Le deux systèmes d'analyse automatique développés au cours de cette étude offrent les moyens techniques pour suivre le déroulement de la FS d'une manière fiable, et permettent de connaître l'état physiologique de la culture à tout instant et en temps réel (voir chapitre 5 et 6).

4.3.3 Différents modes opératoires du prototype de fermentation

Le couplage du fermenteur prototype avec les deux systèmes d'analyse développés a permis d'ouvrir une gamme importante de possibilités pour l'étude du métabolisme gazeux des FS:

- a) Piloter le fermenteur prototype pour maintenir des conditions d'aération non limitantes pour la croissance (Fig. 4.4). Les résultats sont discutés dans le chapitre 6.1.
- b) Etudier l'évolution des gaz à l'intérieur du fermenteur prototype: la CPG a été utilisée pour l'analyse des gaz, comme il est schématisé à la Fig. 4.7. Cet arrangement permet d'obtenir la mesure des gaz en fonction de la hauteur du fermenteur et du temps simultanément. Les résultats expérimentaux sont présentés dans le chapitre 6.1.



1: Entrée de l'air 2: Bain-thérmostaté

5: Fermenteur

6: Sortie d'air du fermenteur

9: Réfrigerant 10: Cryostat

13: Cromatographe en phase gazeuse

14: Ordinateur 15: Pompe d'aspiration d'air

3: Pompe à eau 4: Humidificateur

7: Cathéters d'échantillonage d'air 8: Echantillonneur

11: Colonne en silica gel 12: Boîtier de commande de l'injection automatique

Fig 4.7: Dispositif pour analyse des gaz en CPG à différentes hauteurs du fermenteur

c) Etudier les fermentations (aérobies-anaérobies) à très haute teneur en CO2 et faible concentration en O2, cela a été possible grâce à la circulation des gaz de fermentation (en circuit fermé) ainsi qu'à leur analyse à l'aide de la CPG. Le dispositif expérimental est montré à la Fig. 4.8. Les résultats obtenus sont également discutés au cours du chapitre 6.

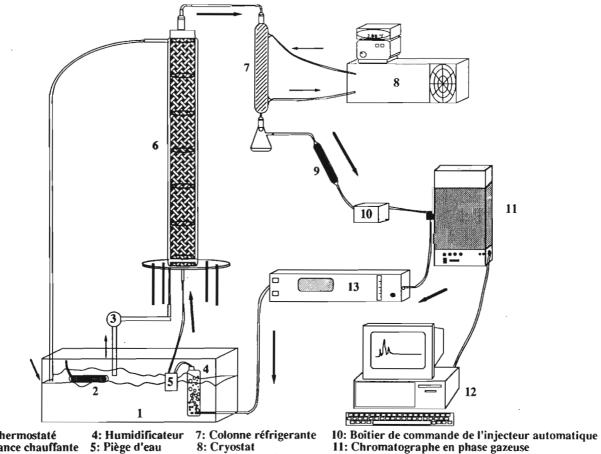
4.4 Conclusion

Le système d'analyse basé sur la chromatographie en phase gazeuse (CPG) permet de suivre le déroulement de plusieurs fermentations menées simultanément. Il permet notamment d'accélérer les études d'optimisation des conditions de culture ainsi que d'évaluer la reproductibilité des résultats des fermentations.

Un deuxième système automatique d'analyse des gaz utilisant des analyseurs Beckman a été également mis au point.

A l'aide de ces systèmes d'analyse, nous avons mis au point un bioréacteur prototype de FS qui permet d'étudier l'effet de l'environnement gazeux sur la croissance. Les différents modes de couplage entre le fermenteur prototype et les appareils d'analyse, offrent la possibilité d'étudier la FS aussi bien en condition aérobie qu'en anaérobie.

Les deux systèmes d'analyse automatique développés au cours de cette étude offrent les moyens techniques pour suivre en continu le déroulement de la FS d'une manière fiable. Ils permettent de connaître aussi bien l'état physiologique de la culture en tout instant, sans prélèvement et perturbation de la fermentation, que de contrôler le processus fermentaire.



1: Bain-thermostaté 2: Resistance chauffante

3: Pompe à eau

- 5: Piège d'eau
- 6: Fermenteur
- 8: Cryostat
- 9: Colonne à siliga gel 12: Ordinateur
- 13: Pompe à circulation de gaz

Fig 4.8: Dispositif experimental pour le fonctionnement du fermeteur en circuit fermé

ADAPTATION DE Schwanniomyces castellii A LA CULTURE EN FS

5. ADAPTATION DE Schw. castellii A LA CULTURE EN FS

L'analyse bibliographique a montré que l'utilisation des levures en FS se limite à la fermentation alcoolique (Tableaux 2.1 et 2.3). A notre connaissance seul deux exemples de culture de Schwanniomyces en milieu solide ont été publiés (ROSSI et CLEMENTI, 1985; YANG, 1988), tous les deux traitent de l'enrichissement en protéines de substrats amylacés. Ces articles ne font pas mention de la culture de Schw. sur support. Dans le cadre, de ce travail il était donc indispensable de réaliser une étude pour définir les conditions de culture de Schw. en FS sur support.

Etant donné que la FS est un procédé réalisé dans des conditions non stériles, le taux d'inoculation est un facteur important à étudier. D'autre part, la sensibilité des amylases de *Schw*. au pH (BOZE et coll., 1989; CLEMENTI et ROSSI, 1986; CALLEJA et coll. 1984 et 1986b, LUSENA et coll., 1985), et le contrôle difficile de ce paramètre en FS (RAIMBAULT, 1980; DURAND et CHEREAU, 1988) obligent à réaliser une étude plus approfondie. Par ailleurs, une étude nutritionnelle est nécessaire.

Le but de ce chapitre est outre l'établissement des conditions de culture pour Schwanniomyces castellii en phase solide, l'application de la méthodologie de suivi des FS basée sur l'analyse des gaz de fermentation décrite dans le chapitre précédent.

5.1 Influence de l'inoculum

Tout comme en fermentation immergée une inoculation massive et des conditions de culture favorables doivent faciliter le développement des microorganismes désirés. Nous présenterons ici les résultats d'essais de culture de *Schwanniomyces* en FS en fonction de la taille et de la qualité de l'inoculum.

5.1.1 Effet du taux d'inoculation

Le taux d'inoculation est exprimé en nombre de cellules/ml de milieu à adsorber. Ceci permet de l'exprimer par rapport à la quantité de support, par rapport à la concentration d'amidon,

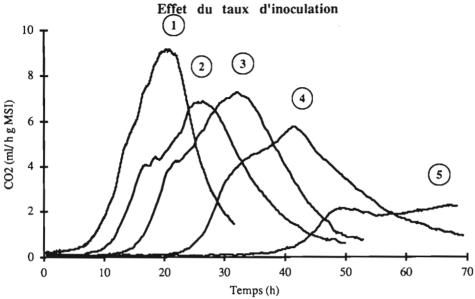


Fig. 5.1.- Effet du taux d'inoculation sur la vitesse de production de CO2 au cours de la croissance de *Schwanniomyces castellii* en FS. Les numéros sur la figure: 1, 2, 3, 4 et 5, correspondent respectivement à des taux d'inoculation suivants (nombre de cellules/ml): 5.7×10^{7} ; 3.9×10^{6} ; 5.8×10^{5} ; 3.8×10^{4} et 3.6×10^{3} .

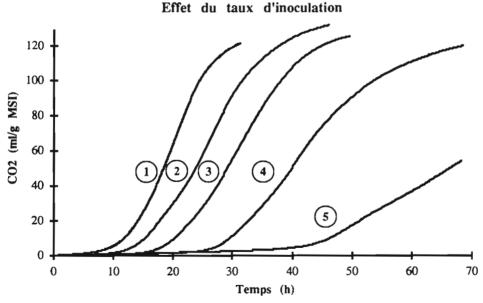


Fig. 5.2.- Effet du taux d'inoculation sur le dégagement du CO2 au cours de la croissance de *Schwanniomyces castellii* par FS. Les numéros sur la figure: 1, 2, 3, 4 et 5, correspondent respectivement à des taux d'inoculation suivants (nombre de cellules/ml): 5.7×10^{7} ; 3.9×10^{6} ; 5.8×10^{5} ; 3.8×10^{4} et 3.6×10^{3} .

mais aussi par rapport au volume du réacteur sachant que la densité apparente du support est égale à 0,35. Les fermentations ont été réalisées en conditions aérobies, dans un milieu de culture contenant de l'amidon à 100 g/l comme substrat. L'humidité et le pH initial étaient fixés respectivement à 72 % et à 6,5. L'âge des inocula a été de 24 h.

Les taux d'inoculation testés ont été: 5,7 x 10⁷; 3,9 x 10⁶; 5,8 x 10⁵; 3,8 x 10⁴ et 3,6 x 10³ cellules/ml de milieu de culture adsorbé. L'effet du taux d'inoculation sur la vitesse de formation et la production du CO₂ au cours des fermentations est présenté sur les Fig. 5.1 et 5.2.

Les résultats obtenus montrent que le démarrage de la fermentation est directement lié au taux d'inoculation utilisé. En effet une augmentation progressive de la phase de latence est observée au fur et à mesure de la diminution du taux d'inoculation. Ce démarrage tardif entraîne un retard sur le déroulement des fermentations (Fig. 5.1 et 5.2) ainsi qu'une diminution graduelle des vitesses maximales de production de CO2 (Fig. 5.1). Par contre nous pouvons observé que la production totale de gaz (Fig. 5.2) semble être moins sensible aux variations du taux d'inoculation de 10^4 à 10^7 cellules/ml.

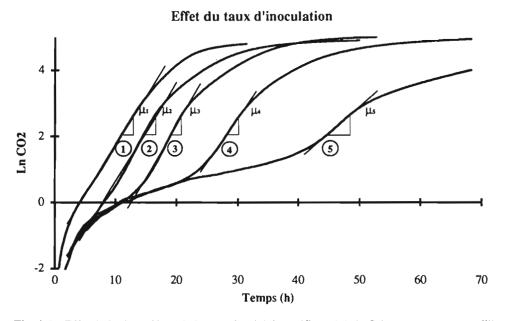


Fig. 5.3.- Effet de la dose d'inoculation sur l'activité spécifique (μ) de Schwanniomyces castellii calculé à partir du Ln CO2, dans de la culture de par FS. Les numéros sur la figure: 1, 2, 3, 4 et 5, correspondent respectivement aux de taux d'inoculation suivants (nombre de cellules/ml): 5.7 x 10^7 : 3.9 x 10^6 : 5.8 x 10^5 : 3.8 x 10^4 et 3.6 x 10^3 .

Le logarithme de la production totale de CO₂ a été calculé afin d'estimer l'activité spécifique, μ (Fig. 5.3). Nous verrons plus loin (§ 5.5) que cette activité peut être assimilée au taux de croissance. Les valeurs de μ obtenues sont rassemblées dans le Tableau 5.1. Nous observons que le taux de croissance reste pratiquement constant pour des taux d'inoculation variant de 10⁷ à 10⁵ cellules/ml, on note cependant une légère diminution à 10⁴ cellules/ml. A partir des analyses microscopiques des échantillons, nous avons pu observer la présence de bactéries et de champignons contaminants pour un taux d'inoculation inférieur à 5,8 x 10⁵ cellules/ml. Un population de *Schwanniomyces* axenique atteint des tailles de l'ordre de 5 x 10⁹ cellules/ml en fin de réaction.

Tableau 5.1 Effet du taux d'inoculation sur les paramètres caractérisant le deroulement de la culture de Schw. castellii en phase solide.

_	de la culture de seum: custetti en phase sonde.								
	Taux	μ	Phase de	CO ₂ formé	Nombre de cellules	Contaminations			
	d'inoculation		latence		par ml à la fin de la				
	cellules / ml	h-1	h	ml/ g MSI	fermentation				
1	5,7 x 10 ⁷	0,30	3	121,8	4.0 x 10 ⁹	-			
2	3,9 x 10 ⁶	0,30	4	134,7	4,4 x 10 ⁹	-			
3	5.8×10^{5}	0,31	13	145,8	5,4 x 10 ⁹	-			
4	3.8×10^{4}	0,28	25	140,5	3,1 x 10 ⁹	+			
5	3.6×10^{3}	0.16	42	54,4		+++			

Les symboles - et + correspondent respectivement à l'absence et à 25 % de contaminats.

Il apparaît ainsi que pour imposer *Schwanniomyces castellii* comme la flore prédominante dans nos conditions de culture, un taux minimum de 10⁵ cellules/ml est nécessaire. Un taux supérieur de 10⁷ cellules/ml apparaît souhaitable pour réduire la phase de latence. Ces résultats sont très proches des taux d'inoculation utilisés en FS, tant pour l'utilisation de levures que de spores de champignons filamenteux (KIRBY et MARDON, 1980; LATENGAN et coll, 1984; KARGI et coll, 1985; ROUSSOS, 1985).

Des taux d'inoculation optima ont été trouvés aux alentours de 10⁶ - 10⁷ spores/g de support pour A. niger (ORIOL, 1987). Pour les inocula supérieurs à 10⁸, des phénomènes d'inhibition de germination de spores ont été observés (BARRIOS-GONZALEZ et coll., 1989). Bien qu'il ait été suggéré des phénomènes d'interférence stérique en FS pour les champignons (LAUKEVICS, et coll. 1985), à notre connaissance il n'existe pas de travaux portant sur les phénomènes d'occupation des espaces par les levures en FS. La figure 5.4 présente les résultats détaillés de l'analyse de l'O2 et du CO2 au cours de la croissance de Schwanniomyces castellii cultivé dans les meilleures conditions en FS avec un taux d'inoculation de 5.7 x 10⁷ cellules/ml.

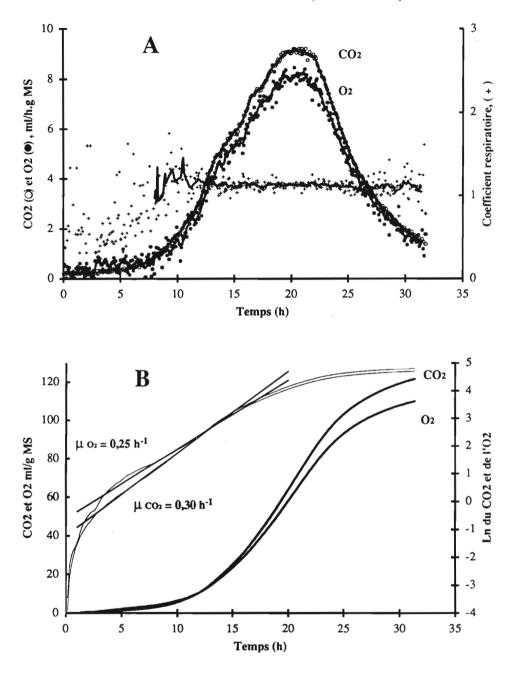


Fig. 5.4.- Evolution du CO2, de l'O2 et du QR au cours de la croissance de Schwanniomyces castelli en culture solide sur bagasse. A: Coefficient respiratoire, QR (Δ CO2/- Δ O2) et comparaison des vitesses de consommation d'O2 et du dégagement du CO2. B: Comparaison de la consommation totale d'O2 et du dégagement total du CO2; et comparaison du calcul de μ en utilisant l'O2 et le CO2. Inoculum: 5,7 x 10⁷ cellules/ml âgées de 24 h.

Nous notons que la consommation d'O2 est légèrement inférieure à la production du CO2 (fig. 5.4 a). Ainsi les valeurs de μ calculées à partir de l'O2 ou du CO2, sont respectivement 0,25 et 0,30 h-1, soit un temps de génération de 2,3 et 2,7 h. L'activité spécifique de croissance (μ) peut être calculée soit à partir de l'O2 ou du CO2, il apparaît ainsi que suivant le calcul utilisé (μ), les valeurs obtenues différent d'environ 20 %. La valeur moyenne du QR, entre 12 et 27 h du temps de fermentation, a été de 1,12±0,01, calculée à partir de 180 paires de données acquises (Fig. 5.4 a). Pendant la respiration la quantité d'O2 consommé et du CO2, produit sont équimolaires, donnant un QR égal à 1 (PIRT, 1975). La différence observée peut s'expliquer par le fait que l'urée est un des composants obligatoires pour la croissance, on peut admettre que sa transformation augmente légèrement la formation de CO2 par rapport à la consommation d'O2 (§ 5.3).

5.1.2 Effet de l'âge de l'inoculum

Dans le but de réduire la durée de la phase de démarrage de la fermentation, des inocula d'âges différents ont été essayés, le taux d'inoculation étant fixé à 1 x 10⁷ cellules/ml.

La figure 5.5 montre l'évolution du nombre de cellules/ml dans le milieu de préculture (§3.2.2). A partir de ce résultat, deux âges d'inoculum ont été choisies: 12 et 24 h. La première correspond à la fin de la phase exponentielle, tandis que dans la seconde les cellules proviennent de la phase stationnaire.

L'effet de l'âge de l'inoculum sur la formation du CO2 est illustré par la figure 5.6. On observe que la phase de latence est réduite lorsque on utilise un inoculum âgé de 12 h. Ce résultat était espéré car l'inoculation a été réalisée lors de la croissance exponentielle des levures. Cependant, son utilisation pose des problèmes pratiques: la standardisation de l'inoculum est difficile car dans ces conditions la durée de l'incubation de l'inoculum est très contraignante pour la mise en oeuvre des FS. D'autre part, la durée totale de la fermentation est pratiquement la même pour les deux âges. Un inoculum âgé de 24 h a donc été retenu pour la suite de l'étude, ce qui simplifie les problèmes pratiques sans pénaliser de facon importante le déroulement de la fermentation.

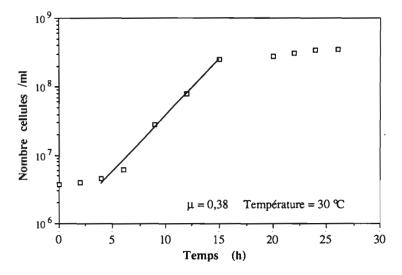


Fig. 5. 5.- Cinétique de croissance de *Schwanniomyces castellii* lors de la préparation de l'noculum.

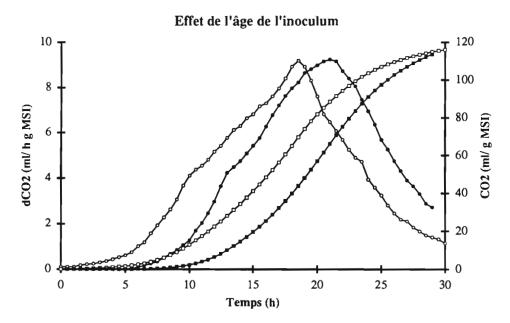


Fig. 5. 6. - Effet de l'âge de l'inoculum sur la vitesse et la formation du CO2 au cours de la culture de Schwanniomyces castellii par FS, à un taux d'inoculation de 1 x 10⁷ cellules par ml. Les symbols vides et pleins correspondent respectivement à 12 et 24 h. Les cercles correspondent aux vitesses de production du CO2 (ml/h g MSI) et les carrés à la production totale de gaz (ml/g MSI).

5.2 Contrôle du pH dans les cultures de Schw. castellii en FS

A l'opposé de la FSm, la régulation du pH est très difficile à mettre en oeuvre dans les procédés de FS. Les variations importantes du pH sont responsables, souvent d'arrêt précoce de la fermentation. De nombreux auteurs ont donc cherché un moyen simple pour réguler le pH en FS. Il a été proposé d'apporter l'azote sous forme d'un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée. En effet, lors de l'assimilation de l'urée, il n'y a pas de libération des ions H⁺ dans le milieu, comme c'est le cas avec le sulfate d'ammonium. En léger excès, son hydrolyse conduit à l'accumulation d'ions ammonium qui compense l'acidification provoquée par la production de métabolites acides (RAIMBAULT, 1980).

5.2.1 Influence du pH initial

Une étude préliminaire a été réalisée, en utilisant des milieux de cultures à teneur constante en azote, mais avec différentes proportions en sulfate d'ammonium et en urée (Tableau 5.2). Les résultats montrent que dans le cas où l'azote est apporté preferentiellement sous forme d'urée:

- Le pH final est plus élevé et ainsi compatible avec un pH non dénaturant (pH>4) pour les amylases de *Schwanniomyces* (WILSON et INGLEDEW 1982; SIMÕES-MENDES, 1984; SILLS et coll., 1984b; cf. Tableau 2.8 et § 2.23 et 2.2.7)
- Le pourcentage d'utilisation du substrat est plus important.

Suite à ces résultats, nous avons décidé d'utiliser l'urée comme principale source d'azote.

Tableau 5.2 Effet des mélanges de sulfate d'ammonium et d'urée sur le pH et l'utilisation du substrat

Source d	'azote *	pH final	Utilisation du	
% N urée % N Sulfate d'ammonium			substrat %	
100	0	4,5	93,3	
75	25	4,0	85,2	
50	50	3,8	63,5	
25	75	3,6	48,1	
0	100	3,1	23,8	

^{*:} Azote total: 4,6 g/l

Nous avons étudié par la suite l'effet du pH initial sur la fermentation. Son influence sur la production du CO2 ainsi que d'autres paramètres complémentaires sont regroupés respectivement dans la figure 5.7 et le tableau 5.3. L'avancement de la fermentation, estimé par la mesure du CO2, est directement lié aux valeurs du pH initial. Ainsi une variation de 7 à 5 entraîne une diminution du nombre de cellules finales, une diminution d'utilisation du substrat, une baisse du rendement de substrat en biomasse ainsi qu'un affaiblissement de l'activité α-amylasique (Tableau 5.3).

Tableau 5.3.- Effet du pH initial sur différents paramètres de la FS de Schwanniomices castellii

	pH initial	pH final	Nombre de cellules/ml	Utilisation du substrat, %	Y x/s	Activité α amylase U/g MF
1	7,0	4,6	2,8 x 10 9	92,9	0,56	19,3
2	6,5	4,0	$2,0 \times 10^{9}$	82,1	0,35	14,1
3	6,0	3,6	$9,1 \times 10^{8}$	59,3	0,26	14,3
4	5,5	4,1	$3,7 \times 10^{8}$	43,1	0,14	5,0
5	5,0	5,3	$< 1 \times 10^{6}$	29,5	0,03	< 0,1

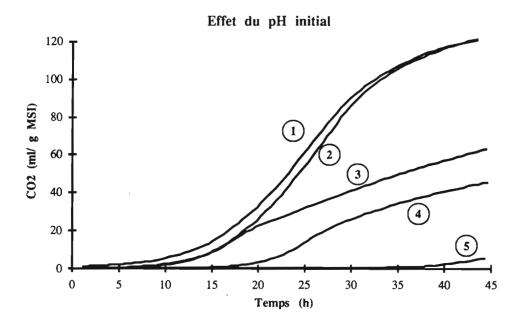


Fig. 5.7.- Influence du pH initial sur le dégagement total du CO2 au cours de la culture de Schwanniomyces castellii en FS. Les numéros sur la figure: 1, 2, 3, 4, 5, correspondent respectivement aux pH initiaux: 7; 6,5; 6; 5,5 et 5.

Nos résultats confirment la sensibilité des amylases de *Schwanniomyces* vis à vis des variations du pH. Un pH acide (<4) contraint la biosynthèse et l'activité des amylases (CLEMENTI et ROSSI, 1986; BOZE et coll., 1987a,b; CALLEJA et coll, 1984 et 1986b). Cette baisse du pouvoir d'hydrolyse de l'amidon est traduite par une diminution des performances de la fermentation.

Pour assurer le bon déroulement de la fermentation de *Schw. castellii* en FS il est nécessaire de fixer le pH initial proche de la neutralité (6, 5-7) et d'utiliser de l'urée comme source d'azote.

5.2.2 Effet de l'utilisation de différents tampons

Etant donnée l'importance de réguler le pH au cours de la FS avec *Schw. castellii* nous avons essayé d'additionner différents tampons au milieu de culture afin d'améliorer les performances du procédé. Le pH des tampons a été choisi à 5,5 ce qui correspond au pH optimum pour la croissance de *Schw. castellii* en FSm (BOZE et coll., 1989). L'effet des différents tampons sur la formation de CO₂, sur le pH final, sur le nombre final de cellules ainsi que sur les activités α amylase et amyloglucosidase sont réunis sur la figure 5.8 et dans le tableau 5.4.

La comparaison avec une fermentation réalisée à pH 5,5 sans addition de tampons (No. 4 de la Fig. 5.7) révèle l'effet positif des tampons (Fig. 5.8).

Pour des tampons à base d'acide citrique et d'acide succinique on observe une légère alcalinisation du milieu, elle est due probablement à l'utilisation de l'urée. Ce problème n'est pas observé dans le cas des tampons à base de phosphates et d'acide tartrique-phosphate (Tableau 5.4).

Tableau 5.4.- Effet de l'utilisation de différents tampons sur le pH final, la biomasse et les activités amylasiques à la fin de la fermentation

	Tamp	on	pH final	Nombre final de cellules/ ml	α amylase U/ g MF	amyloglucosidase UI/ g MF
1	Phosphates	0,067 M	5,6	1,29 x 10 9	27,1	5,8
2	Acide tartrique Phosphates	0,025 M 0,050 M	6,0	1,42 x 10 ⁹	6,0	2,2
3	Acide citrique	0,050 M	7,5	9,24 x 10 ⁸	32,9	4,0
4	Acide succinique	0,050 M	7,0	1,26 x 10 ⁹	33,5	3,8

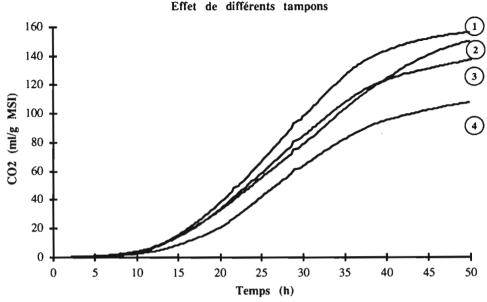


Fig. 5.8.- Effet de l'utilisation de différents tampons (pH 5,5) sur la formation du CO2 au cours de la FS de *Schwanniomyces castellii*. Les numéros sur la figure: 1, 2, 3, 4, correspondent respectivement aux tampons: phosphate 0,067 M; acide tartrique-phosphate 0,025 M-0,050 M; acide succinique 0,050 M et acide citrique 0,050 M. Le taux d'inoculation est de 1,6x10 7 cellules /ml.

Cependant, nous avons pu observer qu'un résultat similaire sur l'avancement de la fermentation peut être obtenu par la simple augmentation du pH initial sans addition de tampons (Fig. 5.2).

Ainsi, pour la suite de nos études, nous avons décidé de ne pas ajouter de tampons au milieu de culture. Cette étude nous a permis de mieux nous rendre compte de l'importance de la régulation du pH; ce qui confirme les résultats déjà connus en FSm (CLEMENTI et ROSSI, 1986; BOZE et coll. 1989; CALLEJA et coll. 1984 et 1986b, LUSENA et coll.,1985).

5.3 Définitions des facteurs essentiels pour la croissance de Schw. castellii

La démarche classique pour optimiser un milieu de culture consiste à faire varier successivement chaque facteur, en maintenant les autres constants, ce qui conduit inévitablement à un nombre élevé d'expériences. Par ailleurs, l'utilisation de plans d'expériences permet de déterminer l'influence simultanée des composants et des conditions de culture avec un nombre minimum d'essais. Nous avons retenu cette deuxième approche.

5.3.1 Etude nutritionnelle

Un plan d'expériences permettant d'étudier les effets de plusieurs facteurs sur la FS de Schwanniomyces a été réalisé. Une matrice factorielle fractionnée, 2^{k-p} (où k est le nombre de facteurs et 2^p est le nombre de blocs du plan factoriel complet), a été mise en oeuvre, afin de repérer les facteurs ayant un effet sur la fermentation. Toutefois par cette méthode les interactions entre les facteurs restent confondues (DE MEO et coll. 1985).

Tous les composants du milieu de culture de base (§ 3.2.3) ont été testés au cours de cette étude, à l'exception de l'amidon fixé à 100 g/l. Deux autres facteurs ont également été pris en considération: le pH et l'humidité initiales.

Ainsi sept facteurs ont été étudiés: l'humidité, le pH initial, le NaCl, le MgSO4·7H2O le KH2PO4, une source de cofacteurs et d'azote organique ainsi qu'une source d'azote minéral. La source de cofacteurs et d'azote organique se compose d'un mélange d'extrait de levure et de peptone de caséine en proportions égales (p/p). La source d'azote minérale a été apportée sous forme d'urée et de sulfate d'ammonium, à un rapport 80/20 (p/p) de l'azote total, variant plus au moins 10% afin d'affiner les résultats présentés dans le tableau 5.2.

Dans les Tableau 5.5 et 5.6 sont rassemblées les valeurs codées et réelles des différents facteurs utilisés. Dans le tableau 5.7 sont groupées les réponses mesurées pour les différentes expériences après 30 h de fermentation. L'effet de la composition des milieux de culture sur l'évolution du CO2 au cours des fermentations est présenté dans la figure 5.9.

L'effet des facteurs a été modélisé sous forme des polynôme (DE MEO et coll., 1985):

$$Y = bo + \sum bi Fi$$

où Y est la réponse mesurée, bo est un terme indépendant, bi représente les coefficients correspondants aux différents facteurs testés (Fi) et i est l'indice pour les différents facteurs.

où ∇Y est le gradient de Y et ||∇ Y|| est la taille du vecteur ∇ Y.

Le calcul est le suivant:

$$\frac{\nabla Y}{\|\nabla Y\|} = \frac{\sum \left(\frac{\partial Y_i}{\partial F_i}\right)^{\delta_i}}{\left[\sum \left(\frac{\partial Y_i}{\partial F_i}\right)^{\gamma}\right]^{1/2}}$$

Ainsi le calcul devient:

L'effet relatif des facteurs (ai) sur les activités amylasiques, la formation de biomasse, la production de CO2 ainsi que le pH final de la fermentation sont représentés dans la Fig. 5.10.

A l'inverse des résultats attendus, le pH ne présente pas un effet important sur la synthèse des amylases (Tableau 5.10 A), tandis que l'effet des autres facteurs reste au même niveau. La valeur de référence du pH dans cette expérience était de 6,5, valeur probablement proche de l'optimum (BOZE et coll., 1989). Résultat qui est en accord avec la stabilité des amylases à pH neutre (WILSON et INGLEDEW, 1982; SIMÕES-MENDES, 1984; SILLS et coll., 1984b).

D'autre part, on observe que l'humidité et la source organique d'azote ont un rôle secondaire sur la formation du CO2 (Fig. 5.10 C). Il en est de même pour le NaCl et le MgSO4 vis à vis du pH final (Fig. 5.10 D). Il est important de noter que l'humidité n'a pas présenté un rôle prédominant aux niveaux testés (70-75 %).

Le résultat le plus important pour notre étude est le rôle du pH initial sur: la formation de la biomasse, la production du dioxyde de carbone et le pH à la fin de la culture de *Schwanniomyces* castellii en phase solide.

Rappelons que le plan d'expérience utilisé n'a pas pour but d'optimiser le milieu de culture, mais d'étudier les effets relatifs entre les différents facteurs. Par la suite de notre étude la composition du milieu de base n'a pas varié (§ 3.2.3)

Tableau 5.5.- Matrice d'expériences avec les valeurs codées des différents facteurs

Expérience No.							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1

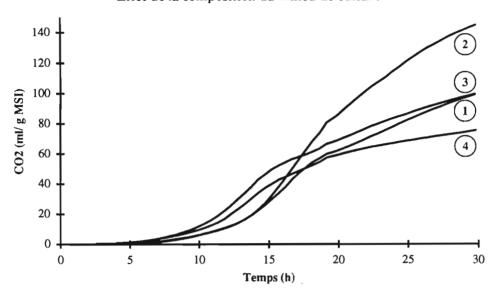
Tableau 5.6.- Relation entre les niveaux codés et les valeurs réelles des facteurs étudiés.

	Facteurs		Niveaux réels des facteurs		
			-1,0	1,0	
F1:	Source minérale d'azote				
	Urée	g/l	10,0	12,9	
	Sulfate d'ammoniun	g/l	3,1	9,4	
F2:	Source organique d'azote				
	Extrait de levure	g/l	1	2	
	Peptone de caséine	g/l	1	2	
F3:	KH2PO4	g/l	6	10	
F4:	MgSO4·7H2O	g/l	3	5	
F5:	NaCl	g/l	2	4	
F6:	pH initial	_	6	7	
F7:	Humidité	% (p/p)	70	75	

Tableau 5.7.- Résultats expérimentaux des réponses déterminées dans le plan d'expérience.

Milieu	pН		Biomasse	Activi	tés amylasiques	CO ₂ formé
	final	% MSI	Nombre de	α-amylase	Amyloglucosidase	
			cellules/ gMSI	U/g MF	UI/gMF	ml/g MSI
1	4,1	10,9	1,1E+10	9,0	0,8	99,1
2	3,5	13,3	1,2E+10	0,0	0,0	145,0
3	3,2	7,0	6,8E+9	0,0	0,0	99,6
4	3,1	5,6	6,1E+9	0,0	0,0	75,6
5	3,2	5,1	4,4E+9	5,1	0,0	84,7
6	3,1	4,4	5,1E+9	5,0	0,0	47,5
7	3,6	10,0	1,1E+10	5,2	1,2	116,5
8	4,8	15,6	1,3E+10	39,9	10,2	163,6

Effet de la composition du milieu de culture



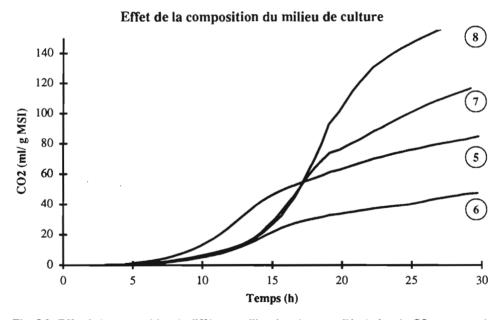


Fig. 5.9- Effet de la composition de différents milieu de culture sur l'évolution du CO2 au cours de la croissance *Schwanniomyces castellii* sur bagasse imprégnée. Les numéros sur la figure (1-8) correspondent aux compositions des milieux de cultures données dans les Tableaux 5.5-7.

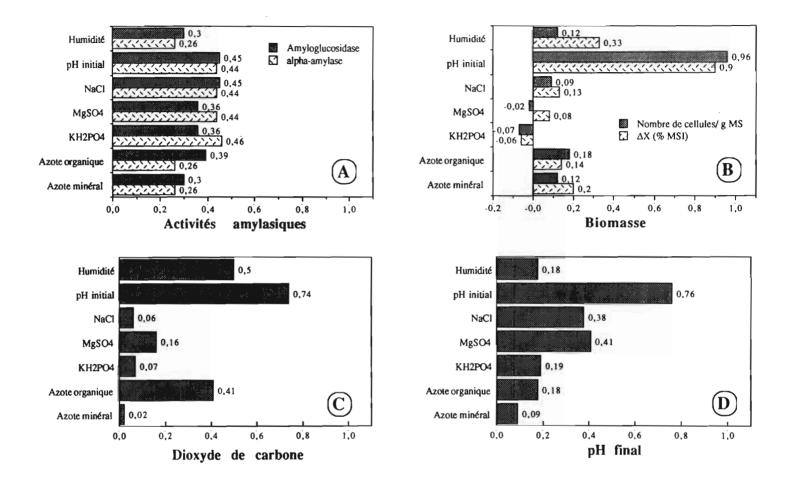


Fig. 5.10 .- Représentation graphique de l'effet de différents facteurs sur:

A: Activités amylasiques

B: Formation de biomasse

C: Formation de CO2

D: pH final

5.3.2 Effet de l'addition de vitamines et d'oligo-éléments

Nous avons étudié l'effet de certaines vitamines et d'oligo-éléments sur la fermentation. Pour cela, nous avons utilisé comme témoin un milieu exempt de ces constituants (§ 3.2.3). Les résultats vis à vis du CO2, au cours de la fermentation, sont regroupés dans la figure 5.11. Si l'on ajoute ces composés, on observe une diminution de la durée de la fermentation et une augmentation de la vitesse de production du CO2, par rapport au témoin.

Toutefois, la production globale de gaz reste la même. Il est connu que les vitamines et les oligo-éléments interviennent dans plusieurs réactions biochimiques, favorisant le déroulement des procédés biologiques (PIRT, 1975).

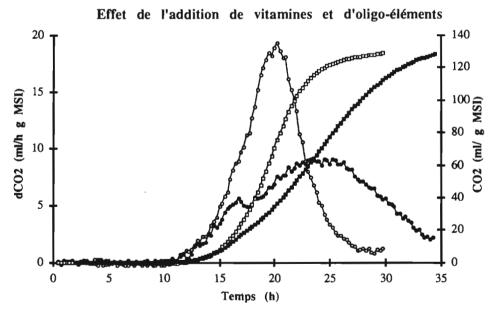


Fig 5. 11. - Effet de l'addition de vitamines et d'oligo-éléments sur la vitesse de production et sur la production totale de CO2 au cours de la croissance de Schwanniomyces castellii en FS. Les symboles vides et pleins correspondent respectivement aux essais avec et sans vitamines et oligo-éléments. Les cercles correspondent aux vitesses de production du gaz et les carrés aux productions totales du CO2. Conditions de culture: Humidité voisine de 75%; pH initial 7; Amidon 100 g/l.

5.4 Cinétiques de Schwanniomyces castellii en FS

Une étude cinétique a été réalisée afin de mieux comprendre l'évolution de différents paramètres au cours de la fermentation. Les résultats sont rassemblés dans la figure 5.12.

Il est important de remarquer que l'évolution de la consommation d'O2 et de la production de CO2 permettent de suivre *in situ* et en continu l'augmentation de la population cellulaire au cours de la fermentation (Fig. 5.12 A et C). Le décalage apparent entre les deux figures sera commenté par la suite (§ 5.5)

Lors de la croissance de *Schwanniomyces*, l'utilisation du substrat entraîne une forte chute du pH (5.12 C et B), on remarque que le pH est stable à partir de 12 h de fermentation, probablement grâce à la consommation de l'urée.

La production d'amylases est maximale pendant la phase stationnaire (Fig. 5.12 D). Résultat qui est en accord avec ce qui a été trouvé en FSm (CALLEJA et coll., 1984 et 1986b). D'autre part, en prenant en compte la biomasse formée (g/l), les quantités d'enzymes formées peuvent être exprimées par rapport à la biomasse, soit respectivement 1320 U/g X et 44 U/g X pour l'α-amylase et l'amyloglucosidase respectivement. Les meilleurs résultats trouvés avec la même souche en culture continue, sont respectivement 1800 U/g X et 68 U/g X pour l'α-amylase et l'amyloglucosidase (BOZE et coll., 1989). En comparaison avec la FSm nos résultats sont très prometteurs car ces teneurs en enzymes ont été obtenues en batch et sans régulation automatique du pH.

C'est grâce à la maîtrise des conditions de culture et à la standardisation du milieu de culture que nous avons pu adapter d'une manière très satisfaisante la culture de *Schwanniomyces* en milieu solide.

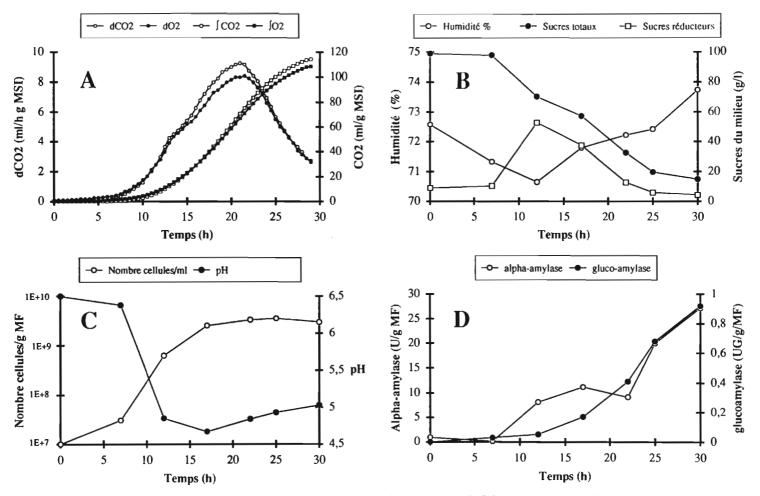


Fig. 5.12.- Evolution des différentes paramètres de fermentation au cours de la croissance de *Schwanniomyces castelli* en culture solide sur bagasse imprégnée. Conditions de culture: Taux d'inoculation 1 x 10 ⁷ cellules/ml; pH initial 6,5, et humidité 72 %. A: Evolution des gaz; B: Variation de l'humidité et des carbohydrates; C: Variation du nombre de cellules et du pH; D: Biosynthèse des amylases.

5.5 Validation expérimentale du calcul de u par l'analyse du CO2

Le calcul de μ par mesure des gaz de fermentation (O2 et CO2) est couramment utilisé en FS (GRANT et coll., 1978; RAIMBAULT, 1980; SATO et coll., 1983; ORIOL et coll., 1987; SATO et YOSHIZAWA, 1988; GONZALEZ -BLANCO et coll., 1990). Nous avons voulu toutefois valider ce résultat pour la culture spécifique de *Schwanniomyces*.

Plusieurs auteurs ont établi expérimentalement le rapport entre la consommation d'O2, ou la production de CO2 et la formation de biomasse (SATO et coll., 1983; SATO et YOSHIZAWA, 1988). Les résultats obtenus ont permis de calculer des rendements du type YX/O2 ou YX/CO2. A partir de ces rendements et à l'aide de l'analyse des gaz, il est possible d'estimer la biomasse et de calculer μ. Toutefois avec cette technique, il est nécessaire de savoir dans quelles conditions ces rendements sont constants et s'ils sont stables tout au long de la fermentation.

Dans le sous chapitre précédent nous avons démontré que l'évolution des gaz suit le profil d'évolution de la biomasse. Cependant, d'après nos résultats (Fig. 5.12 A et C), il parait difficile de déterminer le rapport exact entre l'évolution des gaz et la formation de biomasse.

Nous avons simplement comparé les valeurs de μ calculées par le Ln du nombre de cellules (X) et le Ln de la production de CO2, pendant la phase exponentielle de croissance. Dans la Fig. 5.13 et le tableau 5.8 sont rassemblés les résultats correspondant à des inocula de 12 et 24 h (§ 5.1.2). Ces résultats démontrent que les valeurs de μ diffèrent suivant l'âge de l'inoculum: les valeurs sont plus importantes pour un inoculum plus jeune. Cependant, l'estimation de μ par Ln X est inexacte à cause du faible nombre de points, tandis que la mesure du Ln CO2 ne pose pas de problème. Dans ces deux cas les valeurs de μ estimées sont similaires et valident l'utilisation de cette méthode pour la culture en FS de Schwanniomyces.

Tableau 5.8.- Comparaison des μ calculés par le Ln du nombre de cellules et par le Ln du CO2 pour des inocula de 12 et 24 h (§ 5.1.2).

Age de l'inoculum , h	μ h ⁻¹		Nombre des utilisées dan	données s la régression	Coefficient de corrélation	
	Ln X	Ln CO2	Ln X	Ln CO2	Ln X	Ln CO2
12	0,40 <u>+</u> 0,2	0,43 <u>+</u> 0,02	4	22	0,970	0,993
24	0,30 <u>+</u> 0,2	0,30 <u>+</u> 0,004	3	97	0,998	0,996

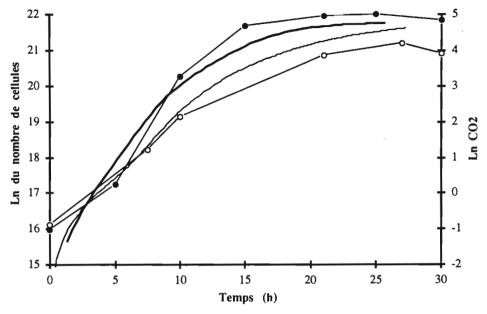


Fig. 5.13 Comparaison de μ calculé par la biomasse et par le CO2. Les symboles correspondent au Ln de X pour les âges d'inoculum de 12 (●) et 24 h (○), respectivement. Les lignes représentent le Ln du CO2 pour les âges d'inoculum de 12 (—) et 24 h (—) respectivement.

5.6 Conclusion

La maîtrise des conditions de culture et de la composition du milieu de culture nous a permis de:

- Trouver le taux d'inoculation nécessaire pour implanter Schwanniomyces comme flore prédominante dans la FS.
- Démontrer la grande importance de la régulation du pH au cours de la FS de Schwanniomyces.
- Valider une méthode d'estimation du taux de croissance par la mesure de CO2.

Toutefois c'est l'analyse des gaz qui s'est révélée comme l'outil le plus utile pendant le processus d'adaptation de la culture de *Schw. castellii* à la FS.

Les résultats obtenus dans ce chapitre nous ont permis d'entreprendre des études visant de contrôler les métabolisme de *Schw. castellii* en FS par l'environnement gazeux, résultats qui seront présentés dans le chapitre suivant.

REGULATION DES METABOLISMES RESPIRATOIRE ET FERMENTAIRE DE Schwanniomyces castellii PAR L' ENVIRONNEMENT GAZEUX

6. REGULATION DES METABOLISMES RESPIRATOIRE ET FER-MENTAIRE DE Schw. castellii PAR L'ENVIRONNEMENT GAZEUX

L'objectif de ce chapitre est de montrer l'effet de l'environnement gazeux sur les cultures de Schw. castellii en FS, aussi bien en conditions d'aérobiose que d'anaérobiose.

Les cultures ont eu lieu dans le fermenteur prototype (§ 4.3). Nous avons mis en oeuvre les différents modes opératoires annoncés dans le chapitre 4 (§ 4.3.3). Trois points ont été particulièrement étudiés:

- Effet du taux d'aération sur la croissance.
- Régulation de la fermentation en conditions non limitantes en O2.
- Changement du métabolisme aérobie en anaérobie.

La concentration en urée dans le milieu a été fixée à 4 g/l pour tous les essais. Les concentrations des autres constituants du milieu n'ont pas variés. Pour les fermentations en aérobiose, le pH initial était égal à 6.5 (§6.1 et 6.2), pour la fermentation en conditions mixtes d'aération (§ 6.3) le pH initial a été de 6. Des vitamines et des oligo-éléments ont été ajoutés au milieu de culture.

6.1 Effet du taux d'aération sur la croissance

L'aération du milieu solide humide est un des facteurs critiques qui détermine la productivité du processus. En plus de fournir l'O2, nécessaire à la croissance, elle élimine la chaleur métabolique, les produits gazeux volatils de la masse fermentée, et représente le volume mort du fermenteur (LONSANE et coll.,1991).

L'effet des gaz (CO2 et O2) sur les FS de Schw. castellii a été mis en évidence en utilisant le fermenteur à modules (Fig. 4.7). Nous avons travaillé à sa capacité maximale soit 370 g du milieu humide en absence de contrôle du CO2 dans l'air évacué (§ 4.3.1). Le taux d'aération a été maintenu constant à 100 et à 200 ml d'air par minute. Les niveaux d'O2 et du CO2 à différentes hauteurs ont été mesurés en envoyant dans le chromatographe les gaz prélevés dans chacun des modules.

La croissance de *Schw. castellii* dans des conditions d'aérobie, et avec deux vitesses d'aération, a montré de fortes différences dans les niveaux d'O2 et de CO2 aux différentes hauteurs du fermenteur, au cours de la fermentation (Figs. 6.1 à 6.4). La magnitude de ces gradients étaient beaucoup plus faible avec un taux d'aération de 200 ml / min. que ceux obtenus avec 100 ml / min. Les résultats concernant les différents paramètres de la fermentation (Tableau 6.1) indiquent eux aussi des variations moindres dans le premier cas que dans le second. La concentration de CO2 à 90 cm de hauteur, dans le cas d'une aération de 100 ml / min, était assez élevée (21%) pour créer des conditions d'anaérobiose. La présence d'éthanol (10,24 mg d'éthanol/g MSI) dans la partie plus haute du fermenteur nous a confirmé le changement de métabolisme au cours de la fermentation. L'éthanol n'a été détecté à aucune autre hauteur dans les deux cas d'aération. Ceci explique aussi un rendement en biomasse plus faible à 90 cm de hauteur, dans le fermenteur alimenté avec 100 ml d'air/min (Tableau 6.1).

Globalement les résultats indiquent que les gradients des gaz sont plus faibles lorsque le taux d'aération est plus élevé. Il serait donc possible de contrôler les gradients en O2 et en CO2 dans les solides fermentés et grâce à leur contrôle d'obtenir des rendements en biomasse similaires à toutes les hauteurs du fermenteur. Cependant, il est difficile d'utiliser un grand nombre de capteurs pour la mesure d'O2 et de CO2 gazeux aux différentes hauteurs. La mesure de l'O2 et du CO2 dans l'air évacué est une autre alternative qui peut permettre de contrôler les gradients à différentes hauteurs dans le fermenteur. Parmi différentes méthodes, le choix de maintenir le CO2 dans l'air évacué serait le plus approprié, vue la sensibilité du matériel de mesure(§ 4.2.2). En effet, la quantité minimum d'O2 et de CO2 qui peut être mesurée avec des analyseur de gaz est de 0,1 et de 0,03 %, respectivement.

Tableau 6.1. Effet du taux d'aération sur la culture de Schw. castellii en milieu solide.

Hauteur du	pH final		Humidi	té finale (%)	Rendement en biomasse, Yx/s;	
fermenteur, cm	Α	В	Α	В	A	В
15	4.1	4.0	83.7	81.6	0.40	0.45
30	4.1	4.0	81.6	81.2	0.38	0.36
45	4.2	4.0	80.9	81.3	0.36	0.35
60	4.3	4.1	80.3	80.2	0.29	0.36
75	4.4	4.1	80.3	79.4	0.27	0.31
90	4.3	4.2	79.3	78.8	0.14	0.32

A et B correspondent aux taux d'aération de 100 et 200 ml/min, respectivement.

Pour A, la concentration maximale de CO2 atteinte a été de 22%, tandis que pour B était de 10 %.

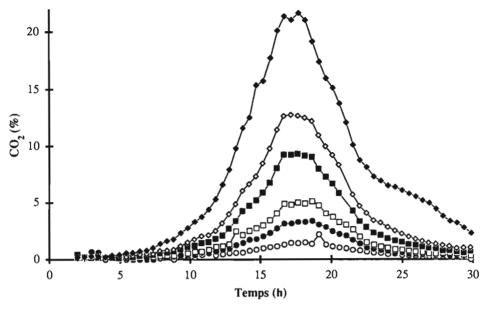


Fig. 6.1.- Gradients de CO2 au cours de la croissance de Schwanniomyces castellii à différentes hauteurs du fermenteur alimenté avec une aération de 100 ml/min. ○: 15 cm, •: 30 cm, □: 45 cm, ■: 60 cm, ♦: 75 cm, •: 90 cm.

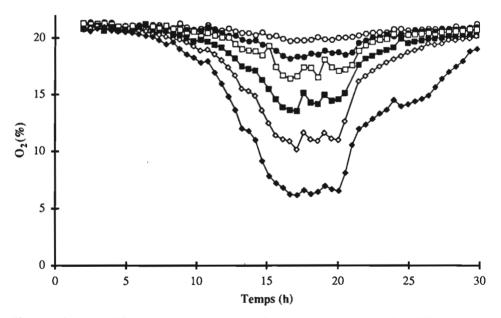


Fig. 6.2.- Gradients d'O2 au cours de la croissance de Schwanniomyces castellii à différentes hauteurs du fermenteur, avec une aération de 100 ml/min. ○: 15 cm, •: 30 cm, □: 45 cm, ■: 60 cm, ♦: 75 cm, •: 90 cm.

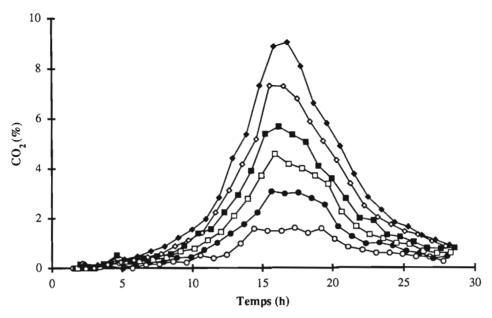


Fig. 6.3.- Variation de la teneur en CO2 au cours de la croissance de *Schwanniomyces castellii* à différentes hauteurs du fermenteur, avec une aération de 200 ml/min. ○: 15 cm, •: 30 cm, □: 45 cm, •: 60 cm, ♦: 75 cm, •: 90 cm.

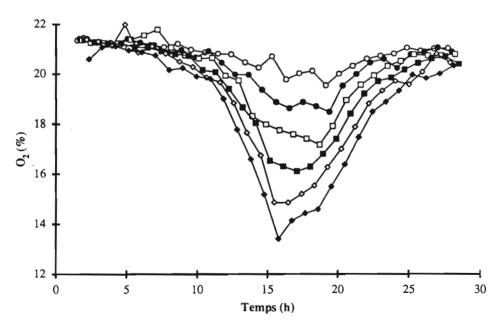


Fig. 6.4.- Variation de la teneur en O2 au cours de la croissance de *Schwanniomyces castellii* à différentes hauteurs du fermenteur, avec une aération de 200 ml/min. ○: 15 cm, •: 30 cm, □: 45 cm, •: 90 cm.

6.2 Pilotage du fermenteur en conditions non limitantes en O2

Une production accrue d'aflatoxine ou de \(\beta\)-glucosidase, et de métabolites est liée à l'aération du milieu (CHAHAL, 1983; SILMAN, 1980; SILMAN et coll., 1979). Une diminution dans la production de biomasse et dans la biosynthèse de métabolites peut être due à un niveau élevé de CO2 dans l'air (BAJRACHARYA et MUDGETT, 1980; ULMER et coll., 1981). RATHBUN and SHULER, (1983) ont observé aussi des gradients importants d'O2 et de CO2 dans le milieu. C'est pour ces raisons que le renouvellement complet de l'atmosphère gazeuse dans le fermenteur est nécessaire à intervalles réguliers de temps. Le renouvellement est décidé après analyse de l'espace gazeux par chromatographie en phase gazeuse mais également dans beaucoup de cas à l'aide d'autres dispositifs d'analyse des gaz (UNDERKOFLER et coll., 1947; NISHIO et coll., 1979; RAMSTACK et coll., 1979). Récemment, le taux d'aération a été intégré à un système de régulation de la température, par refroidissement évaporatif, et au contenu en humidité des solides (BARSTOW et coll., 1988; RYOO et coll., 1991; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1991b).

Cependant aucun système de contrôle simple et fiable, pour maintenir constants les teneurs en O2 et en CO2 dans la masse fermentée ou dans les gaz évacués du fermenteur, n'est pas encore au point. Ce n'est qu'à l'échelle du laboratoire, qu'il existe un système d'aération en circuit fermé, basé sur l'utilisation d' analyseurs/contrôleurs de gaz, comme par exemple, un contrôleur de CO2 dans les gaz de sortie qui permet de maintenir les niveaux de CO2 ou d'O2 constant avant la remise en circulation (BAJRACHARYA et MUDGETT, 1980). Ce type de fermenteur est réservé au domaine de la recherche et n'est pas utilisable à plus grande échelle. Ce sous-chapitre montre l'usage prometteur d'ordinateurs pour le contrôle du CO2 dans l'air évacué à fin d'assurer un rendement constant en biomasse aux différentes hauteurs d'un fermenteur type colonne, de grande taille.

Le système de contrôle est basé sur l'utilisation d'un programme mis en place sur Apple IIe (§ 4.2.2). Le système permet de maintenir la concentration en CO2 dans l'air évacué autour de 2 % par la variation du débit d'air fourni (0.2 bar) au fermenteur. Afin de contrôler le CO2, quatre électrovannes calibrées à 100, 200, 400 et 800 ml d'air/min, permettent de délivrer l'air par paliers de 100/min. La valeur maximale d'air fourni est de 1500 ml/min lorsque toutes les soupapes sont ouvertes. Le programme permet la sélection d'intervalles de temps entre deux analyses de CO2, l'intervalle minimum étant de 1 minute. La fréquence des signaux envoyés aux électrovannes est cal-

culée sur celle des estimations de CO2 dans l'air évacué. Ceci rend le système plus efficace, même pendant la phase où la croissance cellulaire est exponentielle. Dans les études présentées, l'intervalle entre deux analyses de CO2 dans l'air évacué était d'une minute entre 8.8-12.8 et 21.8-26.1 h de fermentation. Cet intervalle était de 2 min entre 12.8-21.8 h alors qu'il était de 5 min pendant le reste du temps de fermentation (Fig. 6.5).

Le fermenteur prototype équipé d'un contrôle du CO2, avec un point de consigne de 2 %, permet de réguler la concentration en CO2 à 1,80±0,2 % au cours de la croissance (Fig. 6.5). La régulation est réalisée grâce au changement automatique du taux d'aération entre 100-1500 ml d'air/min (Fig. 6.6). En outre, il permet de maintenir la concentration en O2 dans l'air évacué à 19.3±0.2 % (Fig. 6.5). Un contrôle aussi efficace a été possible grâce aux 700 mesures et corrections du CO2 effectuées dans l'air évacué entre 8-25 h, phase la plus active de la croissance. Le niveau du CO2 dans l'air évacué durant le reste de la fermentation a été légèrement en-dessous de la valeur fixée. Le système de contrôle était plus efficace quand les valeurs du CO2 dans la masse fermentée étaient supérieures à la valeur fixée. Les paramètres du procédé, les productivités et les rendements en biomasse étaient presque similaires à toutes les hauteurs du fermenteur (Table 6.2), contrairement aux valeurs obtenues en absence de contrôle du CO2 dans l'air évacué (Table 6.1). Les résultats confirment l'efficacité de l'asservissement du système de contrôle informatisé, ainsi que son fort potentiel d'utilisation, pour assurer l'uniformité de la productivité de biomasse (Yx/s = 0.40±0.02) à toutes les hauteurs du fermenteur.

La méthode proposée est simple, efficace et fiable. Aucun rapport sur le contrôle du CO2, ou bien de l'O2, dans l'air évacué n'a été publié et le présent travail peut donc être considéré comme le premier. Les courbes de cinétiques du CO2 et de l'O2 (ml / g MSI) dans le fermenteur sans contrôle du CO2 (taux d'aération de 100 ml / min) et celle du débit d'air (1 / g MSI) dans le fermenteur contrôlé montrent d'intéressants résultats (Fig. 6.7). Ces courbes ont le même profil, ce qui souligne la relation qui existe entre l'aération d'une part et la formation de CO2 et la consommation d'O2 d'autre part. Le système de régulation permet de satisfaire exactement les exigences en O2 de la culture.

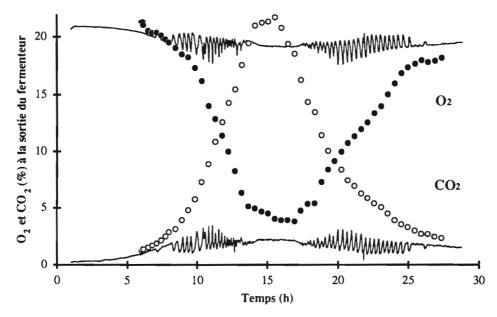


Fig. 6.5- Comparaison des teneurs en O2 et en CO2 à la sortie du fermenteur avec une alimentation régulée d'aire (lignes) et une aération constante à 100 ml/min (symboles).

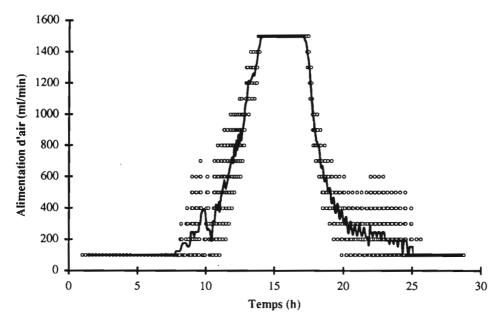


Fig. 6.6.- Variation de l'alimentation d'air pendant la régulation du fermenteur en conditions non limitantes en O2. Les symboles correspondent aux mesures réelles, la ligne à la moyenne.

Table 6.2.- Influence de la régulation automatique du taux d'aération sur la performance de la culture de *Schw. castellii* en FS *.

Hauteur du	pH final	Humidité finale (%)	Rendement en	Utilisation du
fermenteur, cm			biomasse, Yx/s, g/g	substrat, (%)
15	4.5	78.9	0.42	98.4
30	4.6	81.6	0.41	98.8
45	4.5	80.6	0.37	98.8
60	4.5	81.2	0.41	98.6
75	4.6	80.1	0.38	98.6
90	4.8_	82.3	0.39	98.9

^{*:} Point de consigne de la régulation du $CO_2 = 2$ %.

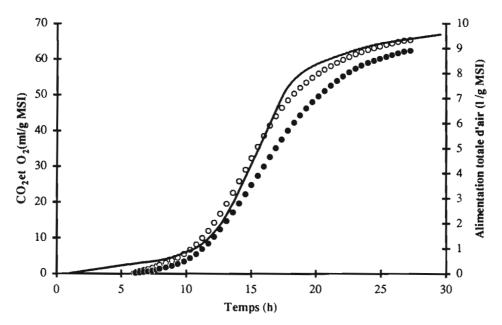


Fig. 6.7.-Comparaison de la consommation de l'O₂ (●) et de la production du CO₂ (○) du fermenteur alimenté à 100ml/min d'air, avec l'alimentation d'air du fermenteur piloté (ligne).

Le contrôle du CO2 dans l'air évacué présente également un autre avantage vis à vis de la régulation de la température aux différentes hauteurs de la colonne (Fig. 6.8, 6.9). Pendant la phase de croissance la plus active le gradient maximum de température était de 2 °C par rapport à la température d'incubation. En outre, l'humidification de l'air avant l'entrée dans le fermenteur, réalisée dans les conditions du système ici développé, permet de conserver la teneur en humidité des solides quasi constante (Tableau 6.1 et 6.2).

Le développement du système automatique informatisé pour le contrôle du CO2 dans l'air évacué du fermenteur colonne, constitue un progrès remarquable dans la régulation du rendement de biomasse à toutes les hauteurs du fermenteur. Il peut être facilement extrapolable pour des fermenteurs à capacités plus importantes grâce à un nombre d'électrovannes plus élevé et par des adaptations dans le programme informatique. Son utilisation pour une fermentation à grande échelle est avantageuse car il aide simultanément au contrôle de la température, des teneurs en humidité, de la biomasse et des teneurs en O2 et en CO2. Il répond ainsi à la demande en O2 de la culture en réalisant une économie d'énergie et de fluides puisqu'il n'augmente le débit d'air seulement lorsque cela est nécessaire. L'air fourni pendant le reste de la fermentation est juste suffisant pour maintenir les activités de la culture. Couplé à un autre système de contrôle d'humidité et de température développé par d'autres chercheurs (BARSTOW et coll., 1988; RYOO et coll., 1991; LONSANE et coll., 1991), il serait d'une grande utilité pour éliminer les gradients de concentration dans les fermentations solides. Par conséquent, cela pourrait contribuer à l' exploitation commerciale de la FS.

Le potentiel de la production d'éthanol par Schw. castellii en FS a été souligné récemment comme une alternative prometteuse (INGLEDEW, 1987). La culture de levures sur support offre des possibilités pour développer la biomasse en aérobie puis produire de l'éthanol en anaérobie dans le même réacteur en arrêtant simplement l'aération du milieu. Cette opération représente des avantages économiques puisqu'il évite le transfert de solides d'un fermenteur à un autre, tout en diminuant la durée du procédé. On évite aussi les étapes nécessaires de préparation et de mélange de l'inoculum (biomasse produite en aérobie) avec le substrat pour la fermentation anaérobie, ce qui peut entraîner des contaminations.

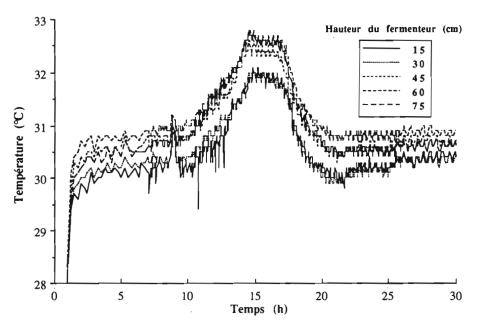


Fig. 6.8.- Gradients de température à différentes hauteurs du fermenteur, au cours de la FS de Schwanniomyces castellii, avec régulation automatique de l'alimentation d'air

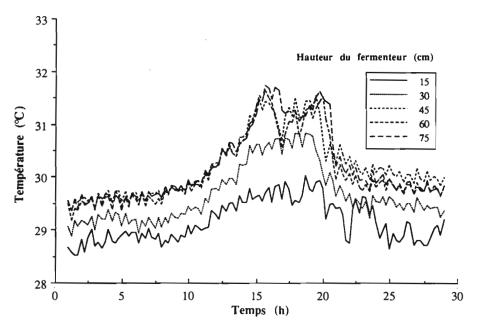


Fig. 6.9.- Gradients de température à différentes hauteurs du fermenteur, au cours de la FS de *Schwanniomyces castellii*, avec une alimentation constante de l'air à 100 ml/min.

Il est également important d'avoir une concentration cellulaire uniforme dans le milieu à la fin de la phase aérobie, puisque toute hétérogénéité conduira à des gradients dans la production d'éthanol pendant la phase anaérobie. Le présent travail rend cette entreprise réalisable et fournit également une stratégie de contrôle informatisé aussi simple qu'efficace pour la régulation du CO2 dans l'air évacué. Ce dernier point peut s'appliquer de façon générale à tout procédé aérobie de FS.

6.3 Passage du métabolisme aérobie au métabolisme anaérobie

La souche de Schw. castellii présente un effet Crabtree négatif et un fort effet Pasteur (De DEKEN, 1966; LEHNINGER, 1975). Une de ses conséquences est que la fermentation alcoolique de Schw. doit être réalisée en absence d'oxygène (INGLEDEW, 1987). Par la suite, la production de CO2 est équimolaire à l'éthanol produit (STEWART et coll. 1984b).

Par ailleurs, la présence de l'O2 est nécessaire pour le développement initial de la biomasse de *Schwanniomyces*, la synthèse d'amylases permettant l'hydrolyse de l'amidon. En suite la production d'alcool est réalisée en anaérobiose. Il est par conséquent nécessaire d'établir un compromis entre les conditions d'aérobiose et d'anaérobiose.

En FSm des conditions d'aération mixtes ont déjà été utilisées (NICOL, 1987; ZAIRE 1986); pour notre étude nous avons suivi une stratégie similaire.

La production d'éthanol en FS peut se faire à l'aide d'un fermenteur à recirculation des gaz. Ce procédé d'origine chinoise (Brasserie Kaoliang) à été évoqué par HESSELTINE (1987) ainsi que par LAI et coll. (1989). Ce type de fermenteur a été utilisé par plusieurs auteurs (FUJIO et coll. 1985; SATO et coll. 1985 et 1988) pour la production d'alcool en FS.

Les résultats obtenus précédemment (§ 6.1) nous montrent qu'il est possible d'atteindre des niveaux très hauts en CO2 et très faibles en O2, ce qui est nécessaire pour induire une fermentation alcoolique en culture en milieu solide de Schw. castellii.

Pour la suite de nos études, nous avons utilisé le dispositif expérimental décrit dans la figure 4.8. Pour réussir à obtenir deux conditions d'oxygénation différentes (aérobiose et anaérobiose),

l'alimentation totale en oxygène était limitée. Pour mieux contrôler le déroulement de la fermentation, nous avons fixé le volume total d'air présent dans le circuit en début de fermentation à environ 2.5 l, soit une l'alimentation en O2 de 7-8 ml/g de matière sèche initiale. Par ailleurs, la phase gazeuse de la fermentation ou l'air épuisé circule en circuit fermé et en continu entre le fermenteur et la CPG à raison de 100 ml / min.

Les résultats de l'analyse des gaz sont représentés sur les figures 6.10 et 6.11. Les deux phases de fermentation, aérobie et anaérobie, peuvent être clairement distinguées (Fig. 6.10). Il existe probablement une étape de transition entre elles (10-12 h). L'O2 est épuisé au bout de 12 h après l'inoculation des cellules, puis la phase de production d'alcool commence. Pendant la phase anaérobie (13 à 30 h) la teneur en O2 reste très basse à environ 0,9±0,2 %, tandis que le coefficient respiratoire (QR) atteint une valeur maximum de 3 au bout de 25 h de fermentation (Fig. 6.10). Les résultats des analyses des gaz peuvent être exprimés par rapport à la matière sèche initiale permettant ainsi de calculer un taux de croissance à partir du CO2 pendant les phases aérobie et anaérobie. La valeur du taux de croissance au cours de la phase aérobie est 8 fois plus importante que dans la phase anaérobie.

Dans le tableau 6.3 sont rassemblés les paramètres permettant de décrire la performance de la fermentation. Les valeurs des différents paramètres restent assez constantes aux différentes hauteurs du fermenteur, avec une variation de moins de 10 % par rapport à la moyenne. Les variations de température aux différentes hauteurs du fermenteur et au cours de la fermentation, ne révèlent pas de problème particulier (Fig. 6.11)

Dans ce chapitre nous nous contenterons tout simplement de mettre en évidence les différentes phases de la fermentation: (a) une phase de croissance aérobie pour la multiplication cellulaire et la production des enzymes et (b) une phase anaérobie permettant la conversion directe de l'amidon en alcool.

Jusqu'à présent aucun travail de recherche concernant l'utilisation de levures amylolytiques à capacité fermentaire pour la production d'alcool en FS n'avait été publié. Ces résultats expérimentaux nous ont permis d'entreprendre des travaux visant à étudier la production d'alcool en FS par Schwanniomyces castellii. Les résultats seront présentés dans les deux chapitres suivants.

Tableau 6.3.- Performance de la fermentation alcoolique de Schwanniomyces castellii en FS

Hauteur du	Perte de	Utilisation du	Y x/s	Ethanol	
fermenteur	poids	substrat		Teneur	Rendement apparent par
cm	%	%		mg/ g MSI	rapport au théorique, %
15	23,7	95,2	0,05	96,6	62,7
30	26,1	97,0	0,06	117,9	63,7
45	27,4	96,7	0,05	115,8	64,4
60	26,6	96,3	0,05	113,9	61,0
75	28,9	97,3	0,05	98,8	57,3
90	25,3	97,0	0,06	94,1	59,9
Moyenne	26,2	96,6	0,05	106,2	61,5
Erreur, %	7,1	0,8	9,7	9,9	4,3

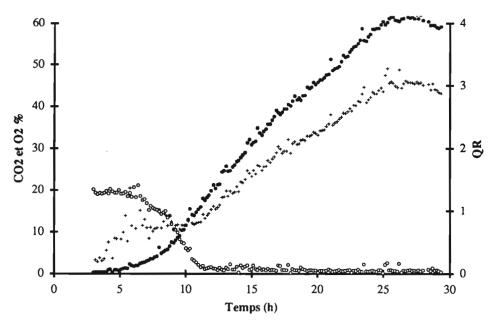


Fig. 6.10.- Evolution des teneurs en CO2 et en O2 lors de la culture de Schwanniomyces castellii en conditions mixtes d'aération: d'abord aérobie puis anaérobie. Milieu du culture: Amidon 100 g/l; urée 4 g/l; pH initial 6 et avec addition de vitamines et d'oligo-éléments. CO2 (●); O2: (○): Coefficient respiratoire, QR: (+).

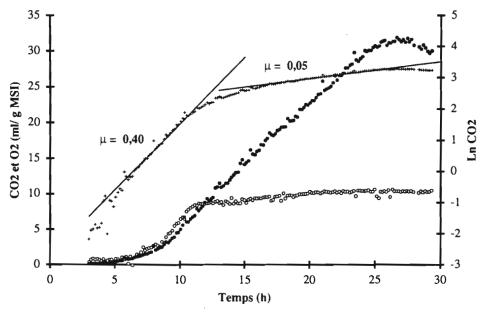


Fig. 6.11.- Production totale de CO2 et consommation totale d'O2 lors de la culture de Schwanniomyces castellii en conditions mixtes d'aération:d'abord aérobie puis anaérobie. CO2 (●); O2: (○): Ln de CO2: (+).

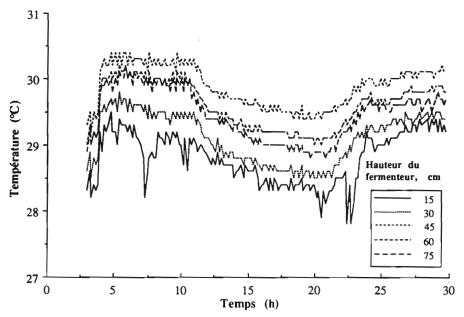


Fig. 6.12.- Evolution de la température lors de la croissance de Schwanniomyces castellii en culture solide sur bagasse impregnée en conditions mixtes d'aération: aérobie puis anaérobie.

6.4 Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons montré l'effet de l'environnement gazeux sur les cultures de Schw. castellii en FS, aussi bien en conditions d'aérobiose qu'en anaérobiose.

En aérobiose, les rendements en biomasse ont été plus importants dans les fermenteurs ayant reçu un taux d'aération élevé. Ces résultats nous ont orienté vers le développement d'un système assurant des rendements uniformes en biomasse à toutes les hauteurs du fermenteur, en contrôlant le niveau de CO2 à 2 % à la sortie du bio-réacteur. Ce système de régulation est simple, efficace, et peut être extrapolé à tout système de fermentation en milieu solide.

Nous avons démontré qu'il est possible de transformer directement l'amidon en alcool au cours d'une fermentation solide de *Schwanniomyces*, comprenant une phase aérobie suivie d'une autre phase anaérobie.

Par ailleurs, aucun rapport portant sur l'utilisation de levures amylolytiques à capacité fermentaire pour la production d'alcool en FS n'était disponible jusqu'à présent. Vu l'intérêt de la production d'alcool, nous avons décidé d'orienter la suite de ce travail dans cet axe. Les résultats sont présentés et discutés dans les chapitres 7 et 8.

PRODUCTION D'ALCOOL PAR Schw. castellii EN FS

7. PRODUCTION D'ALCOOL PAR Schw. castellii EN FS

Dans ce chapitre nous présenterons plusieurs études portant sur la production d'éthanol à partir d'amidon à l'aide de *Schw castellii*. Nous avons étudié dans un premier temps, l'influence de la teneur en urée, du pH initial du milieu de culture et de l'aération sur le déroulement de la fermentation en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. Ensuite, une étude explicitant les bilans matière de la fermentation ainsi que la morphologie des levures et la structure de la bagasse, a été réalisée. L'effet de l'O2, la concentration en amidon et le rapport C/N sur la fermentation sont aussi rapportés.

7.1 Optimisation de la production d'alcool en conditions mixtes d'aération

Trois facteurs ont été sélectionnés pour réaliser l'optimisation du milieu et des conditions de culture à savoir: le pH initial, l'aération et la concentration en urée.

Le choix de ces trois facteurs répond aux critères suivants :

- La régulation adéquate du pH lors des cultures de *Schw. castellii* en FS avait été considérée comme très importante. Ceci a été confirmé par nos résultats (§ 5.2 et § 5.3.2) et ceux d'autres auteurs en FSm (BOZE et coll., 1989 et CALLEJA et coll., 1986b).
- Nous avons pu montrer que la formation d'alcool à partir d'amidon implique d'abord une phase aérobie pour la biosynthèse des enzymes nécessaires à l'hydrolyse de l'amidon et la croissance (§ 6.3). Une phase aérobie très longue produira beaucoup d'enzymes et de biomasse, diminuant le rendement d'alcool, au contraire une phase aérobie très courte empêchera une production suffisante d'amylases pour l'hydrolyse complète de l'amidon.
- D'après les résultats présentés au chapitre 5 (§ 5.2.1 et 5.4), l'urée joue un rôle important dans la régulation du pH au cours de la fermentation.

7.1.1 Influence de la teneur en urée, de l'aération et du pH initial

L'objectif de cette première expérience est d'évaluer l'influence relative du pH initial, de la teneur en urée et de la durée de l'aération sur le rendement de la production en alcool.

Les essais ont été réalisés en utilisant des colonnes de 60 g de capacité, inoculé avec une preculture âgée de 24 h renfermant environ 1 x 10⁷ cellules / ml. Le taux d'humidité initial était voisin de 77 %. L'amidon soluble a été utilisé comme source de carbone à raison de 100 g/l. Un plan factoriel complet, 2³, avec le point central répété a été mis en œuvre (SANGLIER, 1977; HIMMEL-BLAU, 1969). Afin d'étudier l'effet du pH initial, la teneur en urée et la durée de l'aération, chaque facteur a été considéré à 3 niveaux codés: - 1, 0, et + 1 (Tableau 7.1).

Le pH initial et la concentration en urée sont fixés au départ dans le milieu de culture. Au niveau de l'aération les fermenteurs reçoivent de l'air humidifié pendant toute la durée de la phase aérobie, ensuite l'alimentation de l'air est coupée. Afin de maintenir l'anaérobiose, le CO2 dégagé pendant la phase anaérobie est libéré vers l'atmosphère après bullage dans un piège d'eau, ce qui évite la reoxygénation du milieu.

Neuf essais différents sont réalisés en prenant en compte la structure du plan expérimental (Tableau 7.1) et les valeurs réelles des facteurs (Tableau 7.2). Le rendement apparent de production d'alcool obtenu au cours de ces divers essais est exprimé par rapport à la valeur théorique (§3.11.2), est repris dans le Tableau 7.3. Ce rendement a été calculé en considerant la consommation totale des glucides pendant les phases aérobie et anaérobie de la fermentation.

L'effet des facteurs a été modélisé sous la forme du polynôme (DeMEO et coll., 1985):

$$Y = b0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_1 X_2 + b_5 X_1 X_3 + b_6 X_2 X_3$$

où Y est la réponse, X1, X2 et X3 correspondent respectivement aux valeurs codées de l'aération, du pH initial et de la teneur en urée, b0 est un terme indépendant, b1 à b6 sont les coefficients correspondants aux différents facteurs ainsi qu'à leurs interactions. Une régression multiple a été réalisée afin d'ajuster les données expérimentales au polynôme. Le coefficient de corrélation est égal à 0.8.

L'influence relative des facteurs et des interactions sur le rendement a été exprimée d'une manière similaire à celle utilisée précédemment (§ 5.3.1). Les résultats sont montrés dans la figure 7.1.

Tableau 7.1- Structure du plan d'expériences, 2³, avec les valeurs codées des facteurs étudiés.

N° d'essais	Facteurs				
	X1	X2	X3		
1	-1	1	1		
2	-1	1	-1		
3	-1	-1	1		
4	-1	-1	-1		
5	1	1	1		
6	1	1	-1		
7	1	-1	1		
8	1	-1	-1		
9-11	0	0	0		

Tableau 7.2.- Relation entre les niveaux codés et les valeurs réelles des facteurs étudiés.

	Facteurs	Niveaux reéls des fac			
	_	-1,0	0,0	+ 1,0	
X1:	Durée de l'alimentation d'air (h)	4,0	7,0	10,0	
X2:	pН	5,5	6,0	6,5	
Х3:	Urée (g/l)	4,0	6,0	8,0	

Tableau 7.3.- Effet des différents essais sur le rendement de production d'alcool.

N° d'essais	Rendement apparent par rapport au théorique ,%		
1	51,8		
2	62,4		
3	57,8		
4	45,6		
5	52,3		
6	57,0		
7	56,3		
8	50,7		
9	60,1		
10	59,0		
11	60,2		

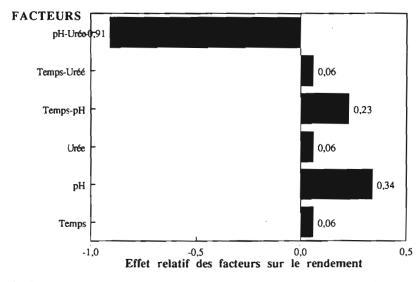
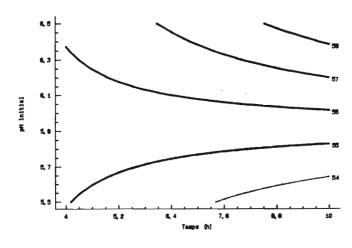


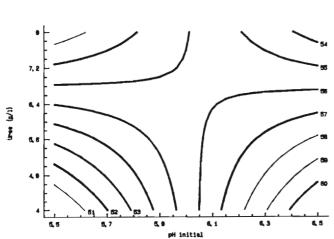
Fig. 7.1.- Effet relatif des différents facteurs et leurs interactions sur le rendement en alcool exprimé par rapport à la valeur théorique.

Nous avons observé l'effet favorable du pH, et de l'interaction Temps-pH sur le rendement. Un fort effet négatif de l'interaction pH-Urée est constaté. Cependant l'effet de l'aération aux niveaux testés semble avoir une faible influence. Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous avons matérialisé les isoréponses pour le rendement (Fig.7.2). Ces courbes sont une projection du polynôme calculé sur un plan de coordonnées (Xi-Xj). Dans un plan, il est seulement possible de représenter deux facteurs à la fois, il est donc nécessaire de maintenir constante la valeur d'un des facteurs. Pour notre étude nous avons choisi de porter à la valeur zéro (centre du domaine expérimental) le facteur non représenté. La représentation graphique des courbes d'iso-réponse a été limitée au domaine expérimental.

L'analyse de ces courbes nous a indiqué que les meilleurs résultats, (environ 60 % du rendement apparent par rapport à la valeur théorique; § 3.11.2) sont trouvés à: (1) pH 6,5, en coupant l'alimentation de l'air après 10 h de fermentation (2) et avec une teneur en urée égale à 4 g/l.

A partir de ces résultats nous avons décidé de réaliser un deuxième plan d'expériences en faisant varier uniquement le pH initial et la concentration en urée, l'alimentation d'air étant fixée à 10 h de fermentation à partir de l'inoculation du milieu de culture.





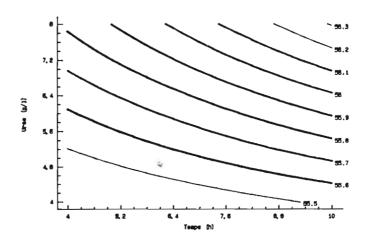


Fig. 7.2 Représentation de réponses constantes du rendement d'alcool, exprimé par rapport au rendement théorique, en fonction du pH initial, du temps d'alimentation d'air et de la teneur en urée.

7.1.2 Effet de la teneur en urée et du pH initial

Un deuxième plan d'expérience donc a été entrepris pour étudier l'effet du pH initial et de l'urée avec une durée constante de l'alimentation d'air. Ainsi un plan factoriel composite complet, 2^2 , avec 4 points axiaux et un point central répété a été mis en œuvre. Chaque facteur est considéré à 5 niveaux codés: -1,68, -1,0, +1, +1,68 (Tableau 7.4). Un nombre de 9 essais différents sont mis en œuvre en prenant en compte la structure du plan expérimental et les valeurs réelles des facteurs (Tableau 7.4). L'effet des différents essais sur plusieurs paramètres de la fermentation alcoolique de *Schw. castellii* en FS sont repris dans le Tableau 7.5.

L'effet des facteurs a été modélisé sous la forme du polynôme suivant (HIMMELBLAU, 1969): rapporter

$$Y = b0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_1 X_2 + b_4 X_1^2 + b_5 X_2^2$$

où Y est la réponse, X1 et X2 correspondent respectivement aux valeurs codées du pH initial et de l'urée, b0 est un terme indépendant, b1 à b5 sont les coefficients correspondants aux différents facteurs testés ainsi qu'à ses interactions. Les résultats des régressions pour les trois réponses mesurées sont synthétisés dans le tableau 7.6. Le rendement en alcool a été calculé en considerant la consommation totale des glucides pendant les phases aérobie et anaérobie de la fermentation.

Dans les figures 7.3 et 7.4 sont représentés respectivement les surfaces de réponse et les courbes d'iso-réponse pour le rendement apparent de conversion d'alcool, le caractère homofermentaire du procédé et le rendement de formation en biomasse. Le caractère homofermentaire a été calculé en considérant la proportion d'éthanol produit par rapport à la somme des produits de la fermentation.

Les surfaces de réponses pour le caractère homofermentaire et le rendement en biomasse présentent des maxima, tandis que la courbe pour le rendement en alcool présente une forme de type de selle de cheval (Fig. 7.3). Nous avons considéré le rendement apparent en alcool comme le facteur le plus important à considérer pour le choix des niveaux du pH initial et de l'urée. L'analyse de la courbe d'iso-réponse (Fig. 7.4) indique que les rendements les plus importants sont trouvés dans le quadrant de coordonnées: pH de 6,5 à 5,5 et teneur en urée de 1 à 3 g/l.

Tableau 7.4.- Structure du plan d'expériences, 2², et la rélations entre les niveaux codés et les valeurs réelles des facteurs étudiés.

Essais		Facteur	S	
	Valeurs codées		Valeurs	réelles
	X1	X2	pН	Urée g/l
1	+1	+1	7	4
2	+1	-1	7	2
3	-1	+1	6	4
4	-1	-1	6	2 .
5	1,68	0	7,34	3
6	-1,68	0	5,66	3
7	0	1,68	6,5	4,68
8	0	-1,68	6,5	1,32
9-12	00	00	6,5	3

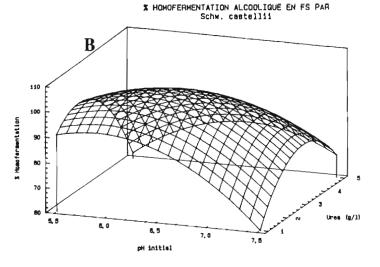
Tableau 7.5 Effet des différents essais sur plusieurs paramètres de la fermentation alcoolique de Schwanniomyces castellii, en milieu solide

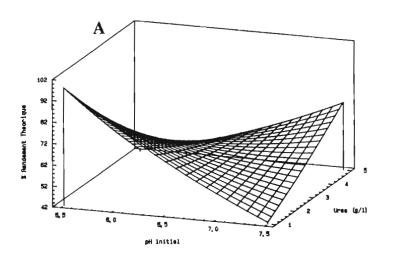
Essais	Homofermentation	Rendement apparent d'alcool	Y x/s
	%	% du théorique	g/g
1	95,0	53,7	0,14
2	94,7	53,4	0,17
3	90,3	50,7	0,14
4	99,3	71,8	0,14
5	81,7	60,8	0,11
6	98,9	68,8	0,14
7	82,7	60,9	0,15
8	91,4	65,8	0,16
9	100,0	61,8	0,18
10	100,0	58,0	0,17
11	100,0	63,5	0,19
12	100,0	61,8	0,19

Tableau 7.6.- Résultats des régressions pour les trois réponses mesurées.

Paramètres	Coefficient	Homofermentation	Rendement d'alcool	Y x/s
		%	% du théorique	g/g
Indépendant	bo	100,52	60,02	0,18
pH	bı	-2,97	-3,00	-2,12E-03
U	b2	-2,43	-3,00	-4,85E-03
pH - U	b3	2,32	5,34	-0,01
pH**2	b4	-3,17	0,78	-0,02
U **2	b5	-4,33	0,27	-0,01
Coefficient de correlation		0,91	0,82	0,92
Probabilité à l'erreur, %		< 2,5	< 14,3	< 2,1

Fig. 7.3.- Effet du pH initial et de la teneur en urée sur le rendement de production d'alcool (A), le profil homofermentiaire (B), et le rendement en biomasse (C).





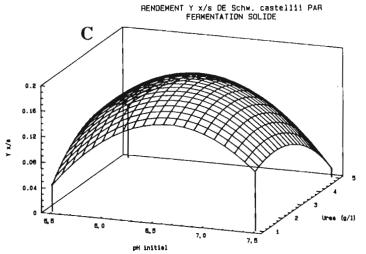
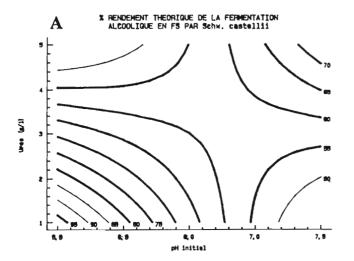
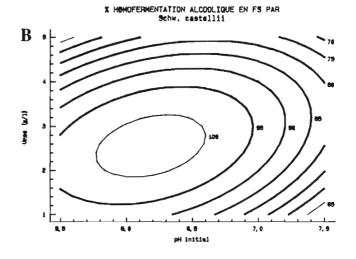
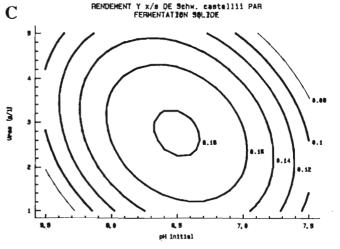


Fig. 7.4 Effet du pH initial et de la teneur en urée sur réponses constantes du rendement de production d'alcool (A), le profil homofermentaire (B), et le rendement en biomasse (C).







Cependant, le coefficient de corrélation ainsi que la probabilité d'erreur, indiquent de plus fortes différences entre les données observées et calculées pour le rendement en alcool que pour le caractère homofermentaire et le rendement en biomasse (Table 7.6). Afin d'analyser la source d'erreur par zones, nous avons schématisé les différences entre les valeurs de rendements observés et ceux calculés par le modèle (Fig 7.5). On constate que les résidus sont plus faibles dans le quadrant d'intérêt, où le rendement en alcool est plus important. La source de variation plus importante se trouve dans la zone limitée par des valeurs de teneur en urée de 4 à 4,68 g/l et de pH initial de 6 à 7. On observe aussi une dispersion importante dans le centre du plan d'expériences. Ce qui coïncide avec le centre de la "selle" (Fig 7.3). Ce résultat peut être expliqué par le fait que cette région est la plus instable du domaine expérimental, une légère variation du facteurs provoque de fortes variations sur la réponse.

Pour la suite de notre étude nous avons donc fixé les conditions à un pH initial égal à 5,7 et une teneur en urée de 1,3 g/l. Ces conditions correspondent à un rapport C/N de 65.

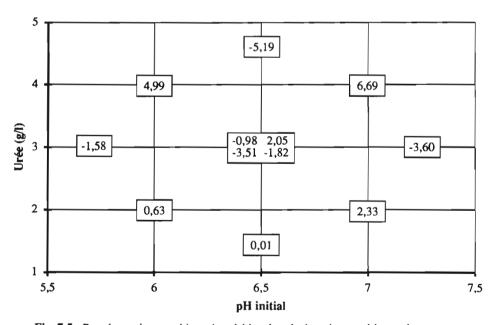


Fig. 7.5.- Représentation graphique des résidus dans le domaine expérimental

7.2 Potentiel d'utilisation de Schwanniomyces castellii en FS

7.2.1 Introduction

Au cours de ces dernières années, Schw. castellii est apparu comme l'une des meilleures alternatives à l'emploi de Saccharomyces cerevisiae, classiquement utilisée pour la production d'éthanol à partir d'amidon ou de substrats amylacés (INGLEDEW, 1987; DE MOT et coll., 1985; CALLEJA et coll., 1982; LONSANE et coll., 1991). Schw. castellii présente de nombreux avantages d'ordre pratique et économique tels que la non nécessité d'une hydrolyse préliminaire de l'amidon en glucose, le caractère homofermentaire de la culture, une production d'éthanol en absence de fermentations associées ou mixtes, qui sont indispensables lors qu'on utilise les substrats amylacés. Par contre sa tolérance plus faible à l'éthanol peut-être surmontée en piégeant l'éthanol en continu ; cette technique permet également de réduire le coût de la distillation (SATO et coll., 1985). Nos travaux ont montré que les procédés de fermentation solide peuvent être employés à la place des fermentations liquides, dans le but de dégager des bénéfices plus importants (LON-SANE et coll., 1991; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1991b); ces procédés emploient, dans un fermenteur en colonne, de la bagasse comme support solide inerte; celle-ci est imprégnée d'amidon soluble qui sert de source de carbone.

Le procédé que nous avons développé présente: (a) une phase de croissance aérobie de la culture, au cours de laquelle ont lieu la multiplication de la biomasse et la production des enzymes nécessaires à l'hydrolyse de l'amidon et (b) une phase où l'on observe la conversion du glucose formé en éthanol (§ 6.3). Le but ultime de nos recherches est d'employer un seul fermenteur pour assurer à la fois la phase de fermentation aérobie et anaérobie, sans perturber l'ensemble cellule-substrat-support, pour la multiplication de la biomasse, l'hydrolyse de l'amidon et la production d'éthanol. Outre les économies importantes que cela permet de réaliser dans les investissements et les coûts de fonctionnement, cette approche offre de nombreux avantages pratiques: il est plus facile de stopper l'alimentation en air du fermenteur et de recycler les gaz effluants dans le milieu de culture, afin de créer des conditions d'anaérobiose et d'évaluer le produit de la fermentation. Ce procédé permet également de s'affranchir de la préparation d'un inoculum de grande taille destiné

à la fermentation industrielle. Cette opération a été jugée problématique par BANK (1984) lors du développement industriel des procédés.

En outre, notre procédé nécessite, dans l'ensemble, moins de manipulations et de transfert de charges lourdes, un autre problème délicat rencontré au cours du changement d'échelle. Peu d'informations concernant les fermentations solides sont disponibles. Le risque de contamination se trouve significativement réduit grâce à une limitation des manipulations et à une meilleure maîtrise de la culture (LONSANE et coll., 1991c).

Toutefois, bon nombre de facteurs d'ordre morphologique, biochimique ou physico-chimique peuvent affecter l'efficacité d'un procédé qui emploie un fermenteur unique pour les phases aérobie et anaérobie.

Le présent sous chapitre traite des caractéristiques de la multiplication de la biomasse, de l'hydrolyse de l'amidon, de l'accumulation du glucose et de la production d'éthanol dans un fermenteur en colonne solide.

Nous décrivons en outre la morphologie des cellules et leur type de fixation au support solide aux cours des phases aérobie et anaérobie de la fermentation. Ce type d'information est utile en vue de l'optimisation du procédé, et au développement d'une méthode correcte d'estimation de la croissance. Aucune donnée sur ces problèmes de FS n'était auparavant disponible, même si quelques photographies en microscopie électronique montrant *Schw. castellii* sur différents substrats solides ont été publiées. Ces documents montrent que la croissance augmente avec le temps de culture, dans les procédés de FS destinés à l'enrichissement en protéines de sous-produits agro-industriels (ROSSI et CLEMENTI, 1985).

7.2.2 Fermenteurs utilisés

Les fermenteurs reçoivent de l'air humidifié au cours des 10 premières heures de fermentation, à raison de 1.4 ml/min g de poids de matière fraîche; l'alimentation en air est supprimée par la suite. Le CO2 dégagé est libéré dans l'atmosphère, après bullage dans de l'eau, afin de maintenir les conditions d'anaérobiose, excepté pour l'une des colonnes, notée par F. La

fermentation a été poursuivie jusqu'à 30 heures dans la colonne F en piégeant l'éthanol formé et en recyclant les gaz s'échappant du réacteur. La colonne F est équipée d'une double enveloppe assurant la circulation d'eau, d'un humidificateur pour l'alimentation en air, d'un piège à eau en amont de l'entrée d'air chauffé et humidifié dans le fermenteur, d'une console pour le piégeage de l'éthanol issu du milieu de fermentation, d'un contrôle en continu du CO2 et de l'O2, et d'une pompe à membrane pour le recyclage des gaz effluants. Pour la fermentation simultanée en anaérobie/aérobie, l'apport total en air dans le fermenteur F est de 400 ml, recyclé par une pompe à membrane sous un débit de 20 ml/min. L'air effluant traverse, au cours des phases aérobie et anaérobie de la fermentation, un condenseur de laboratoire refroidi par de l'eau provenant d'un bac à 2 °C. L'éthanol est également piégé en continu au cours de la phase anaérobie. Les gaz effluents sont ensuite séchés en passant à travers d'une colonne de silicagel avant l'analyse des gaz, puis recyclés dans le fermenteur. La température du milieu est suivie à l'aide de sondes (YSI, Ohio, USA).

Les phases de fermentation en anaérobiose/aérobiose simultanées, tout comme la fermentation strictement aérobie sur 30 heures sont pareillement conduites à l'aide de 6 fermenteurs colonne d'une capacité de 370 g de milieu solide imprégné (capacité totale = 1 litre). Dans ces conditions, le taux d'aération est de 0,8 ou 1,5 ml/min/g.

7.2.3 Bilan et cinétiques de la fermentation

Production de la biomasse et hydrolyse de l'amidon

Les résultats obtenus sur la production de la biomasse (Fig.7.6) et l'hydrolyse de l'amidon (Fig.7.7) au cours des phases aérobie et anaérobie de la fermentation dans le fermenteur prototype montrent une phase de croissance jusqu'à 12 heures, aboutissant à une teneur en biomasse de 43,7 mg de poids de matière sèche par gramme MSI. La plus grande partie de l'amidon est hydrolysée au cours de cette période, le taux d'hydrolyse est supérieur à 55 % après 12 heures de culture. Ce point constitue un avantage pour la conduite des 2 phases de la fermentation dans un fermenteur prototype, procédé qui permet un gain de temps considérable par rapport à la conduite séparée de ces deux phases. On observe un taux d'hydrolyse de l'amidon plus faible au delà de 15 heures dans

la phase aérobie. L'accumulation de glucose dans le milieu augmente progressivement jusqu'à 12 heures, contrairement à la concentration de maltose qui n'augmente que jusqu'à 7 heures (Fig.7.7). La concentration en maltose reste négligeable ou nulle au cours de la phase aérobie qui suit.

Production d'éthanol en phase anaérobie

La production d'éthanol commence à 10 heures après l'inoculation et à la fin de la phase aérobie (Fig.7.7), grâce à l'abaissement du taux en O2 et au début de l'accroissement de la concentration en CO2 dans le milieu (Fig.7.8). Toutefois, aucune synthèse d'éthanol n'a en lieu avant 10 heures dans la phase aérobie, et la production d'éthanol est d'environ de 6,1 mg.g⁻¹ MSI à 12 heures. Le taux de production d'éthanol augmente progressivement jusqu'à atteindre 89,3 mg.g-1 MSI à 30 heures dans la phase anaérobie. Les résultats concernant les concentrations en O2 et CO2 dans ces gaz effluents au cours des phases aérobies et anaérobies de la fermentation dans le bioréacteur F, soulignent l'existence d'une phase de transition entre 9 et 11 heures. Cette phase correspondant a une teneur en O2 qui n'a pas encore atteint son seuil minimal alors que la concentration en CO2 est déjà assez élevée.

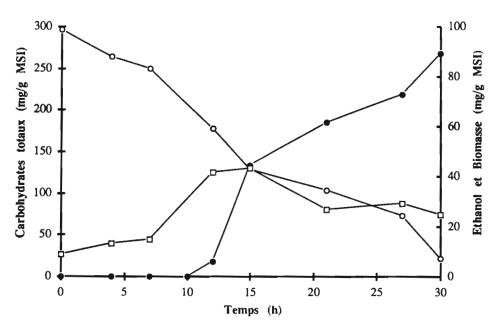


Fig.7.6. - Evolution des carbohydrates totaux (○), de la biomasse (□) et de l'éthanol (●) au cours des phases aérobies et anaérobies dans la FS de Schw. castellii.

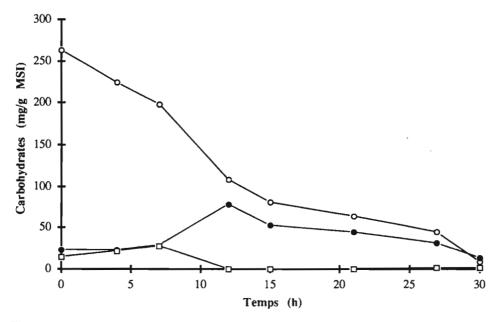


Fig. 7.7. - Evolution de la concentration en amidon (○), glucose (●) et maltose (□) au cours des phases aérobies et anaérobies dans la FS de Schw. castellii.

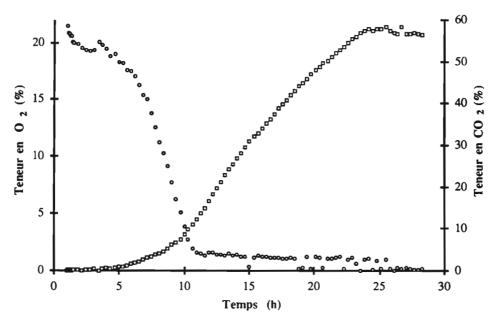


Fig. 7.8. - Taux en O2 et CO2 dans les gaz effluents pendant les phases aérobies et anaérobies au cours de la FS de Schw. castellii. CO2: □ et O2: ○.

Bilan de la fermentation

Les résultats concernant la fermentation (Tableau 7.7) et le bilan matière (Tableau 7.8) obtenus au cours d'essais de croissance de *Schwanniomyces castellii* en phase aérobie de 12 heures en fermenteur en colonne et la création de conditions anaérobies durant la période 12-30 heures dans le même fermenteur, montrent que le rendement de conversion du substrat en éthanol est de l'ordre de 94.7 % de la valeur théorique.

La multiplication de la biomasse se limite à la phase aérobie, au cours de laquelle 43 % de l'amidon présent initialement dans le milieu de culture est transformé. Dans la phase anaérobie qui suit, la biomasse se maintient au même niveau, et l'amidon est principalement consommé pour la production d'éthanol.

Au total, 97 % de l'amidon présent dans le milieu est utilisé au cours des phases aérobie et anaérobie de la fermentation.

Tableau 7.7.- Valeurs de différents paramètres au début de la fermentation, à la fin de la phase aérobie et à la fin de la phase anaérobie

Paramètre	Unité	Phase aérobie		Phase anaérobie	
		Initial	Final	Final	
Humidité	%	76.9	76.3	80.3	
pH		5.7	4.6	4.3	
CO ₂	%	0.1	21.3	60.0	
O2	%	21.0	1.2	0.5	
Gamme de température	°C	29.0	31.0	31.0	
Glucides totaux	mg/g MSI	296.0	177.7	8.0	
Biomasse	mg/g MS1	8.9	41.7	24.5	
Ethanol	mg/g MSI	0	6.1	89.3	
Temps de fermentation	h	0	12.0	30.0	

Tableau 7.8.- Bilan matière établi sur la base de 100 g de MSI

Paramètre	Unité	Valeur
Carbohydrates totaux au début	g	29.6
Consommation totale de carbohydrates	g	28.8
Utilisation de carbohydrates	%	97.3
Teneur en amidon, % de carbohydrates totaux	%	88.8
Carbohydrates utilisés pour la formation de biomasse	%	41.1
Carbohydrates utilisés pour la formation d'alcool	%	58.9
Biomasse formée pendant la phase aérobie	g	3.3
Biomasse formée pendant la phase anaérobie	g	-
Rendement en biomasse pendant la phase aérobie	g/g	0.28
Rendement en biomasse pendant la phase anaérobie	g/g	0.0
Ethanol produit pendant la phase anaérobie	g	8.9
Rendement en alcool pendant la phase anaérobie	g/g	0.53
Rendement de conversion d'alcool par rapport au théorique	%	93,6
Rendement apparent d'alcool par rapport au théorique	%	55,8

7.2.4. Caractéristiques de la croissance et du support solide inerte

La moëlle de la bagasse de canne à sucre, également appelée "fines" est séparée au cours du tamissage de la bagasse brute (DIXON, 1988; MOLINA et coll., 1983; DIEZ et LOIS, 1989). Les bagasses dépulpées sont utilisées dans la fabrication du papier et de feuilles compressées, alors que le moëlle de la bagasse (pith) n'a pas d'utilisation industrielle rentable, excepté en tant que composante de l'alimentation animale au Mexique ou dans d'autres pays. Les composants non fibreux de la bagasse présentent une surface spécifique très élevée, et une grande capacité d'absortion. Ils présentent également des propriétés de drainage faible, ce qui permet de les utiliser avec succés comme support destiné à l'absorption des solutions nutritives. Ces matériaux peuvent absorber jusqu'à 4 à 5 fois leur poids en eau (ORIOL, 1987).

La bagasse lavée, constituée de particules de 0,3 à 0,8 mm, que nous avons employée pour la présente étude, contient principalement des cellules parenchymateuses (Fig.7.9 et 7.10) et, en plus faible proportion, des fibres cassées (Figs 7.9, 7.10 et 7.11). Les cellules parenchymateuses sont plus petites, et elles présentent une paroi plus mince que les cellules des fibres.

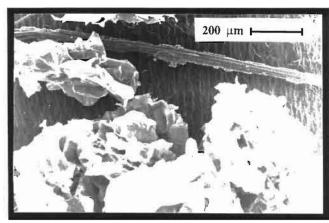


Fig. 7.9 .- Photographie en MEB de cellules parenchymateuses de la bagasse.

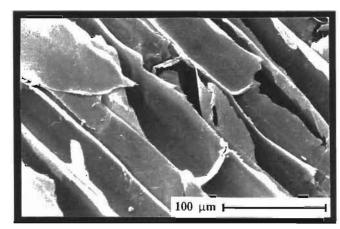


Fig.7.11 .- Vue agrandie des fibres en MEB.

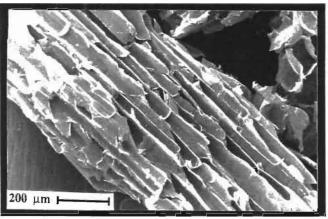


Fig. 7.10 .- Photographie en MEB des fibres présentes dans la bagasse préparée.

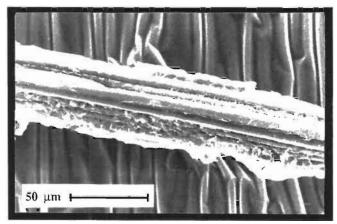


Fig. 7.12 .- Photographie en MEB montrant la couche épidermique de la moëlle, le mince cortex de cellules parenchymateuses et la moëlle parenchymateuse présents dans la bagasse préparée.

Ces dernières montrent un rapport longueur sur diamètre d'environ 70, alors que ce rapport est d'environ 5 pour les cellules du tissu parenchymateux de la moëlle (MOLINA et coll., 1983, DIEZ et LOIS, 1989).

La couche épidermique de la moëlle, le cortex étroit des cellules parenchymateuses à paroi mince et leur pénétration dans la moëlle parenchymateuse peuvent être clairement observées sur la Fig.7.12.

Caractères morphologiques des cellules

Les cellules de *Schw. castellii* sont de forme ovoïde, globulaire ou parfois de forme allongée ou cylindrique. Leur reproduction végétative est assurée par bourgeonnement multilatéral (Figs. 7.13 - 7.15). Aucun pseudomycelium ne se forme au cours des différentes phases de la fermentation. Les caractéristiques de la cellule sont exactement conformes à celles décrites par PHAFF et MILLER (1984) pour le genre *Schwanniomyces*. L'aspect de la cellule et sa morphologie sont semblables au cours des phases aérobie (Figs. 7.13 - 7.14) et anaérobie (Fig. 7.15) de la croissance. Il est intéressant de comparer les images réalisées en microscopie électronique à balayage (MEB) après fixation du matériel soit par le formaldéhyde, soit par le glutaraldéhyde. La technique de fixation au formaldéhyde est probablement trop destructive, si on se réfère à la présence de débris précipités à la surface des cellules et au caractère plus rugueux de la surface cellulaire, par rapport aux cellules fixées au glutaraldéhyde (Fig. 7.13). Ces deux images ont été réalisées sur des cellules en phase de croissance aérobie, mais des résultats semblables peuvent être obtenus avec du matériel en phase anaérobie. La cellule de levure conserve toutefois sa turgescence et sa structure naturelle quelle que soit la technique de fixation employée. Aucun phénomène de destruction de la cellule ou de modification de structure n'a été noté.

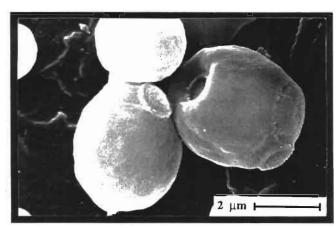


Fig. 7.13 .- Photographie MEB de cellules en phase de fermentation aérobie, fixées par le glutaraldehyde.

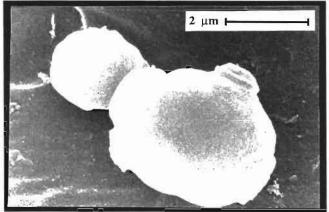


Fig. 7.15 .- Photographie MEB de cellules en phase de fermentation anaérobie, fixées par le glutaraldéhyde.

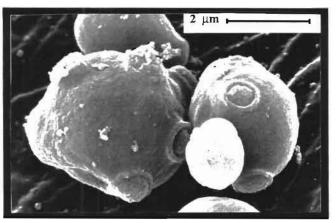


Fig. 7.14 .- Photographie MEB de cellules en phase de fermentation aérobie, fixées par le formaldehyde.

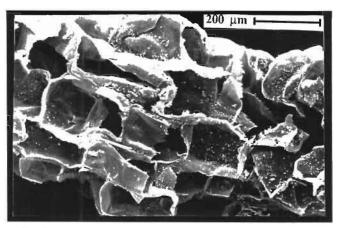


Fig. 7.16 .- Adhérence des cellules de levure à la surface des tissus parenchymateux.

Fixation de la cellule au support solide

Afin d'étudier le niveau de croissance et le type de fixation de la cellule au support solide, l'ensemble du matériel en fermentation est observé en microscopie électronique à balayage. On remarque ainsi que les cellules adhèrent à la surface des tissus parenchymateux (Figs. 7.16 - 7.17) ainsi qu'à celle des fibres de la bagasse (Fig.7.18). Les populations cellulaires sont plus denses dans les cratères formés dans les cellules parenchymateuses au cours de l'extraction industrielle du jus de canne pour la production de sucre, (Figs. 7.16 - 7.17) ainsi que dans les parties creuses des fibres (Fig. 7.18). Le développement des populations cellulaires semble dépendre des propriétés absorbantes des différents types de tissus. On note des caractéristiques de croissance et un type d'adhérence au support inerte strictement similaires, que la culture soit en phase aérobie ou anaérobie dans un fermenteur unique (Figs 7.19 - 7.20).

7.2.5 Discussion

Nous avons pu montrer que les levures cultivées dans un système de fermentation solide (FS), et en particulier à l'aide de procédés statiques, restent confinés dans des zones bien localisées du support imprégné (MITCHELL et LONSANE, 1991), à la différence des cultures immergées en milieu liquide où la localisation des cellules change constamment, à cause de l'aération et de l'agitation. Pour ces raisons, les champignons pénètrent plus profondément à l'intérieur des particules solides du support pour absorber les nutriments. Le système FS a été considéré, jusqu'au début de la dernière décade, comme le mieux adapté aux champignons filamenteux (LONSANE et coll., 1985; LONSANE et RAMESH, 1990).

A cause de leur incapacité à pénétrer dans le support, les levures et les bactéries n'ont pas pu bénéficié des progrès réalisés dans les systèmes de FS (LONSANE et coll., 1985). La présence de bactéries et de levures dans de nombreuses fermentations alimentaires a été considérée comme fortuite (LONSANE et RAMESH, 1990). Des travaux de recherche importants ont été menés avec succés, au cours des dernières années, sur la croissance et le métabolisme de levures et de bactéries dans des systèmes FS (RAMESH et LONSANE, 1987, 1989, 1991; RAMESH, 1990; KARGI et KURME, 1985; YANG, 1988).

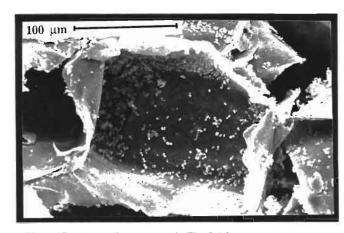


Fig. 7.17 .- Agrandissement de la Fig. 7.16.

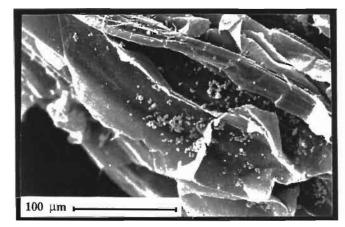
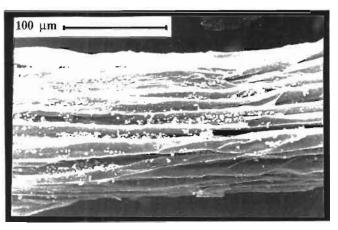
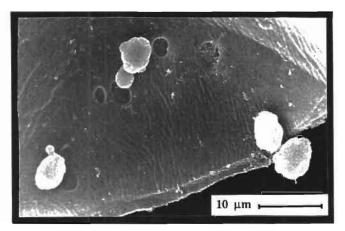


Fig. 7.19 .- Adhérence de la cellule au support solide en phase aérobie.



 $Fig.\ 7.18$.- Adhérence des cellules de levure sur les zones creuses des fibres.



 $\label{eq:Fig.7.20} \textbf{Fig. 7.20} \ \ \textbf{.-} \ \ \textbf{Adhérence de la cellule au support solide en phase anaérobie.}$

On a pu montrer par des observations en microscopie optique que la croissance s'effectue par adhérence sur les particules solides (RAMESH, 1990). Notre étude confirme ces observations sans aucune ambiguïté. De telles caractéristiques de croissance permettent une estimation plus aisée de la biomasse, car les cellules peuvent être facilement détachées des supports solides. Cette manière d'estimer la biomasse semble satisfaisante.

Sacc. cerevisiae, présentant des charges négatives en surface, assure son adhésion au support grâce à des modifications de la structure cellulaire et à l'excrétion de substances dans le milieu, qui réduisent les répulsions électrostatique entre les cellules et entre cellules et le support (VAN HAECHT et coll. 1984). D'autres travaux ont montré que Schwanniomyces castellii peut former un anneau à la surface du milieu liquide (PHAFF et MILLER, 1984), montrant ainsi sa capacité à s'adhérer à des surfaces en verre. L'adhérence à un support solide peut faire appel à un mécanisme semblable.

Les résultats que nous avons obtenu, concernant la morphologie des cellules, leur fixation au support solide inerte, les modalités de la croissance en biomasse, l'hydrolyse de l'amidon, l'accumulation de glucose et la biosynthèse d'éthanol montrent, dans leur ensemble, la faisabilité de l'utilisation d'un fermenteur unique pour la croissance aérobie de *Schwanniomyces castellii* destinée à accumuler la biomasse (inoculum), et la fermentation anaérobie subséquente destinée à la production d'éthanol.

7.3 Effet de la concentration en amidon, du rapport C/N et de l'O2.

L'effet de la teneur en amidon, en O2 et du rapport C/N sur la culture de Schw. castellii en FS pour la production d'alcool a été étudié. Les fermentations ont été réalisées en utilisant le dispositif expérimental schématisé sur la figure 4.8, lequel renferme une boucle de recyclage des gaz permettant d'introduire une quantité donnée d'air. Afin de mettre en évidence l'influence de ces trois facteurs, les conditions optimisées antérieurement ont été utilisées comme point de référence: soit pH initial 5,7 et urée 1,3 g/l.

Les essais ont été menés en suivant une approche classique, en faisant varier un seul facteur à la fois. Trois types d'essais ont été réalisés: Effet de la teneur en amidon, du rapport C/N et du volume d'air (oxygène) alimenté dans la boucle de recyclage.

L'étude portant sur l'effet de la concentration en amidon a été réalisée avec un rapport C/N égal à 65. La concentration de tous les composants du milieu de culture a été augmentée dans la même proportion que l'amidon, soit 1X, 2X, et 3X où X représente la concentration du milieu de culture de base. L'alimentation totale d'air étant de 3 700 ml.

L'étude sur l'effet du rapport C/N, a été menée à une teneur d'urée égale à 1,3 g/l et en faisant varier seulement la concentration d'amidon, les valeurs testées étaient de 100, 200 et 300 g/l, soit des rapports de C/N respectivement de 65, 130 et 195. L'alimentation en air a été fixée à 3700 ml.

L'étude sur l'effet de l'O2 a été réalisée à 200 g/l d'amidon à un rapport C/N de 65. Le volume total d'air au cours de la phase aérobie de la fermentation a été fixé à 1500, 2700 et 3700 ml.

Dans le tableau 7.9 sont rassemblés les résultats de ces divers essais. Les figures 7.21, 7.22 et 7.23 illustrent l'évolution des gaz en fonction de la concentration en amidon, du rapport C/N et de l'alimentation en oxygène

7.3.1 Effet de la teneur en amidon

La concentration de tous les composants du milieu de culture a été multipliée par 2 ou 3. L'étude de l'influence de la concentration du substrat se trouve étroitement reliée à la quantité d'eau présente dans le milieu de culture. En effet une augmentation du substrat entraîne une diminution importante de l'humidité du milieu. Une élévation de la concentration des composants du milieu de culture d'un facteur 3 provoque un abaissement de l'humidité de 77,1 % à 62,8 %. La consommation d'oxygène (exprimée par rapport à la quantité de matière sèche initiale) est diminuée lorsque la concentration en amidon augmente (Fig. 7.21). Néanmoins, dans ces conditions, il semblerait que l'alimentation en oxygène ne soit pas limitante car une utilisation du substrat de plus de 90 % est observée pour une concentration en amidon variant de 100 à 300 g/l (Tableau 7.9). De même il semblerait que cette oxygénation soit suffisante pour la biosynthèse d'amylases nécessaires à l'hydrolyse de l'amidon (CALLEJA et coll., 1986b).

Le rendement global apparent de production d'alcool est peu affecté pour une augmentation en amidon de 100 à 200 g/l (-3 %), cependant il diminue fortement pour une concentration de 300 g/l (-48.8 %). Ces résultats peuvent être expliqués par des problèmes de disponibilité de l'eau et d'augmentation de la force ionique dans le milieu de culture. Ceci souligne à nouveau le rôle essentiel de l'activité et de la quantité de l'eau dans le déroulement de la fermentation alcoolique SATO et YOSHIZAWA (1988) en avaient déjà fait la remarque.

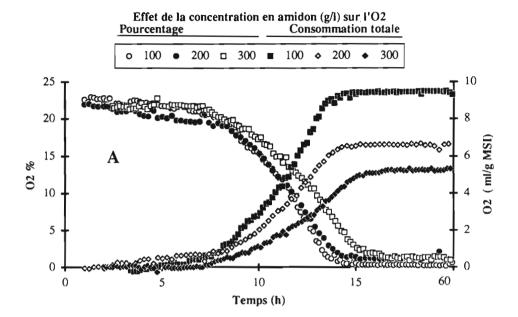
Tableau 7.9.- Performances de la fermentation alcoolique de Schw. castellii en culture

Paramètre		Valeurs	Yx/s	Utilisation de	Rendement en	Humidité
				substrat, %	alcool, % théorique	initiale, %
Teneur en amidon	a	100	0,05	95,7	62,5	77,1
g/l		200	0,03	93,7	60,5	69,6
		300	0,04	93,9	32,0	62,8
Rapport C/N	b	65	0,05	95,7	62,5	77,1
g/ g		130	0,03	92,8	47,5	70,1
		195	0,03	89,7	38,5	64,2
Volume d'air	С	1500	0,01	59,7	35,9	69,8
ml		2500	0,10	91,4	43,1	70,0
		3700	0,03	93,7	60,5	69,6

a: Rapport C/N de 65 et volume total d'air 3700 ml

b: Teneur en urée de 1,3 g/l et volume d'air 3700 ml

c:Concentration en urée 2,6 g/l, amidon 200 g/l et C/N 65



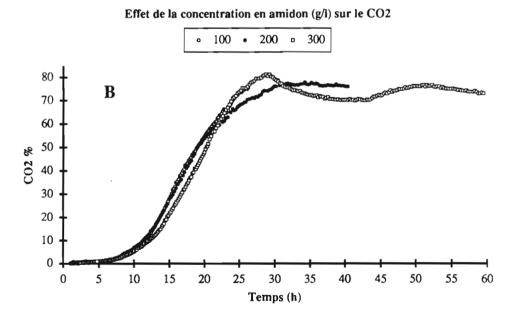


Fig. 7.21.- Effet de la concentration de l'amidon sur l'évolution de l' O2 (A) et du CO2 (B) lors de la fermentation alcoolique de Schwanniomyces castellii en culture solide en conditions mixtes d'aération: aérobie et ensuite anaérobie. pH initial 5,7 et avec l'addition de vitamines et oligo-élements. Conditions de culture: Aération en circuit fermé avec 3700 ml d'air.

7.3.2 Effet du rapport C/N

Afin d'étudier l'effet du rapport C/N sur la FS de Schwanniomyces, nous avons préféré augmenter uniquement la concentration en carbone (amidon) plutôt que de diminuer l'azote (urée), dont nous avons vu précédemment le rôle essentiel dans la régulation du pH. La teneur des autres composants reste celle du milieu de base.

Une augmentation du rapport C/N de 65 à 195 entraîne une diminution du rendement global d'alcool de 62,5 à 38,5 %. (Tableau 7.9). Cette augmentation, due à des teneurs croissantes d'amidon, entraîne aussi une forte diminution de l'humidité de 77 à 64.2 %. L'oxygène fourni ne semblerait pas un facteur limitant pour la synthèse d'amylases, car nous observons une utilisation assez élevée de l'amidon dans le domaine expérimental étudié (Tableau 7.9).

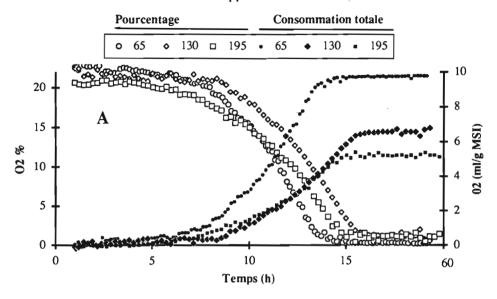
Il a été démontré que l'azote apparaît comme un élément limitant dans la fermentation alcoolique en FSm (BEZENGER, 1987). Il est probable que ce même type de limitation se retrouve en FS. Nous avons voulu rechercher ce phénomène en FS avec des concentrations élevées en amidon. Cependant, dans la FS il semblerait difficile donc de séparer l'effet de la limitation en azote, apporté par différents rapports C/N, d'un problème de disponibilité d'eau.

7.3.3 Effet de l'oxygène

Nos résultats précédents (§7.2.3), indiquent qu'une partie importante (40 %) de la source de carbone est consommée pendant la phase aérobie de la fermentation. Afin d'améliorer le rendement en alcool, nous avons décidé d'agir sur l'O2 pour limiter le développement de la biomasse. L'effet de l'oxygénation a été testé à 200 g/l d'amidon et un rapport C/N de 65. La quantité totale d'oxygène a été modifiée en changeant le volume total du circuit de circulation des gaz (§ 4.33 Fig. 4.8).

Une limitation progressive de l'O2 provoque une diminution graduelle du rendement en alcool et de l'utilisation du substrat (Tableau 7.9). La limitation en O2 donne lieu à des phases aérobies de plus courte durée (Fig. 7.23). Il semblerait que cette limitation entraîne une diminution de la synthèse d'amylases nécessaires à l'hydrolyse de l'amidon (CALLEJA et coll. 1986b).

Effet du rapport C/N sur I'O2



Effet du rapport C/N sur la formation du CO2

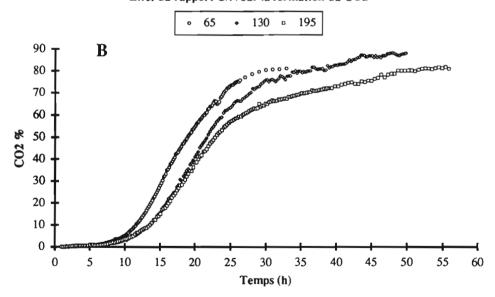
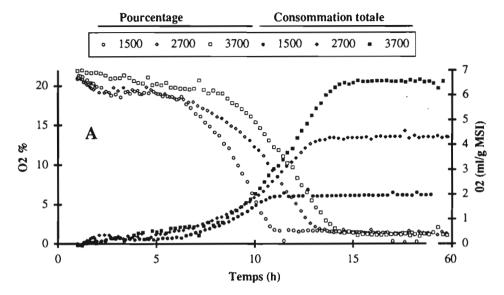


Fig. 7.22.- Influence du rapport C/N sur l'évolution de l'O2 (A) et du CO2 (B) et du lors de la fermentation alcoolique de *Schwanniomyces castellii* en culture solide en conditions mixtes d'aération: aérobie et ensuite anaérobie. Milieu du culture: Amidon (100, 200, 300) g/l; urée 1,3 g/l; pH initial 5,7 et avec l'addition de vitamines et oligo-élements. Conditions de culture: Aération en circulation fermée avec 3700 ml d'air.

Effet du volume initial d'air sur l'evolution d'O2



Influence du volume initial de l'air (ml) sur l'évolution du CO2

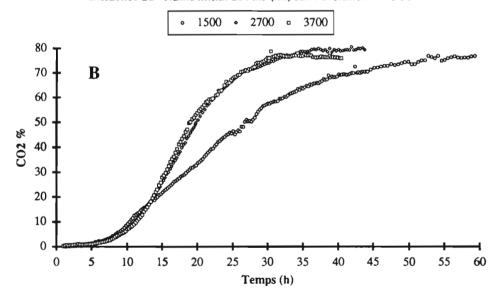


Fig.- 7.23 Effet du volume d'air initial sur l'évolution de l' O2 (A) et du CO2 (B) lors de la fermentation alcoolique de *Schwanniomyces castellii* en culture solide en conditions mixtes d' aération: aérobie et ensuite anaérobie. Milieu du culture: Amidon 200 g/l; urée 2,6 g/l; pH initial 5,7 et avec l'addition de vitamines et oligo-élements. Conditions de culture: Aéreation en circulation fermée avec 1500, 2700 et 3700 ml d'air.

7.3.4 Extraction d'alcool

Un des points faibles de *Schwanniomyces* est sa faible tolérance à l'éthanol. Cependant il a été indiqué que l'inhibition de l'éthanol sur l'activité des amylases est un caractère réversible (MALFAIT et coll., 1986). Par ailleurs, l'utilisation d'un fermenteur à recirculation du gaz permet l'extraction en continu de l'alcool produit (FUJIO et coll. 1984; SATO et coll., 1988), ainsi, nous avons retenu cette approche afin de diminuer le problème d'inhibition de la croissance par l'éthanol.

L'extraction en continu de l'éthanol produit a été réalisée par la circulation des gaz de fermentation dans un circuit fermé, puis piégeage de l'alcool dans un condenseur de laboratoire (§4.3.3 et Fig. 4.8). Dans le tableau 7.10 sont synthétisés les résultats obtenus sur les différents essais.

La performance d'extraction de l'alcool du milieu de culture dépend de la durée de l'extraction, de la vitesse de circulation du gaz, de la température et de l'efficience du condenseur. Des gradients de concentration d'alcool ont été observés aux différentes hauteurs du fermenteur. Ils étaient de différentes magnitudes en fonction des conditions d'extraction (Tableau 7.10). Des fermentations à 100, 200 et 300 g/l ont été réalisées en petit réacteurs de 60 g, sans l'extraction d'alcool. Les rendements en alcool ont été respectivement 60, 39 et 23 % par rapport à la valeur théorique, indiquant l'effet positif de l'extraction de l'alcool jusqu'à 200 g/l d'amidon (Tableau 7.9).

Il semblerait que les conditions testées n'étaient pas suffisantes pour permettre l'extraction complète de l'alcool, car dans le meilleur des cas nous n'avons pu récupérer que 74 % d'alcool produit en 60 h. Il est à noter que 50 % d'alcool produit peut être récupéré en 40 h avec un débit de 500 ml/min. D'autre part, le condensat obtenu est constitué d'un mélange binaire alcool-eau, à forte teneur en alcool, pouvant atteindre 21,2 % (p/v) soit 26,5° G.L.

Il a été vérifié que l'efficience de piégeage de l'éthanol était très haute, car un deuxième condenseur a été branché en série et dans aucun cas nous n'avons pas récupéré de condensat dans ce second condenseur. La température du condenseur a été maintenue à 2 °C par un Cryostat.

Ces résultats doivent être approfondis par une étude de faisabilité de l'extraction de l'éthanol par recyclage.

Tableau 7.10.- Résultats d'extraction d'alcool dans les différentes conditions de teneur en amidon,

rapport C/N et volumes d'air testés Hauteur du CONCENTRATION EN ETHANOL (g/l) DANS LES MILIEUX ADSORBES fermenteur, cm Teneur en amidon Rapport C/N Volume d'air 200 195 1500 100 300 65 130 2500 3700 g/I g/g ml 15 20,2 13,0 4,7 13,0 21,7 4,7 4,2 7,4 13,0 30 34,8 5,7 39,7 5,5 39,7 15,2 13,4 7,0 39,7 45 35,2 61,9 8,5 61,9 18,8 18,8 9,7 61,9 13,3 60 33,6 67,9 9,2 67,9 32,2 19,7 12,0 24,0 67,9 75 32,4 66,9 66,9 13,4 43,6 43,6 14,7 35,6 66,9 90 36,9 68,4 23.1 68,4 56,5 37,7 19,9 46.7 68,4 Conditions d'extraction Débit gaz, ml/min 100 200 200 100 350 350 500 500 200 30 40 30 50 60 40 40 Temps, h 60 40 Ethanol % dans le réacteur 97,2 93,4 26,0 97,2 60,2 39,4 45,8 49,4 93,4 2,8 39,8 % récupéré dans le condensat 6,6 74,0 2,8 60,6 54,2 50,6 6,6

180,1

47.9

162,5

212,6

97.1

166

138,5

Teneur dans le condensat, g/l

47.9

138,5

^{1:} Rapport C/N de 65 et volume total d'air 3700 ml 2: Teneur en urée de 1,3 g/l et volume d'air 3700 ml

^{3:}Concentration en urée 2,6 g/l, amidon 200 g/l et C/N 65

7.3.5 Discussion

Les résultats obtenus mettent en évidence le rôle prédominant de l'humidité et probablement de l'activité de l'eau sur le déroulement de la fermentation alcoolique de Schwanniomyces castellii en FS. Des résultats similaires ont déjà été présentés (ORIOL, 1987; SATO et YOSHIZAWA, 1988) En effet, l'utilisation de hautes concentrations de substrats solubles n'est pas conseillée dans ce type de système où la disponibilité de l'eau pour les levures est limitée. Afin de palier ce problème l'utilisation de matériaux amylacés insolubles est possible. Cependant, il est probable que l'hydrolyse de ces substrats bruts sera plus difficile.

SATO et coll. (1988) ont utilisé ce même type de fermenteur à circulation des gaz pour la production d'alcool. Cependant, une durée d'une dizaine de jours est nécessaire pour l'extraction complète de l'alcool produit à partir de matériaux amylacés insolubles.

Dans cette étude la récupération d'un condensat à haute teneur en alcool est un résultat prometteur. La nature poreuse de la bagasse, utilisée comme support, facilite notamment ce procédé d'extraction. Cependant les conditions de l'extraction de l'alcool doivent être améliorées afin d'établir de nouvelles perspectives d'application des levures amylolytiques en FS.

7.4 Conclusion

Dans la première partie de ce chapitre nous avons déterminé des conditions de culture permettant d'assurer un rendement global de production d'alcool d'environ 60 % par rapport au rendement théorique ainsi qu'un profil homofermentaire. Ceci a été possible en fixant la teneur en urée à 1,3 g/l, le pH initial à 5,7 ainsi que par l'alimentation de l'air pendant les dix premières heures de la fermentation.

Ensuite on a étudié la fermentation par Schwanniomyces castellii en conditions mixtes d'aération: Une phase de croissance aérobie suivie d'une phase anaérobie. La première étape assure la production d'une quantité d'amylases nécessaires à l'hydrolyse de l'amidon tandis que pendant la seconde étape se réalise la production d'alcool. Le bilan matière indique que pratiquement 40 % des sucres totaux sont utilisés pendant la phase aérobie tandis que le reste est transformé en alcool.

L'utilisation globale de la source de carbone est de 97 %. Le rendement de conversion en éthanol est de 94 % de la valeur théorique.

Par ailleurs, une description de la morphologie des cellules de *Schwanniomyces castellii* et leur type d'attachement sur la bagasse, utilisée comme support, est également réalisée à l'aide de la microscopie électronique à balayage.

Des essais de fermentation réalisés dans le fermenteur prototype nous ont permis de confirmer le rôle essentiel de l'eau en FS ainsi que l'importance de l'apport en oxygène dans l'utilisation de l'amidon. Cependant, des études permettant d'améliorer l'extraction en continu de l'alcool sont nécessaires pour aboutir à un procédé parfaitement rentable.

EXTRAPOLATION DE LA PRODUCTION D'ETHANOL PAR Schwanniomyces castellii EN FS.

8.- CONSERVATION DES BILANS DE CHALEUR ET D'EAU COMME CRITERE D'EXTRAPOLATION DE LA PRODUCTION D'ETHANOL PAR Schwanniomyces castellii EN FS.

Ce chapitre présente une méthodologie nouvelle pour l'extrapolation (Scale-up) des FS, les résultats obtenus font l'objet d'une publication dans Process Biochemistry *. Nous avons voulu présenter l'essentiel du contenu de cet article tout en adaptant au contexte d'un mémoire de thèse.

Un regain d'intérêt de la FS au cours de ces 10 dernières années à travers le monde a été observé (STEINKRAUS, 1984), cependant l'exploitation commerciale des systèmes de FS est encore timide (LONSANE et coll., 1985), malgré les nombreux avantages de ce système sur la FSm conventionnelle (MITCHELL et LONSANE, 1991), et le développement de produits qui n'avaient jamais été explorés par des systèmes de FS. De nombreuses raisons ont été évoquées pour expliquer cette situation (LONSANE et coll., 1985). Parmi elles, le manque total de critères scientifiques d'extrapolation est classé comme un des obstacles majeurs dans la commercialisation des systèmes de FS (GHILDYAL et coll., 1981).

Ce travail a donc été entrepris pour développer des critères d'extrapolation efficaces, en vue de faciliter l'exploitation industrielle des FS. L'application d'un critère d'extrapolation simple et pratique est présentée dans ce chapitre.

8.1 Formulation du critère d'extrapolation

Il est bien connu que la productivité de la FS, même au stade laboratoire, est fortement affectée par un nombre de paramètres tels que: 1) prétraitement du substrat, 2) composition du milieu, 3) pH initial du milieu, 4) conditions d'autoclavage, 5) forme, âge et taux d'inoculum, 6) taux d'agitation, 7) aération et transfert d'oxygène, 8) température, 9) teneur en eau du milieu et

^{*} G. SAUCEDO-CASTANEDA, B.K. LONSANE, M.M KRISHNAIAH, J.M. NAVARRO, S. ROUSSOS et M. RAIMBAULT. (1991) Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by Schwanniomyces castellii in a solid state fermentation system. Process Biochemistry, En presse.

10) humidité dans le fermenteur (LONSANE et coll., 1985). De ces paramètres, les cinq premiers peuvent être facilement gardés constants à des échelles supérieures, quoi que des problèmes peuvent être liés à la stérilisation du milieu et à l'obtention de quantités plus importantes d'inoculum (ROUSSOS et coll., 1991). L'agitation des solides fermentés ne sera évidement pas considérée dans le cas des procédés statiques de FS (MITCHELL et LONSANE, 1991), qui représentent la majorité des procédés de FS. En outre, l'agitation dans les procédés de FS fait habituellement appel à des vitesses très basses pour éviter d'endommager le mycélium (MITCHELL et LONSANE, 1991; LONSANE et coll., 1991). L'extrapolation posera donc des problèmes essentiellement pour les quatre derniers paramètres.

La production de chaleur est directement liée à l'activité métabolique des microorganismes (CHAHAL, 1983), est l'un des points les mieux documentés en FS. La génération de chaleur à des taux de 3200 Kcal/kg de matière sèche (RATHBUN et SHULER, 1983), 80 Kcal/kg de matière sèche (RAIMBAULT, 1980), 14960 btu/kg de solide sec (EDWARDS, 1977) et une moyenne de 600 Kcal/kg (MUDGETT, 1986) ont été rapportés dans la plupart des procédés FS. Une génération de chaleur aussi intense et la faible conductivité thermique des solides de fermentation provoque une augmentation rapide de la température; (SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990b). Une température maximale de 47°C au centre des substrats fermentés lors de la production tempeh (RATHBUN et SHULER, 1983), une température présentant un excedent de 20°C dans des fermenteurs rectangulaires sur 80 mm de profondeur et des températures de 60-70°C dans les régions internes des composts contre 37°C dans les zones externes des piles (HAYES, 1977) sont couramment rencontrées.

Les effets défavorables de hautes températures sur la germination des spores, la croissance cellulaire, la formation de produits, la sporulation et par conséquent sur la productivité globale des procédés de fermentation sont bien connus (MOREAUX, 1980). Une simple augmentation de 2,5°C dans les solides fermentés sur 40 mm de hauteur nécessite le double du temps de fermentation pour atteindre la même teneur en enzymes que pour une fermentation sans gradients sur 20 mm de hauteur (GHILDYAL et coll., 1981). Il est donc essentiel d'éliminer la chaleur métabolique du milieu fermenté et pour cela différentes techniques telle que l'aération forcée, la circulation d'eau dans une double paroi, l'agitation des solides et la couverture des surfaces externes du fer-

menteur avec des matériaux trempés d'eau ont été utilisées (LONSANE et coll., 1991; LONSANE et coll., 1985). Les deux dernières techniques peuvent être écartées pour un usage à grande échelle des FS à cause de leur très faible efficacité. La circulation d'eau dans une double enveloppe est de faible efficacité en FS statique à cause de la faible conductivité thermique des solides, quoi que cela puisse être utilisé pour compléter l'action de l'aération forcée. On doit donc se reposer essentiellement sur la technique d'aération forcée pour éliminer la chaleur. L'élimination par aération forcée de 80% de la chaleur générée dans le réacteur ainsi que l'évacuation de la chaleur par évaporation d'eau on été comparées aux techniques conventionnelles faisant appel à la convection et à la conduction (GRAJEK, 1988; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990b).

En considérant la quantité de chaleur qui doit être éliminée, une quantité significativement élevée d'air doit passer à travers les solides pour un contrôle efficace de la température. On peut penser qu'il serait plus que suffisant pour répondre à la demande en oxygène, même si elle est très élevée. A ce propos, il est intéressant de citer l'exemple d'un réacteur à plateaux de 155 kg de capacité (Type Koji) où l'aération élimine les effets nocifs de la chaleur métabolique sur la productivité du procédé (AHMED et coll., 1987).

Cependant l'aération forcée réduit fortement l'humidité du milieu. Une évaporation d'environ 7 g d'eau se produit quand on injecte la quantité d'air nécessaire pour évacuer la chaleur d'oxydation de 1 g d'amidon (LAUKEVICS, et coll., 1984), L'aération forcée du réacteur pour la croissance de Aspergillus oryzae sur riz provoque des gradients de teneur en eau dans le milieu (NA-RAHARA et coll., 1984). La perte d'eau du substrat et une diminution de l'humidité dans l'air de sortie, et donc le séchage des solides, ont été également reportés en fermentation en plateaux (AH-MED et coll., 1987). Ces pertes d'eau constituent un problème sérieux en FS, car le milieu présente déjà une activité de l'eau très basse (DOELLE, 1985).

Les microorganismes ont besoin d'eau pour leur croissance et leurs activités métaboliques. Leur croissance ainsi que la sporulation de *Rhizopus oligosporus* ont été rapportés comme dépendantes de la teneur en eau du milieu (WANG et coll., 1975). De plus, l'existence d'un optimum pour l'humidité du milieu, correspondant à un pic d'activité métabolique, mais spécifique à chaque souche de microorganisme ont été décrits récemment (RAMESH et LONSANE, 1990). La teneur eau du milieu a des effets profonds sur les propriétés physico-chimiques de la masse de substrat

humide et les paramètres de croissance des microorganismes (RAMESH et LONSANE, 1990). Il est donc indispensable de contrôler la quantité d'eau pendant la fermentation. Différents moyens tels que l'humidification de l'air avant son passage dans le fermenteur, l'utilisation de teneurs en eau légèrement plus élevées, l'humidification de l'atmosphère dans le fermenteur et l'addition intermittente d'eau stérile dans les solides fermentés ont été employés (LONSANE et coll., 1991; LONSANE et coll., 1985). Parmi ces moyens, l'humidification de l'air, avant son entrée dans le fermenteur parait être la plus pratique, la plus efficace et la plus fiable. De plus son extrapolation ne pose pas de problème majeur.

Il est donc bénéfique de combiner le contrôle de l'aération et la teneur en eau du milieu solide en utilisant de l'air humide pour satisfaire la demande en oxygène de la culture. Une telle approche peut être retenue comme critère d'extrapolation. L'inventaire des différents paramètres aboutit à l'établissement d'un certain nombre de bilans.

a) Le bilan chaleur dans le processus de fermentation (TRILLI, 1986) est explicité par l'équation:

Q métabolisme + Q agitation - Q fermentation - Q échange =
$$\alpha \frac{dT}{dt}$$

Où:

Q métabolisme = chaleur générée par les réactions oxydatives.

Q agitation = chaleur cédée par l'agitation mécanique et résultant du pompage de l'air

et des gaz.

Q évaporation = chaleur latente de vaporisation qui représente la perte de chaleur par

évanoration

Q échange = perte de chaleur à travers les parois du fermenteur.

dT = évolution du paramètre température.

dt

α = constante de proportionnalité

b) De façon similaire, le bilan matière sur l'eau peut être représenté par l'équation:

W fournie + W générée - W consommée - W évaporée =
$$\beta$$
 $\frac{dW}{dt}$

où:

W fournie = eau cédée au système par l'air humide au cours de la convection forcée

à travers le milieu. Sa quantité dépend du flux de l'air et du contenu d'eau

de l'air d'entrée.

W générée = eau générée par les réactions oxydatives.

W consommée = eau consommée dans les réactions telles que l'hydrolyse de l'amidon

et la croissance microbienne.

W évaporée = eau qui s'évapore. Cette quantité sera déterminée par le débit d'air en

sortie et sa teneur en eau.

<u>dW</u> = évolution du paramètre teneur en eau.

dt

B = constante de proportionnalité.

c) Lorsque dT et dW sont nuls, la température et la teneur en eau des solides fermentés seront constants. Par conséquent, le système est en régime permanent par rapport à ces deux paramètres.

d) Donc, le maintien des bilans chaleur et matière (eau) doit assurer une température et une humidité constantes du milieu. Cette règle définit les besoins de la FS quant aux quatre paramètres critiques, c'est-à-dire, la température du milieu solide, la teneur en eau des solides, l'humidité dans le fermenteur et l'aération ou le transfert d'oxygène. Par conséquent, la productivité de la fermentation peut être constante à toutes les phases de l'extrapolation si les bilans de chaleur et d'eau sont mantenus. La stratégie d'extrapolation peut donc assurer tous les besoins des systèmes de FS au niveau de la régulation de la température et de la teneur en eau.

8.2 Justification de l'approche expérimentale

Les études de validité ont été réalisées sur le procédé de production d'éthanol par Schwanniomyces castellii en FS, impliquant l'utilisation du substrat absorbé sur un support solide inerte et en réacteurs type colonne. La sélection de ce procédé dans cette étude a été guidé par de nombreux facteurs scientifiques, industriels et pratiques:

a) Des efforts de recherche et de développement considérables ont été entrepris dans les an-

nées récentes pour produire du bioéthanol à partir de produits et de sous produits amylacés (DE MOT, 1990). Cependant, les succés en termes économiques dans la technologie de production sont encore en devenir.

- b) La levure Saccharomyces cerevisiae, est utilisée communément dans la plus part des cas, quoique la bactérie, Zymomonas mobilis a aussi été étudiée en détail comme un microorganisme prometteur (STEWART et coll., 1984). A cause de la nature non amylolytique de ces souches, les procédés de production de bioéthanol à partir de substrats amylacés impliquent l'hydrolyse extensive et coûteuse de l'amidon par des enzymes en sucres fermentescibles.
- c) Le temps utilisé pour l'hydrolyse de l'amidon a été réduit à 4 h en utilisant une amyloglucosidase au cours de la fermentation par *S. cerevisiae*. Cependant ces procédés ne sont pas encore commercialisés (FRELOT et coll., 1982).
- d) L'hydrolyse d'amidon cru est une alternative prometteuse (FUJIO et coll., 1984), bien que ces procédés restent dépendants des enzymes exogènes à la fermentation alcoolique.
- e) La production d'éthanol par FS en utilisant des matériaux fibreux ou amylacés, a été essayée par plusieurs auteurs, leur haute teneur en fibres et en solides ne sont pas une limitation pour la FS. La fermentation directe de ces produits par FS évite la dilution de l'éthanol obtenu (GIBBONS et WESTBY 1988; GIBBONS et coll., 1988). La récupération de l'alcool pose encore de problèmes pratiques lors de la distillation (TRILLI, 1986).
- f) L'utilisation d'éthanol de levures amylolytiques à capacité fermentaire, a été l'objet de plusieurs études. Les problèmes rencontrés restent liés à la tolérance à l'alcool: en effet les levures possédant une forte activité amylasique présentent une faible tolérance à l'éthanol alors que celles qui ont une forte tolérance à l'alcool présentent une faible activité amylasique. Des fermentations en co-culture ont été proposées pour palier à ce problème (BERTHOLOMEW, 1960; WILSOB et coll, 1982; DeMOT et coll 1985, AMIN et coll 1985; NAM et coll, 1988).
- g) Schwanniomyces spp, spécialement Schw. castellii, ont été qualifiées de "super levure", grâce a sa capacité amylasique et fermentaire (INGLEDEW, 1987). La fermentation présente un profil homofermentaire où la conversion d'amidon est presque complète, bien que la culture pos-

sède une faible tolérance à l'alcool. Ce problème peut être pallié par l'extraction en continu de l'alcool produit, en utilisant un fermenteur à circulation des gaz (SATO et coll., 1985 et 1988). Ces systèmes peuvent réduire notamment les coûts de la distillation de l'éthanol.

- h) Schw. castellii a été utilisé antérieurement en FS mais le travail fut limité à la phase aérobie pour la production de protéines à partir de pommes de terre ou de sous produits (ROSSI et CLEMENTI, 1985) et pour l'enrichissement en protéines de résidus de patate douce (YANG, 1988).
- i) Un travail préliminaire sur la production d'éthanol à partir d'amidon soluble par *Schwan-niomyces castellii* avait démontré ces fortes potentialités dans un système de FS impliquant le piégeage en continu de l'alcool formé (RAIMBAULT et coll., 1991).
- j) La production d'éthanol par *Schwanniomyces castellii* implique deux phases: une fermentation aérobie pour la production d'amylases et de biomasse, et une fermentation anaérobie pour la production d'alcool. L'implication de ces deux types de fermentation dans un seul procédé rend l'étude de validation plus prometteuse.
- k) Parmi les différents types de bioréacteurs disponibles pour les procédés de FS, le réacteur colonne est susceptible d'extrapolation et d'être mieux contrôlé. Il a été récemment couplé à un ordinateur pour une analyse et des contrôles en ligne (SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1991a). Le fermenteur colonne a aussi été préféré pour l'enrichissement en protéines de la patate douce par Schwanniomyces castellii en FS (YANG, 1988), quoique le mélangeur pétrin de boulangerie a été utilisé par (ROSSI et CLEMENTI, 1985).
- l) L'utilisation de la bagasse comme support pour absorber un milieu liquide a connu des développement importants (ORIOL et coll., 1988b, GONZALEZ-BLANCO et coll., 1990). Cela permet de récolter les bénéfices de la FS et de contrôler la composition du milieu. Cela facilite aussi les analyses de substrats, de la biomasse et des produits de fermentation afin de définir précisément le bilan matière. Il est également possible de réutiliser le support épuisé d'un lot précédent pour de nombreux cycles.

8.3 Fermenteurs utilisés

Quatre fermenteur de tailles différentes ont été utilisés (Tableau 8.1). Les fermenteurs ont été nommée petit (10 g), moyen, (60 g) prototype (370 g) et pilote (4100 g).

Description

Les caractéristiques des colonnes petites et moyennes sont décrites dans le chapitre "Matériels et Méthodes". Le fermenteur prototype consiste en 6 modules de 15 cm de long chacun et de 4 cm de diamètre (§ 4.3.3). Le fermenteur pilote est équipée de platines permettant de fermer les extrémités au moyen d'écrous. Des ouvertures à chaque plateau permettent la circulation de l'air ou des gaz, l'air est insufflé à l'aide d'un diffuseur. La colonne de verre est munie de 3 et 2 ouvertures sur les côtés opposés pour insérer les capteurs. Cette unité fut disposée horizontalement dans une chambre à température contrôlée pendant la totalité de la fermentation.

Table 8.1.- Description des fermenteurs

Fermenteur	Dimensi	ons (cm)	Volum	e (ml)	Charge	
type	Longueur	Diamètre	Total	Travail	(g)	
Petit	20	2	63	55	10	
Moyen	20	4	251	221	60	
Grand	90	4	1 130	1 000	370	
Pilote	64	15	11 300	11 000	4 100	

Fonctionnement des fermenteurs

La température a été mesurée par une thermistance. Dans le cas des petites et moyennes colonnes, chacune était équipée d'un capteur. Les fermenteurs prototype et pilote étaient équipés de 5 capteurs de température repartis sur l'ensemble du réacteur.

Les fermenteurs petits, moyens et pilote étaient alimentés en air pendant les 10 premières heures de fermentation, à un débit de 1,4 ml/min par g de matériel humide. Le CO2 produit est rejeté dans l'atmosphère après passage à travers d'un piège à eau pour maintenir des conditions

d'anaérobiose dans les petites et moyennes colonnes, sauf dans le cas d'une des colonnes moyenne, désignée F. Dans cette colonne F la fermentation est menée jusqu'à 30 h de façon à dupliquer la fermentation du module inférieur du fermenteur prototype.

Les fermenteurs prototype, pilote et la colonne F de taille moyenne furent équipés pour l'analyse du CO2 et O2. L'alimentation totale en air dans le cas de la colonne F et le fermenteur prototype a été de 400 et 2500 ml respectivement. Dans ces cas, l'air de sortie pendant les étapes aérobie et anaérobie de fermentation fut passé dans un condenseur pour piéger en continu l'alcool formé pendant la phase anaérobie. Le condenseur était refroidi dans un bain à 2°C. L'air ou les gaz de sortie après piégeage de l'alcool, était séché par passage sur de silicagel, analysé puis réhumidifié et réintroduit dans le fermenteur au moyen d'une pompe à membrane (Fig.4.8) . La vitesse de recyclage était respectivement de 20, 90 et 500-600 ml/min dans le fermenteur F, le prototype et le pilote.

8.4 Evaluation expérimentale du critère d'extrapolation

Les fermenteurs de différentes tailles sont équipés de divers types de contrôles et d'analyse. De plus, les conditions expérimentales permettent l'acquisition de résultats spécifiques pour une taille particulière du réacteur. Par exemple, la réalisation des grands fermenteurs et les conditions anaérobies ne permettent pas de prélever des échantillons du fermenteur à différents intervalles de temps de la fermentation. Le contrôle en ligne des gaz effluents n'était pas disponible pour les petites colonnes.

8.4.1 Profils de température et d'humidité

L'évolution de la température et de l'humidité au cours de la fermentation en milieu solide dans les différents réacteurs sont présentées sur les figures 8.1 et 8.2. Pour les fermenteurs prototype et pilote la valeur présentée est la moyenne des valeurs fournies par les 5 sondes de température (Fig. 8.1).

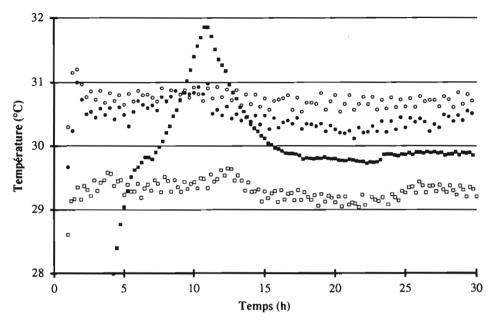


Fig. 8.1.- Evolution de la température dans les 4 fermenteurs utilisés au cours de la FS de Schw. castellii. ○ : Petit; ● : Moyen; □ : Prototype; ■ : Pilote. Les valeurs présentées pour les fermenteurs prototype et pilote sont des moyennes arithmétique et radiale respectivement.

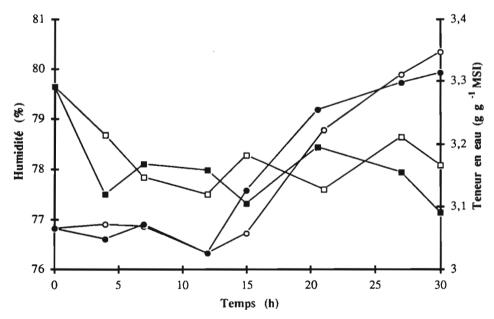


Fig. 8.2.- Evolution de la teneur en eau et de l'humidité en fonction du temps dans les fermenteurs de tailles petites et moyennes. ●: Humidité dans les petits fermenteurs; ○: Humidité dans les moyens fermenteurs; □: Teneur en eau dans les petits fermenteurs (g/g MSI); ■: Teneur en eau dans les moyens fermenteurs (g/g MSI).

Fermenteur type	Humidité (% p/p)	Teneur initiale (g g ⁻¹ MSI)	Teneur finale en ea (g g-1 MSI)	u Perte de poids (% p/p)
Petit	76.9 <u>+</u> 0.5	3.29 <u>+</u> 0.02	3.14 ± 0.01	4.6
Moyen	76.9 <u>+</u> 0.5	3.29 <u>+</u> 0.02	3.17 ± 0.01	3.6
Grand	76.8 <u>+</u> 0.4	3.35 <u>+</u> 0.02	3.22 ± 0.20	3.9
Pilote	77.6 + 1.2	3 47 + 0 02	3 45 + 0 08	0.6

Table 8.2.- Comparaison globale du contenu en eau dans tous les fermenteurs utilisés.

Les résultats indiquent que le système de contrôle fonctionne efficacement car la variation de température fut ± 1°C pour un point de consigne fixé à 30°C, néanmois la température s'élève presque à 32°C pendant 2 h et retombe à 31°C au cours des 2 h suivantes dans le plus grand réacteur. Cette augmentation de température est cependant d'une amplitude acceptable.

L'humidité du milieu dans les fermenteurs petits et moyens s'est practiquement maintenue à la valeur choisie de 77 % jusqu'à 14 h, la variation étant inférieure à \pm 0.5 % (Fig. 8.2). Après 14 h, elle s'établit entre 77-80 % probablement en raison de l'éthanol formé. Exprimer en g d'eau par g de matière sèche initiale (MSI), cette humidité s'est maintenue à des valeurs constantes: 3.2 ± 0.1 . La comparaison globale du contenu en eau du milieu dans les quatre fermenteurs utilisés indique qu'il n'évolue pas de façon sensible au cours de la fermentation (Tableau 8.2).

Les températures à différentes profondeurs dans les deux fermenteurs les plus gros sont décrites dans les figures 8.3 et 8.4. Pour le fermenteur prototype, la température à différentes hauteurs reste entre 28-30 °C. Pour le fermenteur pilote, la température reste dans une gamme de valeur de 28 et 31 °C, à l'exception faite d'une période de 4 h, entre la 8ème et la 12ème heure où la température s'élèvé à un maximum de 31,8°C (Fig. 8.1). Dans ce fermenteur, la température fut environ 30°C dans la majeure partie de la phase anaérobie et des variations de la température au moment du changement de métabolisme aérobie-anaérobie ont été observées. Néanmoins, les résultats indiquent le maintien de la température et du contenu d'eau des milieux à des niveaux satisfaisants dans les différents fermenteurs testés.

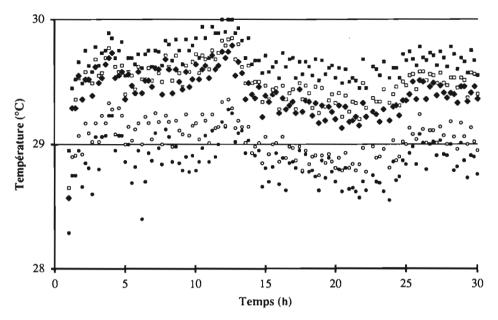


Fig. 8.3.- Variation de la température au cours de la fermentation à différentes hauteurs du fermenteur prototype. ●:15 cm; ○:30 cm; ■:45 cm; □:60 cm; •:75 cm.

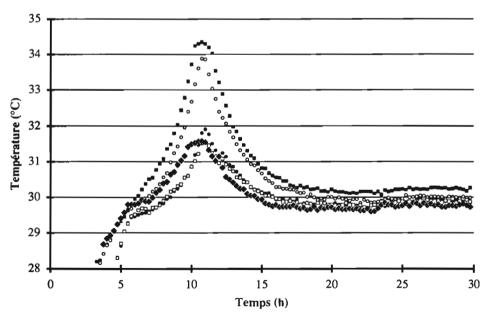


Fig. 8.4.- Variation de la température au cours de la fermentation à différentes positions dans le fermenteur pilote. ●: Centre à 10 cm d'hauteur; ○: Centre à 35 cm d'hauteur; ■: Centre à 60 cm d'hauteur; □: 3 cm de la paroi à 10 cm d'hauteur; ◆: 3 cm de la paroi à 60 cm d'hauteur.

8.4.2 Comparaison des bioréacteurs petits et moyens

Les résultats concernant les concentrations de sucres totaux, l'amidon, le maltose, le glucose (Fig. 8.5); l'éthanol et la biomasse formée (Fig. 8.6), le pH du milieu et la perte totale de poids des solides (Fig. 8.7), indiquent des variations semblables dans les fermenteurs moyens et petits.

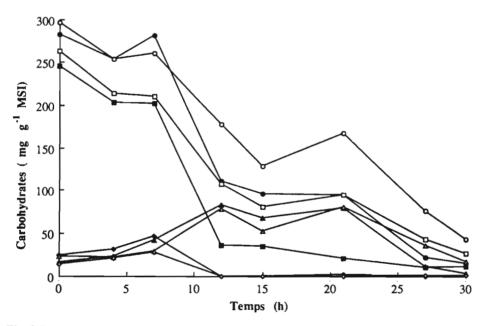


Fig. 8.5.- Evolution de la teneur en carbohydrates au cours de la fermentation. Les symboles pleins correspondant aux petits fermenteurs et les symboles vides correspondant au fermenteurs de taille moyenne. O et ●: Carbohydrates totaux; □ et ■: Amidon; et ◆: Maltose; et : Glucose.

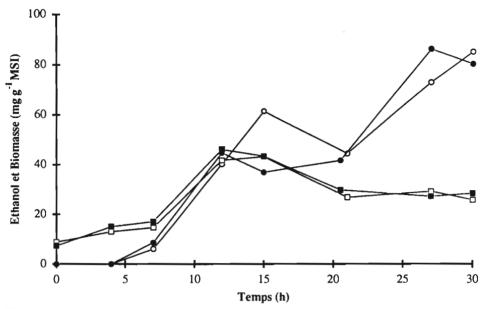


Fig. 8.6.- Evolution de la biomasse et de l'ethanol au cours de la fermentation. Les symboles pleins correspondant aux petits fermenteurs tandis que les symboles vides aux moyens. ○ et • : Ethanol; □ et ■ : Biomasse.

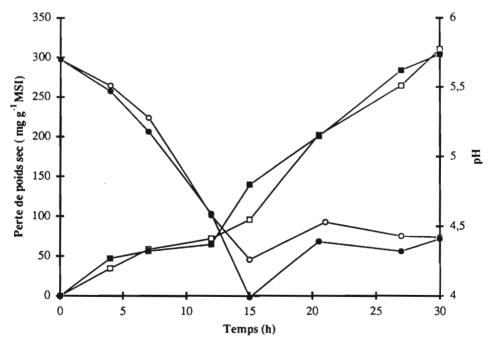


Fig. 8.7.- Variation de la perte de poids et du pH dans les fermentations menées en petits et moyens fermenteurs, respectivement. Les symboles pleins pour les petits fermenteurs et les vides pour les moyens. ○ et ● : pH; □ et ■ : Perte de poids sec.

8.4.3 Comparaison des bioréacteurs moyen, grand et pilote

Les concentrations en oxygène dans l'air de sortie pendant la phase aérobie initiale jusqu'à environ 14 h (figure 8.8) montre une tendance similaire en fonction du temps dans tous ces fermenteurs. Une légère différence est mise en évidence dans le plus gros fermenteur qui est limitée au stade qui précède le changement de métabolisme. Les concentrations en CO2 dans l'air de sortie (figure 8.9) sont similaires dans ces réacteurs, bien que la quantité de CO2 est légèrement plus élevée dans le plus gros des fermenteurs.

Les résultats présentés sur le tableau 8.3, indiquent des tendances similaires dans tous les fermenteurs utilisés en ce qui concerne le pH final, l'utilisation des sucres, le taux de croissance en phase aérobie, la concentration finale de biomasse, la perte de poids sec et les rendements en éthanol. Une différence notable est cependant observée dans le plus gros fermenteur en ce qui concerne les quatre derniers paramètres. Les résultats indiquent une formation de biomasse plus importante (Tableau 8.3) et des différences au niveau des concentrations en O2 et en CO2 dans l'air de sortie (figures 8.8 et 8.9). Le taux de croissance spécifique plus élevé dans le fermenteur pilote vient conforter l'hypothèse selon laquelle les conditions rencontrées dans le grand fermenteur sont plus favorables que celles des petits réacteurs. Des résultats similaires quant à la productivité ont été reportés dans tous les cas d'essais d'extrapolation (Scaling-up) au CFTRI de Mysore en Inde (GHILDYAL et coll.,1981). Le taux spécifique de croissance le plus fort en phase aérobie, la formation de biomasse la plus élevée et la productivité en éthanol la plus faible dans le fermenteur pilote comparés au fermenteur prototype indiquent que plus de substrat est utilisé pour la formation de biomasse dans le premier cas. Ceci est dû probablement au léger retard observé au moment du changement du métabolisme de la levure à 10 h de fermentation.

La similitude des résultats concernant les nombreuses variables physico-chimiques et les productivités dans toutes les tailles de fermenteur (figures 8.1-8.9; tableau 8.2, 8.3), malgré l'augmentation de la hauteur et du diamètre des bioréacteurs de même que l'augmentation du poids d'un facteur de 410, indique la validité de la formulation et la validation du critère d'extrapolation (Scaling-up) basé sur le maintien de la température et l'eau dans tous les fermenteurs testés. Le maintien efficace de ces bilans a pu être réalisé grâce à la recirculation des gaz de sortie après humidification.

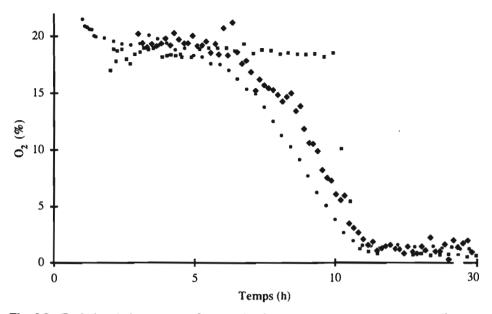


Fig. 8.8.- Evolution de la teneur en O_2 pour les fermenteurs moyens, prototype et pilote. \bullet : Moyen; \bullet : Protoptype; \blacksquare : Pilote.

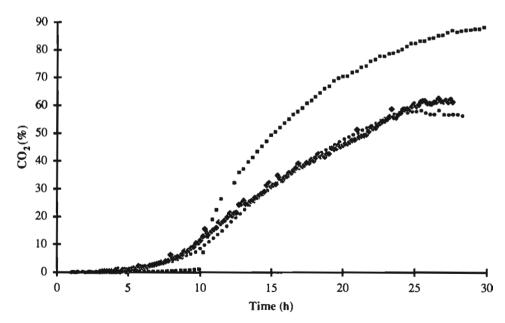


Fig. 8.9.- Variation de la concentration du CO2 dans le fermenteur moyen, prototype et pilote au cours de la fermentation. ullet: Moyen; ullet: Prototype; llet: Pilote.

Fermenteur	pH final	Matière séche finale (% p/p)	Utilisation du substrat (% p/p)	μ dans la phase aérobie (h·1)	Biomasse finale (mg g ⁻¹ MSI)	Perte de poids (% p/p)	Ethanol	
type							Teneur (mg g ⁻¹ MSI)	Rendement (% théorique)
Petit	4.4	18.0	94.6	ND	20.3	30.0	83.2	57.4
Moyen	4.5	17.5	89.0	0.43	18.5	26.1	88.5	61.2
Grand	4.3	18.1	96.3	0.43	19.7	24.6	109.3	62.5
Pilote	4.4	17.1	95,0	0.46	26.2	26.9	88.1	57.2

Par ailleurs, un système de contrôle informatisé pour la température-humidité a été développé avec succés par d'autres auteurs en FS ces dernières années (BARSTOW et coll., 1988; RYOO et coll., 1991). Ceci consiste en un programme informatisé avec des valeurs préétablies de température et humidité et de leur maintien par l'humidité relative dans le système. Ainsi le contrôle de la vitesse et de la température de l'air pulsé à travers le fermenteur permet l'évaporation régulée de l'eau. L'humidité relative de l'air d'entrée a été modifiée pour maintenir la teneur en eau des solides. En plus, la perte d'eau a été compensée par une vaporisation d'eau froide qui est contrôlée par un programme informatisé basé sur l'équation de bilan de l'eau dans le système. Ce système informatisé pour le maintien de la température et de l'humidité du milieu, sera plus valorisé au moment d'éliminer de grandes quantités de chaleur à l'échelle industrielle. La vitesse d'évaporation d'eau est connue pour être plus forte quand l'air d'entrée a une faible humidité. Donc l'utilisation d'air sec et la vaporisation d'eau sont très efficaces pour éliminer de grandes quantités d'eau par évaporation et pour le maintien du contenu en eau du milieu. Pourtant, ce système nécessite l'agitation des solides fermentés de façon intermittente du moins si l'eau est vaporisée. Cela représente un inconvénient car le mélange ralentit la croissance du champignon par compactage du substrat, en cassant le mycélium du substrat et en le détachant du support (GHILDYAL, et coll., 1981; RYOO et coll., 1991). De plus, le liquide en excès peut boucher les espaces entre les particules et gêner le transfert d' O2. Dans ces conditions il est intéressant de noter que ces problèmes ont été résolus efficacement en développant un bioréacteur oscillant dans lequel le substrat n'est pas perturbé pendant l'oscillation, mais dans lequel l'air et l'humidité sont parfaitement distribués.

8.5 Conclusion

Le critère d'extrapolation développé dans les études présentes est donc non seulement efficace et pratique, mais c'est aussi très simple. Son développement représente un grand intérêt scientifique et industriel. On peut le qualifier de premier critère scientifique d'extrapolation de la FS et il apporte une voie pour l'exploitation industrielle de la FS, qui est limitée par l'absence de critères scientifiques d'extrapolation (Scaling-up). Ces résultats fournissent donc une clé pour l'industrialisation des procédés de FS.

CONCLUSION GENERALE

9. CONCLUSION GENERALE

L'analyse bibliographique nous a montré que les applications concernant les cultures de champignons filamenteux en FS sont nombreuses mais sont encore très limitées pour les levures. Le domaine d'utilisation des levures concerne essentiellement la production d'alcool par FS, mais seules les souches de Saccharomyces spp ont été jusqu'à présent étudiées.

L'intérêt d'utiliser Schwanniomyces dans ces procédés réside dans le fait que son système amylolytique ainsi que sa capacité fermentaire sont très performants. De très nombreuses études ont été réalisées en FSm, mais les travaux concernant des applications de Schwanniomyces en FS sont plus rares.

Les matériaux amylacés représentent une énorme source de carbohydrates pour la production d'alcool par FS, mais une hydrolyse préalable de l'amidon est nécessaire avant le procédé de fermentation. L'utilisation des levures du genre *Schwanniomyces* semble donc être intéressante pour la conversion directe d'amidon en alcool par FS. A notre connaissance il n'existe aucune référence qui traite de l'utilisation de levures amylolytiques à capacité fermentaire pour la production d'alcool en FS. Aussi avons nous retenu cette approche comme support à nos travaux.

La maîtrise de l'environnement gazeux dans la FS a été un des outils les plus importants pour valoriser au mieux le potentialités de *Schwanniomyces* cultivé en milieu solide. A ce propos nous avons développé deux systèmes automatiques de suivi en temps réel des FS.

Ces deux systèmes d'analyse offrent un moyen technique fiable pour suivre le déroulement de la FS; ils permettent de connaître parfaitement bien l'état d'avancement de la culture en tout instant, sans pour autant perturber la fermentation.

Le premier système d'analyse utilise la chromatographie en phase gazeuse (CPG) permet de suivre le déroulement de plusieurs fermentations menées simultanément. Le deuxième système permet de mesurer et de contrôler la composition des gaz effluents du fermenteur. Ce dernier système recours à des analyseurs spécifiques de CO2 et d'O2.

Nous avons mis au point un bioréacteur prototype de FS qui permet d'étudier l'effet de l'en-

vironnement gazeux sur la croissance. Les différents modes de couplage entre le fermenteur prototype et les systèmes d'analyse développés, offrent la possibilité d'étudier l'influence des gaz aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose.

L'analyse des gaz, à l'aide des systèmes développés au cours de cette étude, s'est révélée comme l'outil le plus performant pendant l'adaptation de la culture de *Schwanniomyces* en FS. La maîtrise des conditions et de la composition du milieu de culture nous a permis de:

- Trouver le taux d'inoculation nécessaire pour implanter Schwanniomyces comme flore prédominante dans la FS.
- Démontrer la grande importance de la régulation du pH au cours de la FS de Schwanniomyces.
- Valider une méthode d'estimation du taux de croissance par la mesure du CO2

Les résultats obtenus nous ont permis d'entreprendre des recherches en vue d'étudier le contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castellii* en FS par l'environnement gazeux, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose.

En aérobiose, les rendements en biomasse ont été plus importants dans les fermenteurs ayant un taux d'aération élevé. Ces résultats nous ont amené à tester un système de régulation de la FS en conditions non limitantes en oxygène. Des rendements uniformes en biomasse aux différentes hauteurs du fermenteur ont été obtenus, en contrôlant le niveau de CO2 à 2% à la sortie du bioréacteur. Ce système de régulation est simple, efficace, et peut être extrapolé à tout système de fermentation en milieu solide.

Il est possible de transformer directement l'amidon en alcool au cours d'une fermentation solide de *Schwanniomyces*, comprenant une phase aérobie suivie d'une autre phase anaérobie.

A l'aide de plans d'expériences nous avons déterminé les conditions de culture permettant de s'assurer d'un rendement global de production d'alcool d'environ 60 % ainsi que d'un profil homo-fermentaire. Ceci a été possible en fixant la teneur en urée a 1,3 g/l, le pH initial à 5,7 ainsi qu'en assurant une aération pendant les dix premières heures de la fermentation.

182 Conclusion

Au cours de la culture de Schwanniomyces castellii en conditions mixtes d'aération, la phase en aérobiose assure la production d'amylases nécessaires à l'hydrolyse de l'amidon, tandis que pendant l'anaérobiose se réalise la production d'alcool. Le bilan matière indique que presque 40 % des carbohydrates totaux sont utilisés pendant la phase aérobie pour la production de biomasse tandis 60 % est transformé en alcool. L'utilisation globale de la source de carbone étant de 97 %. Le rendement de conversion en éthanol est de 94 % de la valeur théorique.

Par ailleurs, une description de la morphologie des cellules de *Schwanniomyces castellii* et leur type d'attachement sur la bagasse, utilisée comme support, a également été réalisée à l'aide de la microscopie électronique à balayage.

Le rôle essentiel de l'eau en FS, ainsi que l'importance de la disponobilité de l'oxygène pour l'utilisation de l'amidon a été confirmé au cours des essais dans le fermenteur prototype. Cependant, d'autres études sur l'amélioration de l'extraction d'alcool sont nécessaires, pour espérer un développement industriel du procédé.

Nous avons développé une méthodologie nouvelle pour l'extrapolation (Scale-up) des FS, basé sur la conservation des bilans chaleur et matière (eau). Ce critère a été testé jusqu'à un réacteur de 4.1 kg, représentant une augmentation d'un facteur 410 par rapport au réacteur le plus petit utilisé dans cette étude. Les productivités globales d'éthanol furent presque identiques dans les quatre réacteurs en colonne testés. L'obtention des même résultats dans tous les réacteurs, malgré les augmentations de diamètre et de hauteurs des fermenteurs, indique les fortes potentialités de ce simple critère d'extrapolation qui n'a jamais été utilisé précédemment dans aucun processus de FS.

Le critère d'extrapolation développé dans les études présentes est donc non seulement efficace et pratique, mais il est de plus très simple. Son développement représente un grand intérêt scientifique et industriel. On peut le qualifier de premier critère scientifique d'extrapolation de la FS, il apporte une voie pour l'exploitation industrielle de la FS, qui était jusqu'alors limitée par l'absence de critères scientifiques d'extrapolation (Scaling-up). Ces résultats fournissent donc une clé pour l'industrialisation des procédés de la FS.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'un début de valorisation par le biais de publications (SAUCEDO-CASTAÑEDA, et coll 1991 a-e).

REFERENCES

10. REFERENCES

- ABARCA D., FERNANDEZ-LOBATO M., CLAROS M.G., Del POZO L., JIMENEZ A. (1988) Cloning and expression in Saccharomyces cerevisiae an α-amylase gene from Schwanniomyces occidentalis, Yeast, 4, Spec Issue, 14th Conf. on yeast genetics and molecular biology, August.
- ABOUZIED M.M., REDDY A. (1986) Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of Aspergillus niger and Saccharomyces cerevisiae, Applied Environ. Microbiol., 52, 1055-1059.
- 3.- AHMED S.Y., LONSANE B.K., GHILDYAL N.P., RAMAKRISHNA S.V. (1987) Design of solid state fermentor for production of fungal metabolites on large scale, *Biotechnol. Techniques*, 1, 97-102.
- AIDOO K.E., HENDRY R., WOOD J.B. (1982) Solid substrate fermentation, Adv. in Applied Microbiol., 28, 201-237.
- ALAZARD D., RAIMBAULT M., (1981) Comparative study of amylolytic enzymes production by Aspergillus niger in liquid and solid-state cultivation, European J. Appl. Microbiol., 12, 113-117.
- 6.- AMIN G., De MOT R., VAN DIJCK K., VERACHTERT (1985) Direct alcoholic fermentation of starchy biomass using amylolytic yeast strains in batch and immobilized cell systems, Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 237-245.
- APAIRE V., GUIRAUD J.P., GALZY P. (1983) Selection of yeast for single cell protein production on media based on Jerusalem artichoke extracts, Z. Allg. Mikrobiol., 23, 211-218.
- 8.- AUGUSTIN J.A., KOCKOVA-KRATOCHVILOVA A., KUNIAK L. (1978) Production of α-amylase by yeasts and yeats-like organism, Folia Microbiologica, 23, 353-361.
- AURIA A., HERNANDEZ S, RAIMBAULT M., REVAH S. (1990) Ion exchange resin: a
 model support for solid state growth fermentation of Aspergillus niger, Biotechnol.
 Techniques, 4, 391-396.
- BAJRACHARYA R., MUDGETT R.E. (1980) Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice, Biotechnol. Bioeng., 22, 2219-2235.
- BANKS G.T. (1984) Scale-up of fermentation processes. Topics Enzyme Ferment. Biotechnol., 3, 170-266.
- BARRIOS GONZALEZ J., ANAYA S. (1987) Desarrollo de un sistema para el estudio de la germinacion de esporas de Aspergillus niger, Rev. Mex. Mic., 3, 9-18.
- BARRIOS-GONZALEZ J., TOMASINI A., VINIEGRA-GONZALEZ, LOPEZ J. (1988) Penicillin production by solid state fermentation, *Biotechnol. Letters*, 10, 793-798.
- 14.- BARRIOS-GONZALEZ J., MARTINEZ C., AGUILERA A., RAIMBAULT M. (1989) Germination of concentrated suspensions of spores from Aspergillus niger, Biotechnol. Letters, 11, 551-554.
- BARRIOS-GONZALEZ J., RODRIGUEZ G.M., TOMASINI A. (1990) Environmental and Nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava solid state fermentation, J. Ferment. Bioeng., 70, 329-333.

- 16.- BARSTOW L.M., DALE B.E., TENGERDY R.P. (1988) Evaporative temperature and moisture control in solid substrate fermentation, Biotechnol. Techniques, 2, 237-242.
- BERTHOLOMEW W.H.(1960) Scale-up of submerged fermentation, Adv. Appl. Microbiol., 2, 289-300.
- 18.- BEZENGER M.C. (1987) Incidence de l'azote sur le déroulement de la fermentation alcoolique en oenologie, Thèse de Doctorat, Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, 138 p.
- 19.- BLAHA G., PARIS N. (1987) Examen en microscopie électronique de l'aspect externe des cabosses du cacaoyer sianes ou infectées par Phytophtora megakarya. Café, Cacao et Thé, 31, 23-34.
- BOZE H., MOULIN G., GALZY P. (1987a) Influence of culture conditions on the cell yield and amylases biosynthesis in continuos culture by Schwanniomyces castellii, Arch. Microbiol., 148, 162-166.
- BOZE H., MOULIN G., GALZY P. (1987b) A comparison of growth yields from Schwanniomyces castellii and an alcohol dehydrogenase mutant, Biotechnol. Letters, 9, 461-466.
- 22.- BOZE H., GUYOT J.B., MOULIN G., GALZY P. (1988) Kinetics of the amyloglucosidase of Schwanniomyces castellii, Yeast, 7th Int. Symposium on Yeast, Spec. Iss.,117-123.
- BOZE H., GUYOT J.B., GALZY P. (1989) Isolation and characterization of a derepressed mutant of Schwanniomyces castellii for amylase production, Appl. Microbiol. Biotechnol, 31, 366-370.
- BRYAN W.L. (1990) Solid-state fermentation of sugars in sweet sorghum., Enzyme Microbiol. Technol., 12, 437-442.
- CALLEJA GB, LEVY-RICK S., LUSENA C.V., NASIM A., MORANELLI F. (1982a)
 Direct and quantitative conversion of starch to ethanol by the yeast Schwanniomyces
 alluvius, Biotechnol. Letters, 4, 543-547.
- 26.- CALLEJA G.B., LUSENA C.V., VELIKY I.A., MORANELLI F. (1982b) Conversion of carbohydrates to alcohol with certain yeasts, Brevet Canada, 1 238 592.
- CALLEJA G.B., LEVY-RICK S., MORANELLI F., NASIM A. (1984) Thermosensitive
 export of amylases in the yeast Schwaniomyces alluvius, Plant and Cell Physiol., 25, 757761.
- CALLEJA G.B., YAGUCHI M., LEVY-RICK S., SEGUIN J.R.H. (1986a) Single cell protein production from potato starch by the yeast Schwanniomyces alluvius, J. Ferment. Technol.,64, 71-75.
- CALLEJA G.B., NASIM A., LUSENA C.V., LEVY-RICK S. (1986b) Excretion of yeast amylases: requirement for oxygen and mitochondrial function., *Biochem. International*, 12, 81-87.
- CALLEJA G.B., LEVY-RICK S.R., NASIM A., LUSENA C.V. (1987) Extracellular amylases of starch fermenting yeats: pH effect on export and residence time in the periplasm, CRC Critical Rev. Biotechnol., 5, 177-184.
- CANNEL E., MOO-YOUNG M. (1980a) Solid-State Fermentation Systems (I), Process Biochem., June/July, 2-7.
- 32.- CANNEL E., MOO-YOUNG M. (1980b) Solid-State Fermentation Systems (II), *Process Biochem*. August/Septembre, 24-28.

- CAPRIOTTI A. (1957) New Blastomycetes isolated from soils of Spain I: Schwanniomyces
 castellii nov. esp., Arch. für Mikrobiologie, 26, 434-438.
- 34.- CHAHAL D.S. (1983) Growth characteristics of microorganisms in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignocelluloses and cellulase production. Blanch H.W., Paputsakis E.T., Stephanopoulos G. (Eds) Foundation of biochemical engineering kinetics ans thermodynamics in biological systems. ACS symposium series n° 207. American Chemical Society, Washington D.C., 421-442.
- 35.- CLEMENTI F., ROSSI J. (1986) α-amylase and glucoamylase production by Schwanniomyces castellii, Antonie van Leeuwenhoek, 52, 343-352.
- CLEMENTI F., ROSSI J., COSTAMAGNA L., ROSI J. (1980) Production of amylase(s) by Schwanniomyces castellii and Endomycopsis fibuligera, Antonie van Leeuwenhoek, 46, 399-405.
- COCHET N., NONUS M., LEBAULT J.M. (1988) Solid-state fermentation of sugar-beet, Biotechnol. Letters, 10, 461-496.
- 38.- DEBNATH S, BANNERJEE M., MAJUMDAR S.K. (1990) Production of alcohol from starch by immobilised cells of *Saccharomyces diastaticus* in batch and continuous process, *Process Biochem.*, April, 43-46.
- DE DEKEN R.H. (1966) The Crabtree effect: A regulatory system in yeast, J. Gen. Microbiol., 44, 149-156.
- DHAWALE M.R., INGLEDEW W.M. (1983) Starch hydrolysis by derepressed mutants of Schwanniomyces castellii, Biotechnol. Letters, 5, 185-190.
- 41.- DHAWALE M.R., INGLEDEW W.M. (1983) Interspecific protoplast fusion of Schwanniomyces yeasts, Biotechnol. Letters, 5, 825-830.
- DIEZ F., LOIS J.A. (1989) In Proceedings XX Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Sao Paulo, Brazil, 1. Thompson G. (Eds), Bandeirante S.A. Grafica e Editora, 301-305.
- 43.- DIXON T.F. (1988) Spontaneous combustion in bagasse stockpiles. Sugar J., 51, 14-16.
- 44.- DE MEO M., LAGET M., PHAN-TAN-LUU R., MATHIEU D., DUMENIL G. (1985) Application des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et des conditions de culture en fermentation, Bio-Sciences, 4, 17-20.
- DE MOT R, VAN OUDENDIJICKK E, VERACHERT H (1984) Production of extracellular debranching activity by amylolytic yeasts, Biotechnol. Letters, 6, 581-586.
- 46.- De MOT R., VAN DIJCK K., VERACHTERT H., DONKERS A. (1985) Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentation of starchy material with amylolytic yeasts, Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 222-226.
- 47.- DE MOT, R. (1990) Conversion of starch by yeast in Verachtert, H., and De Mot, R. (Eds.) Yeast Biotechnology and Biocatalysis', New York, Marcel Dekker, Inc.
- 48.- DE MOT R., VERACHTERT (1986) Enhanced production of extracellular alpha- amylase and glucoamylase by amylolytic yeas using Beta-cyclodextrin as carbon source, Appl. Microbiol. Biotechnol, 24, 459-462.
- DESFARGES C., LARROCHE C., GROS J.B. (1987) Spore production of *Penicillium roqueforti* by solid state fermentation: Stoichiometry, growth and sporulation behaviour, *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 1050-1058.

 DOELLE H.W. (1985) Biotechnology of Solid Substrate fermentation in the production of Food, ASEAN Food J., 1, 10-14.

187

- 51.- DOELLE B.M., MILLICHIP R.J., DOELLE H.W. (1989) Production of ethanol corn using inoculum cascading of *Zymomonas mobilis*, *Process Biochem.*, August, 137-140.
- 52.- DOSTALEK M., HAGGSTROM M.H. (1983) Mixed culture of Saccharomycopsis fibuliger and Zymomonas mobilis on starch-use of oxygen as a regulator, E. J. Appl. Microbiol. Biotech, 17, 269-274.
- 53.- DOWHANICK T.M., SCHERER S.W., WILLICK G., RUSSELL I., STEWART GG., SELI-GY V.L. (1988) Differential glucoamylase expression in *Schwanniomyces castellii* induced by maltose, *Can. J. Microbiol.*, 34, 262-270.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. (1956) Calorimetric method for determination of sugars and related subtances Analytical Chem. 28, 350-356.
- 55.- DUBREUCQ E., BOZE H., NICOL D., MOULIN G., GALZY P. (1989) Kinetics of the α-amylase of Schwanniomyces castellii, Biotechnol. Bioeng., 33, 369-373.
- 56.- DUFOUR D. (1990) Production de pectinases dans un milieu adsorbé sur bagasse, Contribution à l'étude de la physiologie des champignons pectolytiques, cultivés en milieu solide, en relation avec la respiration et la synthèse de pectinases. Thèse Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, 262 p.
- 57.- DURAND A., CHEREAU D. (1988) A new pilot reactor for solid state fermentation: application to the protein enrichment of sugar beet pulp, *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 476-486.
- 58.- DURAND D., PICHON P., DESGRANGES C. (1988) Approaches to Kla measurements in solid state fermentation, *Biotechnol. Techniques*, 2, 11-16.
- 59.- EDWARDS RL. (1977) In Hayes, W.A. (Ed) *Composting*. (London, UK: The mushroom Grower's Association).
- 60.- FINGER S.M., HATCH R.T. and REGAN T.M. (1976) Aerobic microbial growth in semisolid matrices: heat and mass transfer limitation., Biotechnol. Bioeng., 18, 1193-1218.
- FLOR P.Q., HAYASHIDA S. (1983) Saccharomyces uvarum inulyticus var, nov. a new high-concentration ethanol tolerant yeast from rice wine, Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 148-152.
- FRELOT D., MOULIN G., GALZY P. (1982) Strain selection for the purpose of alcohol production from starch substrates, Biotechnol. Letters, 4, 705-708.
- FUJIO Y., SUYANADONA P., ATTASAMPUNNA P., UEDA S. (1984) Alcoholic fermentation of raw cassava starch by Rhizopus koji without cooking, Biotechnol. Bioeng., 26, 315-319.
- 64.- FUKUSHIMA D. (1982) Koji as an important source of enzymes in the orient and its unique composite systems of proteinases and peptidases, Use of enzymes in food technology, Versailles, C.N.E.R.N.A. (C.N.R.S.), 381-388.
- 65.- GALZY P., MOULIN G., DEVOISIN P. (1989) Process for culture of an amylolytic yeast without sterilization and the yeast and foods produced, FSTA, 21, 185.
- 66.- GERVAIS P., BAZELIN C. (1986) Development of a solid substrate fermentor allowing the control of the substrate water activity, Biotechnol. Letters, 8, 191-196.

67.- GHILDYAL N.P., RAMAKRISHANA S.V., NIRMALA DEVI P., LONSANE B.K., AS-THANA H.N. (1981) Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation in: *J.Food Sci. Technol.*, 18, 248-251.

- 68. GIBBONS W.R. and WESTBY C.A., DOBBS T.L. (1984) A continuous, farm-scale, solid-phase fermentation process for fuel ethanol and protein feed production from fodder beets, *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1098-1107.
- 69. GIBBONS W.R. and WESTBY C.A. (1986) Effect of pulp pH on solid phase fermentation of fodder beets for fuel ethanol production, *Biotechnol. Letters*, 8, 657-662.
- 70.- GIBBONS W.R., WESTBY C.A. (1988) Technology and economics of ethanol production from fodder beets via solid-phase fermentation, *Biotechnol. Letters*, 10, 665-670.
- 71.- GIBBONS W.R., WETSBY C.A., ARNOLD E. (1988) Semicontinous diffusion fermentation of fodder beets for fuel ethanol and cubed protein feed production, *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 696-704.
- GIRAUD E., BRAUMAN A., KELEKE S., LELONG B., RAIMBAULT M. (1991) Isolation and physiological studies of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 379-383.
- 73.- GONZALEZ-BLANCO, SAUCEDO-CASTAÑEDA G. VINIEGRA-GONZALEZ G. (1990) Protein enrichment of sugar cane byroducts using solid-state cultures of Aspergillus terreus, J. Ferment. Technol., 70, 351-354.
- 74.- GRAJEK W. (1988) Cooling aspects of solid state cultures of mesophilic and thermophilic fungi, J. Ferment. Technol., 66, 675-679.
- GRANT G.A., HAN Y.W., ANDERSON A.W. (1978) Pilot-scale semisolid fermentation of straw, Applied Environ. Microbiol., 35, 549-553.
- GUIRAUD J.P., CAILLAUD J.M., GALZY P. (1982) Optimization of alcohol production from Jerusalem artichokes, European J. Appl. Microbiol., 14, 81-85.
- 77.- HANG Y.D., LEE C.Y., WOODAMS E.E. (1986) Solid state fermentation of grape pomace for ethanol production, *Biotechnol. Letters*, **8**, 53-56.
- 78.- HANG Y.D., WOODAMS E.E. (1987) Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in a solid state fermentation system, *Biotechnol. Letters*, 9, 183-186.
- HAYES W.A. (1977) In Hayes W.A. (Ed) Composting (London, UK: The Mushroom Grower's Association).
- 80.- HESSELTINE C.W. (1972) Solid State Fermentation, Biotechnol. Bioeng., 14, 517-532.
- HESSELTINE C.W. (1977a) Solid state fermentation part 1, Process Biochem., July/August, 24-27.
- HESSELTINE C.W. (1977b) Solid state fermentation part 2, Process Biochem., November, 29-32.
- HESSELTINE C.W. (1987) Solid State Fermentation An Overview, Int. Biodeterioration, 23, 79-89.
- 84.- HIMMELBLAU D.M. (1969) Process Analysis by Statistical Methods, John Wiley, New-York, 463 p.

- 85.- HORN C.H., DE KOCK A., DU PREEZ J.C., LATEGAN P.M. (1988) A comparative study of the amylolytic ability of *Lipomyces and Schwanniomyces* yeats species, *System. Appl. Microbiol.*, 10, 106-110.
- 86.- HOSHINO K., TANIGUCHI M., MARUMOTO H., FUJII M. (1990) Continuous ethanol production from raw starch using a reversibly soluble autoprecipitating amylase and flocculating yeast cells, *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 228-233.
- 87.- HOSHINO K., TANIGUCHI M., MARUMOTO H., FUJII M. (1989) Repeated batch conversion of raw starch to ethanol using amylase immobilized on a reversible soluble-autoprecipitating carrier and flocculating yeast cells., Agric. Biol. Chem., 53, 1961-1967.
- 88.- HOWARD J.J., WILDE R.J., CARTER A.T., KIRKHAM J.A. (1988) Amylolytic activities secreted by yeast of the genus *Schwanniomyces*, Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology, 14 th, 1 p.
- 89.- HUERTA OCHOA S. (1984) Efecto de la transferencia de masa y la acumulación del calor metabólico en la fermentación de cultivos sólidos, Tesis Maestría en Ciencias, Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, 147 p.
- 90. IIZUKAM., UENAKAI D., SVENDSBY O., YAMAMOTO T. (1985) Alcohol fermentation of green banana, *J. Ferment. Technol.*, 83, 475-477.
- 91.- INGLEDEW W.M. (1987) Schwanniomyces: A potential superyeast? CRC Critical Rev Biotechnol., 5, 159-176.
- 92.- INLOW D., MCRAE J., BEN-BASSAT A. (1988) Fermentation of corn starch to ethanol with genetically engineered yeast, *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 227-234.
- JALEEL S.A., SRIKANTA S., GHILDYAL N.P., LONSANE B.K. (1988) Simultaneous solid phase fermentation and saccharification od cassava fibrous residue for production of ethanol, Starch, 40, 55-58.
- 94.- KARGI F., CURME J.A. (1985) Solid State fermentation of sweet sorghum to ethanol in a rotary-drum fermentor, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1122-1125.
- KARGI F., CURME J.A., SHEEHAN J.J. (1985) Solid-State Fermentation of sweet sorghum to ethanol, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 34-40.
- **%.** KIRBY K.D. and MARDON C.J. (1980) Production of fuel ethanol by solid phase fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2425-2427.
- KLEIN R.D. and FAVREAU M.A. (1988a) Plasmid vectors for the transformation of Schwanniomyces occidentalis, Int. Conf. on yeast genetics and molecular biology, 14 th, 1.
- 98.- KLEIN R.D. and FAVREU M.A. (1988b) Transformation of Schwanniomyces occidentalis with an ADE2 gene cloned from S. occidentalis, J of Bacteriology, 170, 5572-5578.
- 99.- KNAPP J.S. and HOWELL J.A. (1980) Solid substrate fermentation, *Topics Enzyme Ferment. Biotechnol..*, Wiseman A. (Ed.), Vol. 4, John Wiley.
- 100.- KREGER VA RIJ (1984) The yeast, a taxonomic study, 3th Edition, Elsevier Science Pub., Amsterdam.
- 101.- KUMAR P.K.R. and LONSANE B.K. (1987a) Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid., Biotechnol. Letters, 9, 179-182.
- 102.- KUMAR P.K.R. and LONSANE B.K. (1987b) Gibberellic acid by solid state fermentation: consistent and improved yields., Biotechnol. Bioeng., 30, 267-271.

- 103.- KUROSAWA H., NOMURA N. and TANAKA H. (1989) Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of Aspergillus awamori and Saccharomyces cerevisiae, Biotechnol. Bioeng., 33, 716-723.
- 104.- LAI H.N., WANG H.H., CHANG F.W. (1989) Thermal diffusivity of solid mash of sorghum brewing: A solid state fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 1337-1340.
- 105.- LALUCE C., BERTOLINI M.C., ERNANDES J.R., MARTINI A.V., MARTINI A. (1988) New amylolytic yeast strains for starch and dextrine fermentation, Applied Environ. Microbiol., 54, 2447-2452.
- 106.- LARROCHE C., DESFARGES C., GROS J.B. (1986) Spore production of Penicillium roquefortii by simulated solid state fermentation, Biotechnol. Letters, 8, 453-456
- 107.- LARROCHE C., GROS J.B. (1989) Strategies for spore production by *Penicillium roquefortii* using solid state fermentation techniques, *Process Biochem.*, 97-103.
- 108.- LATEGAN P.M., BOTES P.J., ERASMUS S.C. and JOUBERT W.A. (1984) Production of ethanol by solid state fermentation of pineapple waste in: *Third European Congress on Biotechnology*, Verlag chemic, 2, Munchen 10-14 Sept., 241-246.
- 109.- LAUKEVICKS J.J., APSITE A.F., VIESTURS U.S., TENGERDY R.P. (1984) Solid state fermentation of wheat straw to fungal protein, *Biotechnol. Biotechnol.* 26, 1465-1474.
- 110.- LAUKEVICKS J.J., APSITE A.F., VIESTURS U.S., TENGERDY R.P. (1985) Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation of wheat straw, Biotechnol. Bioeng., 27, 1687-1691.
- 111.- LEE J.H., PAGAN R.J., ROGERS P.L. (1983) Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zymomonas mobilis.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 659-669.
- 112.- LEE S.Y., YONG CHUL SHIN, HYONG SOO KIM, SI MYUNG BYUNG (1985) Ethanol fermentation of on cooked cassava starch, *J. Ferment. Technol.*, 63, 51-56.
- 113.- LEHNINGER A.L (1975) Biochimie, 2éme ed. Flammarion Médecine Sci., Paris, 834 p.
- 114.- LERMINET P. (1987) Converting starch to ethanol in single reaction, Brevet France n° 2 586 701, mars 6.
- 115.- LONSANE B.K., GHILDYAL N.P., BUDIATMAN S., RAMAKRISHNA S.V. (1985) Engineering aspects of solid state fermentation, Enzyme Microbiol. Technol., 7, June, 258-265.
- 116.- LONSANE, B.K. and RAMESH, M.V. (1990) Production of bacterial thermostable α-amy-lase by solid state fermentation: A potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolyssis. Adv. Appl. Microbiol., 35, 1-56.
- 117.- LONSANE B.K., DURAND A., RENAUD R. ALMANZA S., MARATRAY J., DES-GRANGES C., CROOKE P.S., HONG K., MALANEY C.W., TANNER R.D. (1991a) Reactor design. Doëlle H.W., Mitchell DA., Rolz C.W. (Eds) Solid substrate cultivation. Elsevier Science Publishers, Essex, England, in press.
- 118.- LONSANE B.K., GHILDYAL N.P., RAMAKRISHNA M. STUTZENBERGER F. (1991b) In solid substrate cultivation, Doëlle H.W., Mitchell D.A., Rolz C.E. (Eds), Elsevier Science Publishers, Essex. Sous presse.
- 119.- LONSANE B.K., SAUCEDO-CASTANEDA G., RAIMBAULT M., ROUSSOS S., VINIE-GRA-GONZALEZ G., GHILDHYAL N.P., RAMAKRISHNA M., KRISHAIAH M.M. (1991c) Scale-up, strategies for solid state fermentation system: state of the art, Process Biochem., Soumis.

- 120.- LOWRY O.H. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol.Chem., 193, 265-275.
- 121.- LUSENA C.V., CHAMPAGNE C.C., CALLEJA G.B. (1985) Secretion and export of amylolytic activities in Schwanniomyces alluvius, Can. J. Biochem. Cell Biol., 63, 366-371.
- 122.- MALFAIT M.H. (1986) Mise en evidence et étude des problèmes liés a la fermentation de l'amidon par une souche de levure : Schwanniomyces castellii syn. Occidentalis, Thèse Docteur-Ing., Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, France, 154 p.
- 123.- MALFAIT M.H., MOULIN G., GALZY P. (1986) Ethanol inhibition of growth, fermentation and starch hydrolysis in Schwanniomyces castellii, J. Ferment. Technol., 64, 279-284.
- 124. MARTINI A., MARTINI V.A.E., MILLER M.W. (1975) Protein content and aminoacid composition of the yeasts Saccharomyces uvarum, Schwanniomyces castellii, Saccharomyces ludwigii, Pichia membranaefaciens and Lipomyces starkeyi, Annali della facoltá di Agraria, Universitá di Perugia, 30, 571-577.
- 125.- MARTINI V.A.E., MARTINI A (1976) Valutazzione del l'attitudine di alcune specie di lievito a produrre proteina unicellulare, Annali della facolta di agraria, Universitá degli studi di Perugia, 31, 443-455.
- 126. MARTINI A, MARTINI AE, MILLER MW (1979) Variations of cellular nitrogen components of different yeasts during growth, J. Sci. Food Agric., 30, 1012-1014.
- 127.- MENEZES T.J.B., FIGUEIREDO, I.B., STRASSER J. (1972) Proteina monocelular de levaduras amilolíticas *Coletânea di ITAL*, 4, 109-115.
- 128.- MILLER G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, Anal. Chem., 31,426-428.
- 129.- MITCHELL D.A., LONSANE B.K. (1991) Definition, types and characteristics. Doëlle H.W., Mitchell D.A., Rolz C.W. (Eds) Solid substrate cultivation. Elsevier Science Publishers, Essex, England, in press.
- 130.- MOLINA R., ABRIL A., HERNANDEZ A., RODRIGUEZ L. AGUERO C. (1983) in Proceedings XVIII Congress International Society of Sugar Cane Technologists, Habana, Cuba, 3, Rivero, D.C. and Tagle (L. Eds), José Marti Publishing House, Habana 4, Cuba, 1462-1476.
- 131.- MONICA I., TAGLE M.A. (1974) Estimation of protein in yeast, J. Sci. Food Agric., 25, 461-464.
- 132.- MOO-YOUNG M., MOREIRA A.R. et TENGERDY R.P. (1983) Principles of solid-substrate fermentation, The filamentous fungi. Fungal technology/ Ed. by Smith J.E., Berry D.R., Kristiansen B. London, Edward Arnold Publisher. 4, 117-144.
- 133.- MOREAU C. (1980) 'Moisissures Toxiques dans l'Alimentation', Paris, France: Massonand Co., 215 p.
- 134.- MORESI M., MEDIC1 R. (1989) Kinetics of potato starch fermentation by Schwanniomyces castellii, Bioprocess engineering, 4, 201-208.
- 135.- MORESI M., SOLINAS M.A., MATTEUCCI S. (1983) Investigation on the operating variables of potato starch fermentation by Schwanniomyces castellii, European J. Appl. Microbiol., 18, 92-99.

- 136.- MORI Y., INABA T. (1990) Ethanol production from starch in a pervaporation membrane bioreactor using Clostridium thermohydrosulfuricum, Biotechnol. Bioeng., 36, 849-853.
- 137.- MUDGETT R.E. (1980) Controlled gas environment in industrial fermentations, *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2, October, 273-279.
- 138.- MUDGETT R.E. (1986) Solid-state fermentation. in Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Ed. by Demain A.L., Solomon N.A., Washington, American society for microbiology, 66-84.
- 139.- NARAHARA H., KOYAMA Y., YOSHIDA T., PICHANGKURA S., UEDA (1982) Growth and enzyme production in a solid-state culture of Aspergillus oryzae, J. Ferment. Technol., 69, 311-319.
- 140. NARAHARA H., KOYAMA Y., YOSHIDA T., ATTHASAMPPUNNA P., TAGUCHI H. (1984) Control of water content in a solid-state culture of Aspergillus oryzae, J. Ferment. Technol., 62, 453-463.
- 141.- NAM K. D. MEUNG HO CHOI, WOON SIK KIM, HAE SUNG KIM, BEUNG HO RYU (1988) Simultaneous saccharification and alcohol fermentation of unheated starch by free, immobilized and coimmobilized systems of glucoamylase and Saccharomyces cerevisiae, J. Ferment. Technol., 66, 427-432.
- 142.- NAVARRO J.M. (1980) Levure immobilisées, croissance et métabolisme, fermentation alcoolique, Thèse Doct. es. Sci., Université P. Sabatier, Toulouse, France, 243 p.
- 143.- NICOL D. (1987) Contribution à l'étude du métabolisme de l'amidon chez Schwanniomyces castellii syn. Occidentalis Klocker, Thèse Docteur-Ingénieur, Ecole National Superieure Agronomique de Montpellier, France, 172 p.
- 144.- NISHIO N., NAGAI S., TAI K. (1979) Hydrolase production by Aspergillus niger in solid-state cultivation, European J. Appl. Microbiol., 8, 263-270.
- 145.- OKAZAKI N., SUGAMA S. (1979) A new apparatus for automatic growth estimation of mold cultured on solid media, J. Ferment. Technol., 57, 413-417.
- 146.- ORIOL E. (1987) Croissance de Aspergillus niger sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau, Thèse de Doctorat Microbiologie, Institut National Sciences Appliquées de Toulouse, France, 133 p.
- 147.- ORIOL E., CONTRERAS R., RAIMBAULT M. (1987) Use of microcalorimetry for monitoring the solid state culture of Aspergillus niger, Biotechnol. Techniques, 1, 79-84.
- 148. ORIOL E., RAIMBAULT, ROUSSOS S., VINIEGRA-GONZALEZ G. (1988 a) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by Aspergillus niger, Appl. Microbiol. Biotechnol, 27, 498-503.
- 149.- ORIOL E., SCHETTINO B., VINIEGRA-GONZALEZ G., RAIMBAULT M. (1988 b) Solid state culture of Aspergillus niger on support, J. Ferment. Technol., 66, 57-62.
- 150.- OTENG-GYANG K. (1979) Etude de levures amyloytiques en vue de production de proteines d4 organismes unicellulaires, Thèse Doct. 3ème Cycle, Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, 120 p.
- 151.- OTENG-GYANG K., MOULIN G., GALZY P. (1980a) Effect of medium composition on excretion and biosynthesis of the amiylases of Schwanniomyces castellii, European J. Appl. Microbiol., 9, 129-132.

- 152.- OTENG-GYANG K., MOULIN G., GALZY P. (1980b) Influence of amylase excretion on biomass production by amylolytic yeasts, *Acta Microbiol Acad. Sci. Hung*, 27, 155-159.
- 153.- OTENG-GYANG K., MOULIN G., GALZY P. (1981) A study of the amylolytic system of Schwanniomyces castellii, Z. Allg. Mikrobiol., 24, 537-544.
- 154.- PARK Y.K., SATO H.H., SAN MARTIN E., CIACCO F. (1987) Production of ethanol from extruded degermed corn gritts by a nonconventional fermentation method., *Biotechnol. Letters.*, 9, 143-146.
- 155.- PASARI A.B., KORUS R.A., HEIMSCH R.C. (1988) Kinetics of the amylase system of Schwanniomyces castellii, Enzyme Microbiol. Technol., 10, 156-160.
- 156.- PHAFF H.J., MILLER M.W. (1984) The yeast, a taxonomic study / Ed. by Kreger-van Rij N.J.W., Genus 26. Schwanniomyces Klöker, p. 423-426, 1984 Elsevier Science Pub., 3th Edition Amsterdam.
- 157.- PIRT J.S. (1975) Principles of microbe and cell cultivation, Blackwell scientific publications, Oxford U.K., 274 p.
- 158.- POINSOT C., BOZE H., MOULIN G., GALZY P. (1986) Respiratory pathways in Schwanniomyces castellii, Biology of the Cell, 58, 65-70.
- 159.- POINSOT C., MOULIN G., CLASSE M, GALZY P. (1987) Isolation and characterization of a mutant of Schwanniomyces castellii with altered respiration, Antonie van Leeuwenhoek, 57, 65-75.
- 160.- RAIMBAULT M. (1980) Fermentation en Milieu Solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé, Thèse Doct. es Sci., Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 291 p.
- 161.- RAIMBAULT M., ALAZARD D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation, European J. Appl. Microbiol., 9, 199-209.
- 162.- RAIMBAULT M., GIRAUD E., SAUCEDO-CASTAÑEDA G., SOCCOL C.R. (1991) Valorización de la Yuca a través de la fermentación en 'Avances sobre almidón de yuca', Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- 163.- RALPH B.J. (1976) Solid Substrate fermentations. Food Techn. Aust. 28, 247-251.
- **164.-** RAMESH M.V., LONSANE B.K. (1987) A novel bacterial thermostable alpha- amylase system produced under solid state fermentation, *Biotechnol. Letters*, **9**, 501-504.
- 165.- RAMESH, M.V. and LONSANE, B.K. (1989) Solid state fermentation for production of higher titres of thermostable α-amylase with two peaks for pH optima by Bacillus licheniformis M27. Biotechnol. Letters , 11, 149-152.
- 166.- RAMESH, M.V. and LONSANE, B.K. (1990) Critical importance of moisture content in α-amylace production by Bacillus licheniformis H27 in SSF, Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 501-505.
- 167.- RAMESH M.V. and LONSANE B.K. (1991) Regulation of α-amylase production in *Bacillus licheniformis* M27 by enzyme end-products in submerged fermentation and its overcoming in solid state fermentation system, *Biotechnol. Letters*, 13, 355-360.
- 168.- RAMESH M.V. (1990) Production of bacterial thermostable α-amylase of *Bacillus licheniformis* M 27 under solid state fermentation. Ph. D. Thesis, CFTRI, Mysore, India.

169.- RAMSTACK J.M., LANCASTER E.B., BOTHAST R.J. (1979) Gas chromatographic headspace analysis of solid substrate fermentations, *Process Biochem.*, February, 2-4.

- 170.- RATHBUN B.L., SHULER M.L. (1983) Heat and mass transfer effects in static-substrate fermentations chambers, *Biotechnol. Bioengeneering*, 25, 929-938.
- 171.- REVAH S., LEBEAULT J.M. (1988) Cheese flavours by solid state fermentation, Procedings of Solid State Fermentation in bioconversion of agro-industrial raw materials OR-STOM Montpellier, 25-27 July, 53-61.
- 172.- RHEE S.K., LEE G.M., KIM C.H., ABIDIN Z., HAN M.H. (1986) Simultaneous sago starch hydrolysis and ethanol production by *Zymomonas mobilis* and glucoamylase., *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 17, 481-493.
- 173.- RHODES R.A., NORTON W.L. (1975) Solid substrate fermentation of feedlot waste combined with feed grains, *Transactions of the ASAE*,728-733.
- 174.- ROSSI J., CLEMENTI F. (1985) Protein production by Schwanniomyces castellii on starchy substrates, in liquid and solid cultivation, J. of Food Technology, 20, 319-330.
- 175.- ROTTENBACHER L., SCHOBLER M., BAUER W. (1987) Modelling a solid state fluidized bed fermenter for ethanol production with S. cerevisiae, Bioprocess Eng., 2, 25-31.
- 176.- ROUSSOS S. (1982) Mise au point d'une méthode pour l'étude des caractères morphologiques biochimiques et nutrionnels des champignons imparfaits, Cah. O.R.S.T.O.M. sér. Biol., 45, 25-34.
- 177.- ROUSSOS S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases, Thèse Doct. ès Sci., Université de Provence, France, 193 p.
- 178.- ROUSSOS S., OLMOS A., RAIMBAULT, M., SAUCEDO-CASTAÑEDA G., LONSANE B.K. (1991) Strategies for large scale inoculum for SSF system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*, *Biotechnol. Techniques*, 5, 415-420.
- 179.- RYOO D., MURPHY V.G., KARIM M.N., TENGERDY R.P. (1991) Evaporative temperature and moisture control in a rocking reactor for solid substrate fermentation, *Biotechnol. Techniques*, 5, 19-24.
- 180.- SANCHEZ J.E. (1983) Etude de la fermentation du cacao "Essai de deux techniques nou-velles", Thèse Ing. Doct., Ecole National Superieure Agronomique de Montpellier, France, 163 p.
- 181.- SANGLIER J.J. (1977) Contribution à l'étude de la différentiation conidienne chez *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., Thèse Doct. 3ème cycle, Université de Clermont II, France, 99 p.
- 182.- SATO K., NAGATANI M., SATO S. (1982) A method of supplying moisture to the medium in a Solid State Culture with forced aeration, J. Ferment .Technol., 60, 607-610.
- 183.- SATO K., NAGATANI M., NAKAMURA K., SATO S. (1983) Growth estimation of Candida Lipolytica from oxygen uptake in a solid state fermentation with forced aeration, J. Ferment. Technol., 61, 623-629.
- 184.- SATO K., NAKAMURA K., SATO S. (1985) Solid-State Ethanol Fermentation by means of inert gas circulation, Biotechnol. Bioeng., 27, 1312-1319.
- 185.- SATO K., YOSHIZAWA K. (1988) Growth and growth estimation of Saccharomyces cerevisiae in solid state ethanol fermentation, J. Ferment. Technol., 66, 667-673.

- 186.- SATO K., MIYAZAKI S.I., MATSUMOTO N, YOSHIZAWA K., NAKAMURA K.I. (1988) Pilot-Scale Solid state ethanol fermentation by inert gas recirculation using moderately thermophilic yeast, J. Ferment. Technol., 66, 173-180.
- 187.- SAUCEDO-CASTAÑEDA J.G. (1987) Contribución al estudio de la fermentación sólida: Enriquecimiento proteico y conservación por ensilaje, Tesis Maestría en Ciencias Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, 169 p.
- 188.- SAUCEDO-CASTAÑEDA, GONZALEZ P., REVAH S. VINIEGRA G., RAIMBAULT M. (1990a) Effect of lactobacilli inoculation on Cassava (*Manihot esculenta*) Silage: fermentation pattern and kinetic analysis J. Sci. Food Agric., 50, 467-477.
- 189.- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., GUTIERREZ-ROJAS M., BACQUET G., RAIMBAULT M., VINIEGRA-GONZALEZ (1990b) Heat transfer simulation in solid substrate fermentation., *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 802-808.
- 190.- SAUCEDO-CASTAÑEDA G. RAIMBAULT M. VINIEGRA-GONZALEZ G. (1990c) Energy of activation in cassava silages., J. Sci. Food Agric., 53, 559-562.
- 191.- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., DUFOUR D., TREJO M., SOCCOL R.C., ROUSSOS S., RAIMBAULT M. (1991a) On line gaz analysis in Solid State Fermentation at FENABIO BI-OLATINA 91, São Paulo, Brazil, 6-10 July.
- 192.- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., LONSANE B.K., KRISHNAIAH M.M., NAVARRO J.M., ROUSSOS S., RAIMBAULT M. (1991b) Maintenance of heat and water balances as a scale-up cririon for production of ethanol by Schwanniomyces castellii in solid state fermentation system. Process Biochem. Sous presse.
- 193.- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., LONSANE B.K., NAVARRO J.M., ROUSSOS S., RAIMBAULT M. (1991c). Control of carbon dioxide in exhaust air as a method far equal biomass of yields at different bed heights in column fermenter, Appl. Microbiol. Biotechnol., soumis.
- 194.- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., LONSANE B.K., NAVARRO J.M., ROUSSOS S., RAIMBAULT M. (1991d) Potential of using a single fermenter for biomass built-up, starch hydrolysis and ethanol production: Solid state fermentation system involving Schwannio-myces castellii, Appl. Biochem. Biotechnol.. Soumis.
- 195.- SAUCEDO-CASTANEDA G., LONSANE B.K., NAVARRO J.M., ROUSSOS S., RAIMBAULT M. (1991e) Critical importance of medium pH in solid state fermentation system for growth of Schwanniomyces castellii., Appl. Biochem. Biotechnol. Soumis.
- 196.- SENTRACHEM (1986) Amylolytic enzyme producing microorganisms, constructed by recombinant DNA technology, and their use in fermentation processes, Brevet Allemagne, 0 257 115, 21 août 1986. 252
- 197.- SILLS A.M., STEWART G.G. (1982) Production of amylolytic enzymes by several yeast species, *J. Inst. Brew.*, **88**, 313-316.
- 198.- SILLS A.M., RUSSEL I., STEWART G.G. (1983a) Production et utilisation d'amylases de levure en fabrication de biére a faible teneur en glucides, *Bios*, 14, avril, 13.
- 199.- SILLS A.M., RUSSEL I., STEWART G.G. (1983b) The production and use of yeast amylase in the brewing of low carbohydrate beer in: Yeast, EBC 19th Congress London, 89, 140.
- 200.- SILLSA.M., SAUDER M.E., STEWART G.G. (1983c) Amylase activity in certain yeasts and a fungal species, Dev. Ind. Microbiol., 24, 295-303.
- 201.- SILLS A.M., SAUDER M.E., STEWART G.G. (1984a) Isolation and characterisation of the amylolytic system of Schwanniomyces castellii, J. Inst. Brew., 90, 311-314.

- 202.- SILLS A.M., ZYGORA P.S.J., STEWART G.G. (1984b) Characterization of Schwanniomyces castellii mutants with increased productivity of amylases, Appl. Microbiol. Biotechnol, 20, 124-128.
- 203.- SILLS A.M., STEWART G.G. (1985) Studies on cellobiose metabolism by yeast, Dev. Ind. Microbiol., 26, 527-534.
- 204.- SILLS A.M., PANCHAL C.J., RUSSEL I., STEWART G.G. (1987) Production of amylolityc enzymes by yeasts and their utilization in brewing, CRC Critical Rev Biotechnol., 5, 105-115.
- 205.- SILLS AM, STEWART GG (1987) Schwanniomyces castellii strains and brewing process Etats Unis, USA Patent Number 4 676 986.
- 206.- SILMAN R.W., CONWAY H.F., ANDERSON R.A., BAGLEY E.B. (1979) Production of aflatoxin in corn by a large scale solid substrate fermentation process, *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1799-1808.
- 207.- SILMAN R.W. (1980) Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 411-420.
- 208.- SIMOES-MENDES B. (1984) Purification and characterization of the extracellular amylases of the yeast Schwanniomyces alluvius, Can. J. Microbiol., 30, 1163-1170.
- 209.- SMITH B.W., ROE J.M. (1957) Micromodification of the Smith and Roe method for the determination of amylase in body fluids, J. Biol. Chem., 227, 357-362.
- 210.- SRIKANTA S., JALEEL S.A., SREEKANTIAH K.R., (1987) Production of ethanol from tapioca (Manihot esculenta, Crantz), Starch/Stärke, 39, 132-135.
- 211.- STEINKRAUS K.H. (1984) Solid-state (solid substrate) food/beverage fermentations involving fungi. Acta Biotechnol., 4, 83-88.
- 212.- STEWART G.G. (1984) Yeast as an industrial microorganism and as a experimental eucaryote, *Dev. Ind. Microbiol.*, 25, 183-193.
- 213.- STEWART G.G., PANCHAL C.J., RUSSELL I., SILLS A.M. (1984) Biology of ethanol producing microrganism, CRC Critical Rev Biotechnol., 1, 161-188.
- 214.- SUGAMA S., OKAZAKI N. (1979) Growth estimation of Aspergillus oryzae cultured on solid media, J. Ferment. Technol., 57, 408-412.
- 215.- TANAKA H., KUROSAWA H., MURAKAMI H. (1986) Ethanol production from starch by a Coimmobilized mixed culture system of Aspergillus awamori and Zymomonas mobilis., Biotechnol. Bioeng., 28, 1761-1768.
- 216.- TANNER R.D., WEI C.J., WOODWAND (1980) The development of a semi-solid fermentation system for the production of lysine-enriched yeast and ethanol in: Advances in Biotechnol., I. Moo-Young M., Ed., Proceedings of the 6th Int., Fermentation Symp., London, Canada.
- 217.- TENGERDY R.P. (1985) Solid substrate fermentation, Trends in Biotechnol., 3, 96-99.
- 218.- TOUZI A., PREBOIS J.P., MOULIN G., DESCHAMPS F., Galzy P. (1982) Production of food yeast from starchy substrates, European J. Appl. Microbiol., 15, 232-236.
- 219.- TREJO HERNANDEZ M. (1986) Produción de enzimas pécticas por fermentación en cultivo sólido, Tésis de licenciatura, Universidad Autonoma de México, 106 p.

- 220.- TRILLI A. (1986) Scale-up of fermentations, In Demain A.L., Solomon N.A. (Eds) Industrial Microbiology and Biotechnol. (Washington DC, USA: American society for Microbiology).
- 221.- ULMER D.C., TENGERDY R.P., MURPHY V.G. (1981) Solid-state fermentation of steam-treated feedlot waste fibers with *Chaetomium cellulolyticum*.. *Biotechnol. Bioeng., Symp.* 11, 449-461.
- 222.- UNDERKOFLER L.A., SEVERSON G.M., GOERING K.J., CHRISTENSEN L.M. (1947) Commercial production and use of mold bran. *Cereal Chem.*, 24, 1-22.
- 223.- VACCARINO C., LO CURTO R., TRIPODO M.M., PATANE R., LAGANA G., SCHACHTER S. (1989) SCP from orange peel by fermentation with fungi Submerged and 'surface' fermentations. *Biological Wastes*, 29, 279-287.
- 224.- VAN HAECHT J.L., DE BREMAEKER M., ROUXHET P.G. (1984) Immobilization of yeast by adhesion to a support without use of a chemical agent, *Enzyme Microbiol. Technol.*, 6, 221-227.
- 225.- VIESTURS U.E., STRIKAUSDA S.V., LEITE M.P., BERZINS A.J., TENGERDY R.P. (1987) Combined submerged and solid substrate fermentation for the bioconversion of lignocellulose, *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 282-288.
- 226.- WANG D.I.C., COONEY C.L., DEMAIN A.L., DUNNILL P., HUMPHREY A.E., LILLY M.D. (1989) Fermentation and Enzyme Technology, New-York USA: John Wiley and Sons.
- 227.- WANG H.L., SWAIN E.W., HESSELTINE C.W. (1975) Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh fermentation, *J. Food Sci.*, 40, 168.
- 228.- WELLER C.L., STEINBERG M.P., ORDDA E.D. (1983) Fuel ethanol from raw corn by Aspergillus hydrolysis with concurrent yeast fermentation, Biotechnol. Bioeng., 13, 437 447.
- 229.- WILSON J.J., INGLEDEW W.M. (1982) Isolation and characterization of Schwanniomyces alluvius amylolytic enzymes, Applied Environ. Microbiol., 44, 301-307.
- 230.- WILSON J.J., KHACHATOURIANS G., INGLEDEW W.M. (1982a) Protoplast fusion in the yeastSchwanniomyces alluvius, Mol. Gen. Genet., 186, 95-100.
- 231.- WILSON J.J., KHACHATOURIANS G.G., INGLEDEW W.M. (1982b) Schwanniomyces: SCP and ethanol from starch, Biotechnol. Letters, 4, 333-338.
- 232.- YANG S.S., LING M.Y. (1989) Tetracycline production with sweet potato residue by solid state fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 1021-1028.
- 233.- YANG S.S. (1988) Protein enrichment of sweet potato residue with amylolytic yeasts by solid state fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 886-890.
- 234.- ZAIRE R. (1986) Essais de fermentation alcoholique direct de farines et de grains broyés de blé par Schwanniomyces castellii, Diplôme d'Etudes Approfondies, Sciences des Aliments, Nutrition et Fermentation, Université Montpellier II Sciences Techniques du Languedoc, 49 p.
- 235.-ZAIRE R., MOULIN G., GALZY P. (1988) Fermentation of wheat grain by Schwanniomyces castellii, Biomass, 15, 175-185.
- 236.- ZADRAZIL F. (1975) Influence of CO2 concentration the mycelium growth of three Pleurotus species. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol, 1, 327-335.

ANNEXE

PROGRAMME D'ECHANTILLONNAGE DES GAZ DE LA FS

TEST DE CONNEXION DES VANNES ET FERMETURE DE TOUTES LES VANNES

```
FOR I=1 TO 4
MSG(I,"
NEXT I
MSG(1, "TEST DE VANNES")
FOR 1 =1 TO 8
OUT(1.1)
DELAY(1)
OUT(I,0)
NEXT
FOR 1 = 1 TO 8
OUT (1,1)
DELAY(1)
OUT(I,0)
NEXT
FOR ISITO4
MSG(I,
NEXT 1
ENL
```

PROGRAMME D'ECHANTILLONNAGE DES FERMENTEURS

```
FOR I=1 TO 8
OUT ( I, O )
NEXT
MSG(1, "Programme injection") "
MSG(2, "sur 8 canaux lanc")
OUT (1,1)
MSG(3, "Purge canal 1")
DELAY(60)
10 MSG(4, "Analyse canal 1")
METHOD(1,C1)
INJECT(1,,1)
UNTIL IN(1)=1
DELAY(15)
MSG(3, "Purge canal 2")
OUT (1,0)
OUT (2.1)
WAIT(1)
MSG(4, "Analyse canal 2")
METHOD(1,C2)
INJECT(1,,1)
D\mathbf{0}
UNTIL IN(1)=1
DELAY(15)
MSG(3, "Purge canal 3")
OUT(2,0)
OUT (3,1)
WAIT(1)
MSG(4, "Analyse canal 3")
METHOD(1,C3)
INJECT(1,,1)
DO
UNTIL IN(1)=1
```

```
DELAY(15)
MSG(3, "Purge canal 4")
OUT(3,0)
OUT (4,1)
WAIT(1)
MSG(4, "Analyse canal 4")
METHOD(1,C4)
INJECT(1,,1)
DO
UNTIL IN(1)=1
DELAY(15)
OUT (4,0)
OUT (5,1)
WAIT(1)
MSG(4, "Analyse canal 5")
METHOD(1,C5)
INJECT(1,,1)
DO
UNTIL IN(1)=1
DELAY(15)
MSG(3, "Purge canal 6")
OUT (5,0)
OUT (6.1)
WAIT(1)
MSG(4, "Analyse canal 6")
METHOD(1,C6)
INJECT (1,,1)
DO
UNTIL IN(1)=1
DELAY(15)
MSG(3, "Purge canal 7")
DUT (6,0)
OUT (7,1)
WAIT(1)
MSG(4, "Analyse canal 7")
METHOD(1,C7)
INJECT(1,,1)
UNTIL IN(1)=1
DELAY(15)
MSG(3, "Purge canal 8")
DUT(7,0)
OUT (8,1)
WAIT(1)
MSG(4, "Analyse canal 8")
METHOD (1,C8)
INJECT(1,,1)
DΩ
UNTIL IN(1)=1
DELAY(15)
MSG(3, "Purge canal 1")
OUT(8,0)
OUT(1,1)
WAIT(1)
GOTO 10
```

LOGICIEL DE PILOTAGE

1LIST

DEM

1210

```
*************
10 REM
30
   REM
        ***
50
   REM
        **** Programme De Suivi De Fermentation ****
70
   REM
        ***
90
   REM
        **************
110
    REM
130
    REM
150
    REM
170
    REM
190
    REM
210
    REM
230
    REM
250
    REM
270
    REM **** Message De Presentation ****
290
310 HIMEM: 16383
330 HOME : TEXT
350
    SPEED= 100
    VTAB 5:P$ = " BIENVENUE SUR: S.U.F.E.R": GOSUB 610
370
    VTAB 7:P$ = " LOGICIEL DE SUIVIE DE FERMENTATION ": GOSUB 610
390
    VTAB 9:P$ = " EN MILIEU SOLIDE ": GOSUB 610
410
430 SPEED= 255
450 HLIN 1,36 AT 4: VLIN 4,20 AT 36
470 HLIN 36,1 AT 20: VLIN 20,4 AT 1
490 VTAB 22: PRINT "Version: V1.0": PRINT "Copyright: ORSTOM Montpellier"
530 GOTO 670
550
    REM
570
         **** Routine De Centrage De L'impression ****
    REM
590
    REM
610 HTAB ((40 - LEN (P$)) / 2)
630 PRINT PS
650
    RETURN
670
    REM
690 REM
         **** Declaration Des Variables Utilisees ****
710
    REM
730
    REM SU: nombre d'heures
750 REM EC:echantillonnage (acquisition)
770 REM
         TP: temperature
790
    REM DE:debit
810
    REM NE: nombre d'enregistrements
    REM
830
         ME: nombre de mesure a effectuer
850
    REM
         FL: flag de mesure (inhibition o/n)
870
    REM
         AU: position chargement automatique
890
    REM
         CO: valeur du CO2
910 REM
         02: valeur de l'oxygene
930 REM
         TI: temperature d'incubation (consigne)
950 REM
         CI: valeur du CO2 de consigne
970
    REM
         TR: temperature du reacteur (consigne)
990
    REM
1010
     REM **** Chargement du Fichier Assembleur ****
1030
     REM
1050
     ONERR GOTO 1090
1070
     GOTO 1110
1090 PRINT D$; "CATALOG": PRINT "Le fichier IT.LX N'existe pas": END
1110 D$ = CHR$ (4): REM D$ = CRTL D
1130
     PRINT D$; "BLOAD ITZ'.LX" LX
1150
     REM
1170
     REM
          **** Lecture Et Sauvegarde de l'adresse d'IT ****
1190
     REM
          **** Et Positionnement de l'adresse du S/prog ****
```

```
1230 POKE 32768, PEEK (1022) REM
                                    $3FE ---> $8000 IRQ
1250
     POKE 32769, PEEK (1023): REM $3FF ---> $8001 IRQ
     POKE 1022,04: POKE 1023,98: REM
1270
                                          Adresse Du S/P D'IT $6204
1290
     HGR2 : HCOLOR= 3: TEXT
1310 HPLOT 0,0 TO 279,0 TO 279,159 TO 0,159 TO 0,0: FOR I = 0 TO 279 STE
    27.9: HPLOT I,159 TO I,154: NEXT : FOR I = 0 TO 159 STEP 31.8: HPLOT
    0, I TO 3, I: NEXT
1330 FOR I = 0 TO 159 STEP 6.36: HPLOT 0, I TO 1, I: NEXT
1350 FOR I = 0 TO 159 STEP 53: HPLOT 279,1 TO 276,1: NEXT 1370 FOR I = 0 TO 159 STEP 10.6: HPLOT 279,1 TO 278,1: NEXT
1390 HPLOT 275,162 TO 279,162: HPLOT 277,162 TO 277,166: REM Fabrique
    du T
1410 HPLOT 0,162 TO 4,162 TO 4,166 TO 0,166 TO 0,162: HPLOT 4,170 TO 0,
    170 TO 0,174 TO 4,174: HPLOT 8,170 TO 12,170 TO 12,174 TO 8,174 TO 8
    ,170
1430 \text{ XP} = 0:\text{YP} = 159:\text{XO} = 0:\text{YO} = 159:\text{XC} = 0:\text{YC} = 159
1450 GOTO 2070
1470
     RRM
1490
      REM
           Initialisation du timer adresse $COAO
1510
     REM
1530 CA = 49312: REM Carte Dans le Slot Num. 2
1550
      POKE CA + 9,00
      POKE CA + 8,147
1570
      POKE CA + 14,249: REM
1590
                                VALEUR MODIFIEE $F9
      POKE CA + 15,34: REM
1610
                                  IDEM $23 VALEUR APPROCHEE ($22)
      POKE CA + 9,213
1630
1650
      POKE CA + 12,00
      POKE CA + 13,59
1670
      POKE CA + 8,21
1690
1710
      POKE CA + 10,230
1730
      PORE CA + 11,23
1750
      POKE CA + 8,20
1770
      RETURN
1790
      REM
          Initialisation de la carte PIA
      REM
1810
1830
1850 CA = 49312: REM Adresse de base de la carte $ COAO
1870 POKE CA + 5,00: REM Permet d'acceder au DDRA
1890
      POKE CA + 4,255: REM
                             Toutes les voies en sortie
1910
      POKE CA + 5,04: REM Registre de controle accessible
      POKE CA + 7,00: REM Permet l'acces au DDRB
1930
1950
      POKE CA + 6,255: REM
                              Toutes les voies en sortie
1970
      POKE CA + 7,04: REM Registre de controle accessible
1990
      REM
2010
      REM Initialisation du gain de l'ampli
2030
      POKE CA + 3,01: REM Gain de 1
2050
2070 HOME
2090 D$ = CHR$ (4)
2110 ONERR GOTO 2310
2130 Zs = "INITIA
      PRINT D$; "OPEN"; Z$: PRINT D$; "READ"; Z$
2150
2170
      ONERR GOTO 2290: REM Si Fichier Vide
      INPUT XZ$: IF XZ$ < > "PASSE" THEN GOTO 2310
2190
2210 INPUT EC, SU, DE, TI, TR, CI, VE, NOM$
2230 AU = 255: REM
                      Mise en position du mode AUTO
2250 PRINT Ds; "CLOSE"
2270
      GOTO 3210: REM **** SAUT ****
      PRINT "ERROR"
2290
2310 PRINT DS; "CLOSE"
2330 AU = 00: REM Inhibition du mode AUTO
      PRINT "Intervalle d'Acquisition 0<I<241 min";
2350
2370
      INPUT EC$:EC = VAL (EC$)
2390
      IF EC < 1 OR EC > 240 THEN
                                   GOTO 2350
2410 PRINT "Temps de Suivie 0<T<241 heures";
2430 INDIT CHE-CH - VAL (CHE)
```

```
IF SU < 1 OR SU > 240 THEN GOTO 2410
2450
      PRINT "Quel Debit de Depart Desirez Vous"
2470
      PRINT "D = n * 50 ml/mays avec 0<n<16:n=";
2490
      INPUT DES:DE = VAL (DES)
2510
      IF DE < 1 OR DE > 15 THEN GOTO 2470
2530
2550
      PRINT "temperature du reacteur desiree"
      PRINT " 0<T<50 (C:";
2570
      INPUT TR$:TR = VAL (TR$)
2590
2610
      IF TR < 1 OR TR > 50 THEN GOTO 2550
2630
      PRINT "temperature d'incubation desiree"
      PRINT " 0<T<50 (C:";
INPUT TI$:TI = VAL (TI$)
2650
2670
      IF TI < 1 OR TI > 50 THEN GOTO 2630
2690
      PRINT " valeur du CO2 0<CO2<21%=";
2710
2730
      ONERR
              GOTO 2710
2750
      INPUT CI
2770
      IF CI < 0 OR CI > 21 THEN GOTO 2710
      PRINT " Voulez-vous le pilotage (O/N):";: GET W$:VE = 00: PRINT W$
2792
2794
      IF W$ = "O" THEN VE = 128
2810
      INPUT "nom du fichier de sauvegarde:"; NOM$
IF NOM$ = "INITIA" THEN GOTO 2810
2830
      ONERR GOTO 2930: REM si fichier non texte
2850
      PRINT D$; "OPEN"; NOMS: PRINT D$; "READ"; NOMS
2870
      ONERR GOTO 2950: REM si fichier n'existe pas
2890
2910
      INPUT XZ$
      PRINT D$; "CLOSE": PRINT "fichier deja existant!!!": GOTO 2810
PRINT D$; "WRITE"; NOM$: PRINT "DATA": PRINT EC
2930
2950
      PRINT D$; "CLOSE"
PRINT D$; "CPEN"; "COMPT": PRINT D$; "WRITE"; "COMPT"
2970
2990
3010 A = 00: PRINT A: PRINT Ds; "CLOSE"; "COMPT"
3030
      REM
3050
      REM
            **** creation du fichier "INITIA " ****
3070
      REM
3090
      PRINT Z$
     PRINT D$; "OPEN"; Z$: PRINT D$; "DELETE"; Z$: REM ouverture et destru
3110
    ction
      PRINT D$; "OPEN"; Z$: PRINT D$; "WRITE"; Z$
3130
3150
      PRINT "PASSE"
      PRINT EC; ", ";SU; ", ";DE; ", ";TI; ", ";TR; ", ";CI; ", ";YE; ", ";NOM$
PRINT D$; "CLOSE";Z$
3170
3190
      PRINT EC; SU; DE; TI; TR; CI; VE; NOM$
3210
3230
      REM
3250
      REM **** calcul du nombre d'enregistrement ****
3270
      REM
3290
      IF AU = 255 THEN GOTO 3350
3310 ME = (SU * 60) / EC: REM
                                   Nbre de mesure a effectuer
3330
      GOTO 3430
       PRINT D$; "OPEN"; "COMPT": PRINT D$; "READ"; "COMPT" INPUT NE: PRINT D$; "CLOSE"; "COMPT": NE = NE - 1
3350
3370
3390 ME = ((60 * SU) - (NE * EC)) / EC: PRINT D$; "CLOSE"; NOM$
      PRINT NE; ME
3410
3430
      REM
3450
      REM
            **** positionnement des variables en memoire ****
3470
      REM
3480 CI =
            INT (CI * 10)
3490 AD = 32770: REM adresse ---->$8002
3510
      POKE AD, EC: POKE AD + 1, DE: POKE AD + 2, TI: POKE AD + 3, CI
3530
       POKE AD + 4, TR: POKE AD + 34, VE: REM $8024
      PORE AD + 5, INT (ME / 256)
PORE AD + 6, INT ((ME / 256) - INT (ME / 256)) * 256)
3550
3570
      POKE AD + 7, PEEK (32770): POKE AD + 8, PEEK (32775): POKE AD + 9,
      PEEK (32776)
      REM
3610
3630
       REM
            echantillonnage ----> $ 8002
3650
      DEM
            2274
```

4,31 4

```
CODIC -----> $ 0003
3670 REM temps d'incub. -----> $ 8004
3690 REM consigne du CO2 -----> $ 8005
3710
     REM
           consigne du reacteur ---> $ 8006
3730
     REM
           Nore de mesure -----> $ 8007 valeur forte
3750
      REM
           Nore de mesure -----> $ 8008 valeur faible
3770
     REM
           Sauve echantill. ----> $ 8009
3790
     REM
           Sauve Nbre fort ----> $ 800A
3810
     REM
           Sauve Nbre faible ----> $ 800B
3830
      REM
3850
      REM
3870 FL = 00: REM inhibition de la sauvegarde
3890 REM
3910
     IF AU = 255 THEN GOSUB 3950
3930
     GOTO 4010
3950 GOSUB 1470: REM Initialisation du timer
3970 CALL 25088: REM Validation des IT du micro
3990 RETURN
4010 REM
4030 REM
      POKE AD + 10,FL: REM flag ----> $ 800C
4050
4070
      HOME : TEXT
      VTAB 3:P$ = " Desirez-vous...": GOSUB 550
4090
     VTAB 7: HTAB 5: PRINT " Commencer la fermentation ...<1>"
VTAB 9: HTAB 5: PRINT " Arreter la fermentation ...<2>"
4110
4130
      VTAB 11: HTAB 5: PRINT " Lire un fichier texte ..... <3>"
4150
4250 POKE (32781),AU
4270 AU = PEEK (32781): REM AU ----> $800D
4290 IF AU = 255 THEN GOTO 4350
4310 NORMAL : PRINT "
4330 GOTO 4370
4350
      INVERSE : PRINT "MESURE EN COURS"
4370
      NORMAL
4390
      VTAB 22: HTAB 2: PRINT " Votre choix ----: ";: GOSUB 4490
4410 IF X < 1 OR X > 5 THEN GOTO 4390
4430 IF X = 5 THEN GOTO 4470
     IF X = 3 THEN GOTO 9000
4435
4450 ON X GOSUB 5210,5430,9000,6530: GOTO 4070
4470 PRINT "Confirmez-vous,(O/N)?:";: GET W$: PRINT W$: IF W$ < > "O"
     THEN GOTO 4390
4475 POKE (49316),255: POKE (48318),255: REM RELAIS A L'ETAT HAUT
4480 END
4490 REM
4510 REM **** Controle de la rentree de caract. ****
4530
      REM
4550 X = PEEK ( - 16384)
     IF X < 128 THEN GOSUB 4630: VTAB 22: HTAB 22: GOTO 4550
4570
4590
      POKE - 16368,00:X = CHR$ (X - 128):X = VAL (X$)
4610
      PRINT X
4630
      REM
4650 REM **** regarde si il faut sauver ****
4670 REM
4690 IF PEEK (32780) = 00 THEN GOTO 5110: REM regarde flag
4710 PRINT CHR$ (7): FOR I = 1 TO 100: NEXT I
4730 PRINT CHR$ (7)
      GOSUB 5730
4750
4770
      VTAB 22: HTAB 22
4790 PRINT D$; "OPEN"; NOM$
4810 PRINT D$; "APPEND"; NOM$: PRINT D$; "WRITE"; NOM$
4811 GOSUB 7050:02% = 02: PRINT 02%; PRINT ",";
4812 GOSUB 7100:CO% = CO: PRINT CO%; PRINT ",";
4830 FOR I = 1 TO 12: REM 12 ETANT LE Nbre DE TEMPERATURES
4850 A = PEEK (32785 + I):I = I + 1:C = PEEK (32785 + I)
ARTO COCHE TOTO - TE. DOTUT TEV. DOTUT "
```

```
4692 PRINT PEEK (32785 + 1)
4895 PRINT D$; "CLOSE"; NOM$
4910 PRINT D$; "OPEN"; "COMPT": PRINT D$; "READ"; "COMPT"
     INPUT A:A = A + 1: PRINT D$; "OPEN"; "COMPT": PRINT D$; "WRITE"; "COMP
      : PRINT A
4950 PRINT D$; "CLOSE"; "COMPT"
4970 IF PEEK (32780) = 04 THEN GOSUB 5470
4990 VTAB 04: HTAB 01: PRINT "VALEUR:";
5010 PRINT ( PEEK (32778) * 256 + PEEK (32779));: PRINT " ";: PRINT P
    (32804);: PRINT " ";: PRINT PEEK (32803);: PRINT " ";: PRINT PEEK (32808);: PRINT " ";: PRINT PEEK (32809)
     VTAB 18: HTAB 01
5017 A = PEEK (32786):C = PEEK (32787): GOSUB 7010:T1 = TE:A = PEEK (
    32788):C = PEEK (32789): GOSUB 7010:T2 = TE
5020 PRINT "CO=";CO / 100;" 02=";O2 / 100;" TR=";T1 / 100;" TI=";T2 / 1
   00
5030 POKE 32780,00: REM **** reposition de flag ****
5050 AU = PEEK (32781)
5070
      IF AU < > 0 THEN GOTO 5110
5090 VTAB 1: HTAB 10: PRINT
5110 RETURN
5130 REM
5150 REM **** S/P de Commencer la fermentation
                                                       ****
5170 REM **** Traitement du lancement de la mesure ****
5190
     REM
5210 HOME: IF AU = 255 THEN GOTO 5290
5230 IF NOMS = " ** *" THEN GOTO 53
     IF NOM$ = " ** *" THEN GOTO 5330
5250 GOSUB 3950: POKE AD + 10,128: CALL 25176: REM Va dans le S/P d'I
5270 AU = 255: RETURN
5290 INVERSE : FLASH : PRINT " EXPERIENCE EN COURS "
5310 FOR I = 1 TO 2500: NEXT I: NORMAL : RETURN
5330 HOME : INVERSE : FLASH : PRINT " RECHARGER DE NOUVELLES DONNEES "
5350
     FOR I = 1 TO 2500: NEXT I: NORMAL : RETURN
5370
      REM
5390 REM **** S/P de arret de la fermentation ****
5410
     REM
      INPUT "Confirmez-vous (O/N):"; N$
5430
      IF N$ = "N" THEN RETURN
5450
      IF AU = 255 THEN GOTO 5530
5470
     HOME : INVERSE : FLASH : PRINT " FICHIER NON PRESENT "
5490
5510
     FOR I = 1 TO 2500: NEXT I: NORMAL : GOTO 5610
5530
     CALL 25090: REM Inhibe les interruptions
5550 POKE (49320),01: REM Arrete le timer
5570 AU = 00: POKE (32781),00: REM Inhibe le mode automatique
5580 POKE (49316),255: POKE (49318),255: REM LES RELAIS A L'ETAT HAU
    T
5585 PRINT CHR$ (4); "DELETE INITIA "
5590 NOM$ = " ** *"
5610 RETURN
5630 END
5650 REM
5670 REM **** Conversion des valeurs ****
5690
     REM
5710
     REM
           TEMPERATURE
5730 C = PEEK (32787): A = PEEK (32786)
5750 V = A * 16 + INT (C / 16):V = V * 0.5 / 4096
5770 X = 100.46188162 * V + 0.030383
5790 \text{ TE} = INT (X * 100) / 100
5810 IF TE > 50 THEN TE = 50
5815 IF TE < 20 THEN TE = 20
5830 TE = TE - 20
5850 REM OXYGENE
5870 C = PEEK (32783):A = PEEK (32782)
5890 U - A * 16 . TNT (C / 16) " " +
```

```
5910 X = 4.9469 * V + 0.0948
5930 \ 02 = INT (X * 100) / 100
5950 IF O2 > 21 THEN O2 = 21
5955 IF 02 < 16 THEN 02 = 16
5970 02 = 02 - 16
5990 REM CO2
6010 C = PERK (32785):A = PEEK (32784)
6030 V = A * 16 + INT (C / 16):V = V * 5 / 4096
6050 X = 1.9859 * V + 0.0051
6070 \text{ CO} = INT (X * 100) / 100
6090 IF CO > 5 THEN CO = 5
     IF CO < 0 THEN CO = 0
6100
6110
      GOSUB 6150
6130
      RETURN
6150
      REM Gestion graphique
6170 HPLOT XP, YP
6190 NM = SU * 60 / EC:TR = NM - ( PEEK (32778) * 256 + PEEK (32779)): REM
     TEMPSREEL
6210 YY = (1 - TE / 30) * 159:XX = TR / NM * 279: HPLOT TO XX,YY
6230 XP = XX:YP = YY
      HPLOT XO.YO
6250
6270 YY = (1 - 02 / 5) * 159:XX = TR / NM * 279: HPLOT TO XX,YY
6290 XO = XX:YO = YY
6310 HPLOT XC, YC
6330 YY = (1 - CO / 5) * 159:XX = TR / NM * 279: HPLOT TO XX,YY
6350 XC = XX:YC = YY: RETURN
6530 POKE - 16304.0: POKE - 16297.0: POKE - 16299.0
6550
      GOSUB 4490: RETURN
7010 V = A * 16 + INT (C / 16): V = V * 0.5 / 4096
7020 X = 100.46188162 * V + 0.030383
7025 \text{ TE} = INT (X * 100)
      RETURN
7030
7050 C = PERK (32783):A = PEEK (32782)
7060 \text{ V} = \text{A} * 16 + \text{INT (C } / 16) : \text{V} = \text{V} * 5 / 4096
7070 X = 4.9469 * V + 0.0948
7080 O2 = INT (X * 100)
7090 RETURN
7100 C = PEEK (32785):A = PEEK (32784)
7110 V = A * 16 + INT (C / 16):V = V * 5 / 4096
7120 X = 1.9859 * V + 0.0051
7130 \text{ CO} = \text{INT } (X * 100)
7140 RETURN
9000
      IF AU = 0 THEN GOTO 9020
9010 HOME: INVERSE: FLASH: PRINT " OPERATION IMPOSSIBLE D'ACCES": NORMAL
: FOR I = 1 TO 2000: NEXT: GOTO 4070
9020 HOME
9025 PRINT " Pour pouvoir lire un fichier de donnees il faut:": PRINT
9030 PRINT " 1- Eteindre l'APPLE II et le mettre sous tension a nouveau
      : PRINT
9040 PRINT " 2- Lancer le programme 'LANCEUR': (RUN LANCEUR)": PRINT 9050 PRINT " 3- Suivre les directives du logiciel": PRINT
9060 VTAB 22: HTAB 2: PRINT " Appuyer sur une touche pour le retour au
```

menu:": GET Z\$: GOTO 4070

2002275

```
**END OF PASS 1
**END OF PASS 2
0800
                     ;***********************
0800
0800
                  3
0800
                     ;* logiciel gestion des IT
                     ;*
0800
                  5
                     ;*********
0800
                  6
0800
                  7
0800
                  8
0800
                  9
0800
                 10
0800
                 11
0800
                 12
0800
                 13
0800
                 14
0800
                 15
0800
                 16
0800
                 17
                 18 ECHAN
                               EQU $8002
8002
                                                  ; tps d'acqu.
8003
                 19 DEBIT
                               EQU $8003
                                                   ; val du debit
                                                   ; temp.d'incub.
8004
                 20 TPINC
                               EQU $8004
8005
                 21 C02
                               EQU $8005
                                                    cons. CO2
LISA 2.5
                 22 REACT
23 NBM1
                                                    ;temp.du react.
8006
                               EQU $8006
8007
                               EQU $8007
                                                    ; poids forts
                 24 NBM2
8008
                               EQU $8008
                                                    ; poids faibles
8009
                 25 SAECH
                               EQU $8009
                                                    ; sauv. acq.
A008
                 26 SANB1
                               EQU $800A
                                                   ;sauv. poids forts
                                                   ; sauv. poids faibles ; flag d'IT
800B
                 27 SANB2
                               EQU $800B
800C
                 28 FLAG
                               EQU $800C
                                                   ; position de debut de me
800D
                 29
                     AUTO
                               EQU $800D
COAO
                                                    ;Adresse de la carte
                 30
                     CARTE
                               EQU $COAO
                     ADD
800E
                               EQU $800E
                                                    ;sauvegarde de 8 valeurs
                 31
8020
                 32 PIA
                               EQU $8020
                                                    ;Sauvegarde du debit
8021
                 33
                     PIB
                               EQU $8021
                                                   ;Multiplexe la temperatu
8022
                 34 MULTI
                               EQU $8022
                                                   ;Choix de la sonde
8023
                 35
                     TAMP0
                               EQU $8023
                                                   ;Reserve de mem
8024
                 36
                     VECT
                               EQU $8024
                                                    :Vecteur de regulation
8025
                 37
                     TAMP1
                               EQU $8025
                                                   ;Reserve de mem
                     TAMP2
                                                   ;Reserve de mem
8026
                 38
                               EQU $8026
8027
                 39 PIB1
                               EQU $8027
                                                    ; TEMPO
0800
                  40
0800
                  41
0800
                  42
0800
                 43
6200
                 44
                               ORG $6200
6200 58
                 45
                               CLI
6201 60
                 46
                               RTS
6202 78
                 47
                               SEI
6203 60
                 48
                               RTS
6204 78
                 49
                               SEI
6205 08
                 50
                               PHP
6206 48
                               PHA
                 51
```

, 1984.

6207 8A

52

TYA

6208 6209 620A 620B 620C 620F 6212 6218 621B 621B 622E 6224 6229 6228 6229 6235 6235 6237 6237 6237 6237 6238	98 48 38 AD 0A BO 4C AD AD AD AD CE FO 4C BD 8D AD BD 8D AD 8D 8D 8D 8D 8D 8D 8D 8D 8D 8D 8D 8D 8D	03 00 AA AB AC AD 09 03 E1 FB 24 24 0B 01 0B 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00	64 C0 C0 C0 C0 80 62 80 80 80 80	534 555 557 559 661 662 663 665 667 773 774 775 778	IT	ASL BCS JMP LDA LDA LDA LDA DEC BEQ JMP LDA AND STA SEC LDA SBC STA LDA SBC STA CLC	PULOI CARTE+10 CARTE+11 CARTE+13 SAECH ICI REGUL £\$FB VECT VECT SANB2 £\$01 SANB2 \$301 SANB1 £\$00 SANB1	; registre de la carte ;diminue le Nbre de min
	18			77		STA CLC		

DIBA 2:5

٠..

6246	F0	05		80		BEQ	ARRET	
6248	A9	FF		81	CHARG	LDA	£\$FF	
624A	4C	4F	62	82		JMP	CHARG1	
624D	Α9	04		83	ARRET	LDA	£\$04	:Vecteur d'arret
	8D	_	80	84	CHARG1	STA	FLAG	,
6252			80	85		LDA	ECHAN	
	8D	09	80	86		STA	SAECH	
6258				87	;			
6258				88	; charges	ent	des valeurs	
6258				89	;			•
6258				90		LDA	DEBIT	
625B		20	80	91		STA	PIA	
	49	04		92		EOR	£\$04	
6260		A4	CO	93			CARTE+04	;Sortie sur le pia A
	A2	00		94			£\$00	-
	Α0	00		95			£\$00	
	8E	22		96			MULTI	
626A			CO	97	DEB	STY	CARTE+02	;Choix de la voie
626D		00		98		LDA	£\$00	;L'amplification=1
		A3	CO	99		STA	CARTE+03	
62 72	98			100		TYA		
	48			101		PHA		
	Α0	00		102		LDY	£\$00	
6276	88			103	TEMP	DEY		
6277	D0	FD		104		BNE	TEMP	Attente stabilisatio
6279	68			105		PLA		,
627A	8A			106		TAY		
		ΑO	C0	107	ACQ	STA	CARTE	;Demande d'acquisitic
627E	38			108		SEC	•	•
627F		A2	CO	109	BUZY	LDA	CARTE+02	
6282	ΑO			110		ASL		
6283	$n_{\mathcal{A}}$	FA		111		RCS	BIIZV	

628F 9D 0E 80 6292 E8 6293 C8 6294 C0 02 6296 30 D2 6298 A9 02 629A 8D A2 C0 629D A9 01 629F 8D A3 C0 62A2 A9 FF 62A4 8D 21 80 62A7 A9 02 62A9 8D 27 80 62AC AD 22 80 62AF 49 FF 62B1 8D A6 C0 62B4 EE 22 80 62B7 98 62B8 48 62B9 A0 00	112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 TP	LDA CARTE STA ADD, X INX LDA CARTE+01 STA ADD, X INX INY CPY £\$02 BMI DEB LDA £\$02 STA CARTE+02 LDA £\$01 STA CARTE+03 LDA £\$F STA PIB LDA £\$F STA PIB LDA £\$F STA PIB LDA £\$02 STA PIB1 LDA MULTI EOR £\$F STA CARTE+06 INC MULTI TYA PHA LDY £\$00 DEY BNE TP	;Recupere la conversion ;Sauvegarde les valeurs ;Position de la voie ;Position de l'amplificati ;Valeur de la tempo ;Port B
62C6 D0 F3 62C8 68 62C9 A8 62CA C0 08 62CC D0 AD 62CE AD 03 80 62D1 8D 1E 80 62D4 AE 0C 80 62D7 E0 80 62D9 D0 06 62DB A9 FF 62DD 8D 0C 80 62E0 60 62E1 AD 24 80 62E4 29 80 62E8 4C 00 64	138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 REGUL 155 156 157 158 OTO 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169	DEC PIB BNE TP DEC PIB1 BNE TP PLA TAY CPY £\$08 BNE ACQ LDA DEBIT STA ADD+16 LDX FLAG CPX £\$80 BNE REGUL LDA £\$FF STA FLAG RTS LDA VECT AND £\$80 BNE OTO JMP PULOI LDA VECT AND £\$06 BNE OTO JMP PULOI LDA VECT AND £\$08 CMP £\$08 BEQ SORT1 LDA £\$08 ORA VECT STA VECT LDA ADD+4 STA TAMP2 JSR CONVER CLC LDA REACT	;Attente stabilisation ;Sauvegarde la valeur du « ;Permet d'etre appeler con ;Ordre au basic de sauveg: ; FAIT LA REGULATION 1 FO ; REMET POUR LA FOIS SUIV

April 1 and

630B 38			171		SEC			
630C ED	23	80	172		SBC	TAMPO		
630F 30	1 E		173		BMI	SUP		
6311 38			174		SEC			
6312 AD	06	80	175			REACT		
6315 ES	01		176			£\$01		
6317 38			177		SEC			
6318 EI	23	80	178			TAMPO		
631B C9	01		179		_	£\$01		
631D 10	22		180			INF		
631F AI	03	80	181			DEBIT		
6322 29	CF		182		AND	£\$CF	:	FERMETURE EAU ET ARRET !
6324 81	03	80	183		STA	DEBIT	•	The second of th
6327 49	04		184		EOR	£\$04		
6329 81	A4	CO	185		STA	CARTE+4		
632C 40	BB	63	186		JMP	SORT		
632F AI	03	80	187	SUP	LDA	DEBIT		
6332 29	DF		188		AND	£\$DF	;	ARRET RESISTANCE
6334 09	10		189		ORA	£\$10	;	OUVERTURE EAU
6336 81	03	80	190		STA	DEBIT		
6339 49	04		191		EOR	£\$04		
633B 8I	A4	CO	192		STA	CARTE+4		
633E 40	BB	63	193		JMP	SORT		
6341 AI	14	80	194	INF	LDA	ADD+6		
6344 81	26	80	195		STA	TAMP2		

LISA 2.5

1

6947 20 7C 69	198	JSR	CONVER		
634A AD 04 80	197	LDA	TPINC		
634D CD 23 80	198	CMP	TAMPO		
6350 30 69	199	BMI	SORT		•
6352 AD 03 80	200	LDA	DEBIT		
6355 29 EF	201	AND	£\$EF	:	FERMETURE EAU
6357 09 20	202	ORA	£\$20	í	RESISTANCE ALLUMBE
6359 8D 03 80	203	STA	DEBIT	•	
635C 49 04	204	EOR	£\$04		
635E 8D A4 C0	205	STA	CARTE+4		
6361 4C BB 63	206	JMP	SORT		
6364 AD 03 80	207 SOR	rı LDA	DEBIT		•
6367 29 CF	208	AND	£\$CF	;	EAU ET RESISTANCE OFF
636 9 8D 03 80	209	STA	DEBIT		
636C 49 04	210	EOR	£\$04		
636E 8D A4 C0	211	STA	CARTE+4		
6371 A9 F7	212	LDA	£\$F7		
6373 2D 24 80	213	AND	VECT		
6376 BD 24 B0	214	STA	VECT		
6379 4C BB 63	215	JMP	SORT		
637C	216 ;				
637C	217 ; re	outine de	conversion de	la 1	temperature
637C	218 ;				_
637C A9 00	219 CON'	VER LDA	£\$00		•
637E 8D 23 80	220	STA	TAMP0		
6381 8D 25 80	221	STA	TAMP1		
6384 A2 32	222	LDX	£50	;	valeur de la multiplica
6386 AD 26 80	223 MUL	LDA	TAMP2		•
6389 18	224	CLC			
638A 6D 23 80	225	ADC	TAMPO		
638D 8D 23 80	226		TAMPO		
6390 A9 00	227	LDA	£\$00		
6392 6D 25 80	228	ADC	TAMP1		

6395 8D 25	80 229	STA	TAMP1
6398 CA	230	DEX	
6399 DO EE	231	BNE	MUL
639B AD 25	80 232	LDA	TAMP1
639E 8D 28	80 233	STA	PIB1+1
63A1 AD 23	80 234	LDA	TAMPO
63A4 8D 29	80 235	STA	PIB1+2
63A7 A2 08	236	DIV1 LDX	£\$08
63A9 AD 25	80 237	DIV LDA	TAMP1
63AC 4A	238	LSR	
63AD 8D 25	80 239	STA	TAMP1
63B0 AD 23	80 240	LDA	TAMPO
63B3 6A	241	ROR	
63B4 8D 23	80 242	STA	TAMPO
63B7 CA	243	DEX	
63B8 D0 EB	244	BNE	DIA
63BA 60	245	RTS	
63BB	246	;	
63BB	247		LA REGUL DU CO2
63BB	248	•	
63BB AD 24	80 249	SORT LDA	VECT
63BE 29 04	250	AND	£\$04
63C0 D0 3E	251	BNE	PULOI
63C2 A9 00	252	LDA	£\$00
63C4 8D 23			TAMPO

LISA 2.5

63C7	8D	25	80	254		STA TAMP1
63CA	A2	64		255		LDX £100
63CC	AD	10	80	256	MUL1	LDA ADD+2
63CF	18			257		CLC
63D0	6D	23	80	258		ADC TAMPO
63D3	8D	23	80	259		STA TAMPO
63D6	A9	00		260		LDA £\$00
63 D8	6D	25	80	261		ADC TAMP1
63DB	8D	25	80	262		STA TAMP1
63DE	CA			263		DEX
63DF	D0	EB		264		BNE MUL1
63E1	20	A7	63	265		JSR DIV1
63E4			80	266		LDA CO2
63E7	CD	23	80	267		CMP TAMPO
63EA	10	14		268		BPL PULOI
63EC	Α9	04		269		LDA £\$04
63EE	O D	24	80	270		ORA VECT
63F1	8D	24	80	271		STA VECT
63F4			80	272		LDA DEBIT
63F7				273		AND £\$0F
63F9				274		CMP £\$0F
63FB				275		BEQ PULOI
63FD	EE	03	80	276		INC DEBIT
6400				277	;	
6400				278	; restau	ration de la pile
6400				279	;	
6400				280	PULOI	PLA
6401	8A			281		TAY
6402	6 8			282		PLA
6403				283		TAX
6404				284		PLA
6405		45		285		LDA \$45
	0 ^			200		bl'b

6408 58	287	CLI
6409 40	288	RTI
640A	289	END

**** END OF ASSEMBLY

....

RESUME

Ce travail met en jeu une levure amylolytique à capacité fermentaire, Schwanniomyces castellii, en fermentation solide (FS). Le support utilisé pour la fermentation est la bagasse de canne à sucre. Les cultures ont été menées en aérobiose et en anaérobiose. Deux outils automatisés ont été mis en place pour l'analyse des gaz: un qui permet de suivre plusieurs fermenteurs simultanément et l'autre qui permet le pilotage des fermenteurs en conditions non limitantes en O2.

L'analyse des gaz s'est révélée comme l'outil le plus performant pour l'adaptation de Schw. à la culture en FS. Ceci nous a permis de: a) Trouver le taux d'inoculation nécessaire pour implanter Schwanniomyces comme la flore prédominante dans la FS, b) démontrer le rôle essentiel de la régulation du pH au cours des fermentations, et c) estimer le taux de croissance par la mesure du CO2.

Il est observé que le rendement en biomasse est lié à l'aération: il est inférieur dans les fermenteurs à taux d'aération faible. Ces tendances permettent de développer une approche pour assurer des rendements égaux de biomasse par contrôle de la teneur en CO2. Un système de régulation a été mis au point pour contrôler automatiquement l'alimentation d'air dans le fermenteur. Ainsi, nous avons obtenu des rendements similaires en biomasse à toutes les hauteurs du fermenteur en contrôlant la teneur en CO2 à la sortie du réacteur. Ce système est simple, efficace, facile à extrapoler à d'autres FS. Aucune méthode de ce type n'était disponible jusqu'à présent.

La conversion d'amidon en alcool par Schw. castellii en FS a été obtenue en conditions mixtes d'aération: aérobie puis anaérobie. Pendant la phase aérobie a lieu la production de biomasse et d'amylases qui hydrolysent l'amidon, tandis que pendant la phase anaérobie il y a production d'alcool. A la fin de la fermentation l'utilisation de l'amidon est de 97 %, dont seulement 40 % servent à la production de biomasse et d'amylases le reste (60%) est transformé en éthanol. Le rendement en éthanol est de 94.1 % par rapport à la valeur théorique. Ces résultats montrent le potentiel de cette levure pour la conversion directe de l'amidon en alcool par FS. Des études préliminaires sur l'extraction en continu de l'alcool sont faites. Egalement, une étude montrant la morphologie des cellules de Schw. castellii et leur type d'attachement sur la bagasse, pendant les différentes phases de la fermentation a été réalisée.

L'extrapolation de la production d'alcool d'un facteur de poids de 6 à 410 en partant d'une taille de substrat humide de 10 g a été réalisée efficacement grâce à la conservation des bilans de "chaleur" et de "matière" (d'eau) dans le milieu. Des résultats identiques dans tous les réacteurs indiquent les fortes potentialités d'application de ce critère dans les procédés de FS. On peut le qualifier de premier critère scientifique d'extrapolation de la FS. Il apporte une voie pour l'exploitation industrielle de la FS, qui était jusqu'alors limitée par l'absence de critères scientifiques d'extrapolation (Scaling-up). Ces résultats constituent donc une contribution à l'industrialisation des procédés de FS.

MOTS CLEFS: Schwanniomyces castellii; fermentation solide; production d'éthanol; fermenteur en colonne; support solide inerte; bagasse; production de biomasse; amidon; caractéristiques de croissance: aérobiose; anaérobiose.