

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

École Doctorale
Sciences et Technologies

Laboratoire de Microbiologie et
Biotechnologies Microbiennes
(LAMB)



N° d'ordre.....

THÈSE Présentée

Par **SOMDA Kounbèsiounè Marius**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Ouagadougou

Option : Sciences Biologiques Appliquées

Spécialité : Microbiologie-Biotechnologie

Contribution à la dépollution de l'environnement par la valorisation de la biomasse végétale au Burkina Faso : cas de la biotransformation des résidus de mangues

Soutenue le 21 Février 2012, devant le Jury composé de :

Président : Comlan De SOUZA, Professeur Titulaire, Université de Lomé (Togo)

Membres : Alfred S. TRAORE, Professeur Titulaire, Université de Ouagadougou (Directeur de thèse, Burkina Faso)

Philippe THONART, Professeur Titulaire, Université de Liège-Gembloux (Rapporteur, Belgique)

Georges AMANI, Professeur Titulaire, Université de Cocody (Rapporteur, Côte d'Ivoire)

Dayéri DIANOU, Maître de Recherche, CNRST/IRSS (Rapporteur, Burkina Faso)

PREFACE DU PRESIDENT DU RA-BIOTECH.

L'école Doctorale régionale de Ouagadougou offre une formation doctorale de biotechnologie dans ses options : Biotechnologie microbienne et cellulaire, Biotechnologie Animale et Biotechnologie végétale.

Elle regroupe la plupart des Universités de l'Afrique francophone sub-saharienne en un réseau : le Réseau Ouest Africain de Biotechnologie (RA-BIOTECH) fruit de la coopération inter-universitaire et dont le siège est au CRSBAN, à l'Université de Ouagadougou.

Les Universités et structures de formation des pays ci-dessous constituent les membres fondateurs de ce réseau : Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Guinée-Conakry, Mali, Niger, Togo et d'autres partenaires comme le Centre International de Recherche Développement sur l'Élevage en zone Sub-humide (CIRDES)-Bobo Dioulasso ; EISMV-Sénégal.

Ce réseau sous régional bénéficie de l'appui de plusieurs partenaires de l'enseignement supérieur : Association des Universités Africaines -AUA, UNESCO, Banque Mondiale, CAMES, Agence Universitaire de la Francophonie -AUF, Agence Africaine de Biotechnologie -AAB, etc.

L'école Doctorale que le réseau anime assure une formation de haut niveau à travers une recherche utilitaire sur plusieurs thématiques touchant la vie quotidienne des populations africaines. Cette école a permis au CRSBAN d'être érigé en pôle régional d'excellence en Biotechnologie d'une part par l'AUA et d'autre part par l'AUF. Elle accueille des étudiants de plus de 14 pays d'Afrique centrale et de l'Ouest.

Le réseau bénéficie aussi du soutien de certains spécialistes des biotechnologies des universités du Nord : Université de la méditerranée (France), Université Louis Pasteur de Strasbourg (France), Centre de Génétique Moléculaire de Gif-sur-Yvette-CNRS (Paris France), Université de Liège (Belgique), Faculté Universitaire de Gembloux (Belgique) , Université de Rome, Université Agronomique de Wageningen .

L'importance des biotechnologies dans la résolution des problèmes de développement socioéconomiques des pays de l'Afrique sub-saharienne (Alimentation, Santé, Environnement, etc.) Justifie amplement la mise en place de cette formation. Elle est cogérée par un comité pédagogique international africain, constitué par des enseignants, des chercheurs, tous spécialistes dans les divers domaines des biotechnologies.

La mutualisation des expériences par toutes ces compétences est un atout majeur pour la formation des ressources humaines de qualité au profit du continent africain et de l'humanité.

Pr. Alfred S TRAORE

Professeur titulaire de Biochimie Microbiologie

CRSBAN/UFERSVT/Université de Ouagadougou

Chevalier de l'ordre du mérite

Officier de l'ordre des palmes académiques/ CAMES

Directeur pédagogique du CRSBAN

Chevalier de l'ordre national

Chevalier de l'ordre international

«Le merveilleux est la chose la plus noble dont nous puissions faire l'expérience. C'est l'émotion qui se tient près du berceau de la véritable science.

Celui à qui cette émotion est étrangère et qui ne peut s'émerveiller ni s'étonner, celui-là est comme s'il était mort».

Albert Einstein.

DEDICACE

A mon père Yvon et ma Mère Djina

Pour le support et la compréhension dont ils ont fait preuve à mon égard tout au long de mes études..

A mes sœurs Theodile et Madeleine

*A mon Grand père Wend-yanin, médaillon d'honneur à Dieu bien-fu dont le courage et la combativité ont été des modèles
pour moi*

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été effectué au Burkina Faso au Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN) de l'Université de Ouagadougou et en Belgique au Centre Wallon de Bio-industries (CWBI) à l'université de Liège.

Bien de personnes ont été très actives à l'accomplissement de cette œuvre. Aussi voudrais-je personnellement leur témoigner ma très grande reconnaissance.

Je témoigne ma grande reconnaissance aux illustres rapporteurs et membres du jury qui ont bien voulu me faire l'honneur de juger ce travail. Principalement aux Pr. Alfred S. TRAORE, Pr. Comlan De Souza, Pr. Georges AMANI, Dr. Dianou DAYERI, Pr. Philippe THONART.

Mes profonds remerciements vont droit :

Au Professeur Alfred S. TRAORE, responsable de la formation de troisième cycle au Département de Biochimie-Microbiologie, et Directeur du Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN) et Directeur de cette thèse, pour l'opportunité qui m'a été offerte pour réaliser mes travaux de recherche dans les meilleures conditions possibles. Par ailleurs, ses enseignements et sa disponibilité constante à m'assister m'ont largement aidé à m'orienter dans ma jeune carrière scientifique. Puisse-t-il trouver dans ce document, la concrétisation de ses multiples conseils et encouragements pour lesquels je lui exprime toute ma reconnaissance.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude au Docteur Aly SAVADOGO pour avoir guidé mon stage de DEA qui a abouti aux travaux de la présente thèse. Sa participation tant enrichissante à mon encadrement du DEA à la thèse, la qualité et la rigueur scientifique exigées à mon égard et ses conseils si précieux surtout dans l'élaboration de mes protocoles d'études m'ont été d'un grand recours. Il a permis la valorisation des résultats de mes travaux à travers plusieurs publications dans des journaux internationaux.

Mes remerciements vont droit au Professeur Nicolas BARRO pour sa contribution si enrichissante dans la valorisation des résultats de mes travaux, ses conseils, ses encouragements et surtout d'avoir relevé notre moral pendant les instants difficiles.

Je remercie le professeur THONART de m'avoir accueilli dans son laboratoire CWBI (Centre Wallon de Bio-industries) à l'université de Liège (Belgique) et pour sa disponibilité ainsi que ses conseils précieux.

J'adresse toute ma reconnaissance aux enseignants du CRSBAN qui ont chacun à un moment donné ou à un autre contribué efficacement à ma formation. Je pense en particulier au Pr. Aboubakar S. OUATTARA, et aux Dr Cheik A.T. OUATTARA, Philippe NIKIEMA, Marcel D. BENGALY, André Jules ILBOUDO, Marcel D. Imaël N. BASSOLE.

Mes sincères amitiés aux personnels techniques du CRSBAN qui ont contribué chacun à sa façon à la réalisation de cette thèse, particulièrement à Benoît Sa TRAORE technicien de laboratoire au CRSBAN.

J'ai passé des bons moments avec les doctorants du CWBI : Rasoul de l'université de l'Iran, Delia de l'université de la Roumanie, wissal, Asma, Wafa de l'université de la Syrie et du Maroc, Irène du Centre Agro-Biotech de l'université de Gembloux. J'ai bénéficié également de l'expérience des chercheurs du CWBI: Christophe, Sabri, Julien, Slim. Que toutes ces personnes reçoivent le témoignage de mon amitié.

Je remercie mes aînés Docteurs pour leur encouragement : Dr. Fidèle TIENDREBEOGO, Dr. Ynoussa MAIGA, Dr. Christel NADEMBEGA.

Mes remerciements vont aussi à tous les doctorants du CRSBAN pour leur soutien : CHEIKNA ZONGO, RAKIETA COMPAORE, ISIDORE O. JUSTE BONKOUNGOU, ZARA NIKIEMA, LÉON NITIEMA, ZENABOU SEMDE, FRANÇOIS TAPSOBA, MONIQUE SORO, PAULINE OUEDRAOGO, CLARISSE COMPAORE, ASSÈTA KAGAMBEGA, OUMAR TRAORE, NICOLAS OUEDRAOGO, JOSEPH SAWADOGO, KOURAOGO RAKEITA, CHAIBOU YAHOU, JOSEPH MAKAYA. Merci et surtout bon courage à vous pour la suite de vos travaux.

Je remercie enfin tous mes amis pour leurs encouragements et leurs multiples soutiens : Mr. Bienvenu Martin SOMDA, Hamidou ILBOUDO, Lucien BADO doctorants à l'université de Bobo Dioulasso, Denise ILBOUDO doctorante à l'université de Milan (Italie), François KIEMDE, Olivier OUEDRAOGO, Berthine DABIRE, Abel ILLA, Harouna SAMA, Mahamat ABDELLATIF, Antoinette OUEDRAOGO, Fatouma ABDOULATIF, Cymphor MEDA.

Je remercie dernièrement ma très chère fiancée Flore W. D. Bissyandé, elle qui a supporté mes multiples absences liées à la préparation de cette thèse, je voudrais qu'elle trouve aujourd'hui une raison de se consoler.

Merci à tous ceux dont les noms n'ont pu être cités mais qui, de loin ou de près, ont discrètement mais efficacement, contribué à l'aboutissement de ce travail.

La réalisation de l'ensemble des travaux de la présente thèse a été rendue possible grâce à l'appui financier du Programme **ISP / IPICS** (International Sciences Programm/ International Programm in the Chemicals Sciences, Suède), de l'**UEMOA** (Union Economique et Monétaire de l'Afrique de l'Ouest), de l'**IFS** (Fondation Internationale pour la Science, Suède). Que ces donateurs soient assurés de me sincères remerciements.

Résumé

Cette thèse a porté sur la valorisation des résidus de mangues par la biotransformation et l'optimisation des rendements de conversion de ces résidus en bioéthanol. Les travaux réalisés s'inscrivent dans un axe de recherche des énergies renouvelables, notamment dans le domaine des biocarburants.

L'analyse chimique des résidus de mangues montre qu'ils renferment 22,62% (g/g) d'hydrates de carbone, dont 5,7 % (g/g) de sucres réducteurs, substrats exploitables pour la biofermentation. La sélection de microorganismes performants nécessaires pour la transformation des carbohydrates de résidus de mangues en bioéthanol, a permis de retenir six (6) souches levuriennes et deux (2) bactériennes. Ces souches qui ont été isolées par des techniques standards de microbiologie présentent les atouts nécessaires pour leur utilisation en fermentation éthanolique. Parmi les souches de levures caractérisées, la souche de levure S3 a fourni une conversion maximale des résidus de l'ordre de 12 g/L de bioéthanol.

L'étude de l'influence des paramètres environnementaux sur la performance des microorganismes, a conduit à la sélection de ceux capables de s'adapter aux facteurs externes par la conservation de leurs propriétés métaboliques. Les souches de levures caractérisées (A1, S1, S3, B1, W1, W6) sont thermo-tolérantes (45°C) et alcool-tolérantes (14 % v/v). Les souches bactériennes (*Bacillus* sp1 (A1M1), *Bacillus licheniformis*) renferment des enzymes (α -amylases) hydrolysant les polymères des polysaccharides complexes comme l'amidon et ses dérivés. Les taux de sucres réducteurs dans les résidus de mangues ont été optimisés pour atteindre 62 % à 78 % (g/g) sous l'action des enzymes provenant d'espèces de *Bacillus*.

Les procédés d'optimisation combinant une saccharification du substrat par *Bacillus* suivie d'une fermentation par *Saccharomyces sp*, ont permis d'obtenir des concentrations de bioéthanol de l'ordre de 14 à 16 g/L. Ces concentrations atteignent 18 à 21,75 g/L avec l'ajout de sels minéraux dans le milieu de fermentation. Il ressort de cette étude que les résidus de mangues constituent une biomasse potentiellement valorisable par voies biotechnologiques. Cela permettra de diversifier les sources d'alcool à coût réduit en utilisant des substrats peu onéreux que sont les résidus de mangues.

Mots-clés : Mangue, résidus, microorganismes, valorisation, bioéthanol

Abstract

This study relayed on was the valorization of mango residues by their biotransformation into bioethanol and the optimization of the conversion yield. The achieved works are oriented in the research of the renewable energy, notably in the domain of biofuels.

The chemical analysis of mango residues showed 22.62% (g/g) of carbon hydrates, along with 5.7% (g/g) of reducing sugars.

The selection of efficient microorganisms for the transformation of the carbohydrates of mango residues into bioethanol, permitted to retain six (6) yeast strains and two (2) bacterial strains. These strains that have been selected by microbiological standard technics, present the necessary assets for their use in ethanolic fermentation. Among the selected yeast strains, S3 gave the highest conversion yield of the mango residues in the order to 12 g/L of bioethanol.

Indeed, the study of the influence of environmental parameters on the strains' performance drove to the selection of those capable to adapt to the external factors while keeping their properties. The yeast strains selected (A1, S1, S3, B1, W1, W6) were found thermo-tolerant (45°C) and alcoolo-tolerant (14 % v/v). The bacterial strains (*Bacillus* sp1 (A1M1), *Bacillus licheniformis*) produced some enzymes (α -amylases) which can hydrolyze the polymers of the polysaccharides complex as starch and its derivatives. The rates of reducing sugars in the mango residues have been optimized to reach 62 % to 78 % (g/g) under the action of the enzymes issued from the *Bacillus* strains. The processes of optimization which combined a saccharification of the substrate by *Bacillus* strains followed by *Saccharomyces* fermentation, permitted to get concentrations of bioethanol ranging from 14 to 16 g/L. These concentrations reached 18 to 21.75 g/L with the addition of mineral salts and nitrogen source in the medium of fermentation. It appears from this study that mango residues constitute a biomass potentially valorizable by biotechnical way. The process will allow to produce alcohol at low cost from various substrates such as mango residues.

Keys words: Mango, residues, microorganisms, valorization, bioethanol.

Listes des articles et communications

a) Articles publiés

1. M. K. SOMDA, A. SAVADOGO, C. A. T. OUATTARA, A. S. OUATTARA, A. S. TRAORE. Production of alcohol from mango (*Mangifera Indica L.*) using strains of *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces* genera isolated from wasted mangos in Burkina Faso. *Biosci. Biotech. Res. Asia*. 7(2): 529-536, (2010).
2. M. K. SOMDA, A. SAVADOGO, C. A. T. OUATTARA, A. S. OUATTARA, A. S. TRAORE. Thermotolerant and alcohol-tolerant yeasts targeted to optimize hydrolyzation from mango peel for high bioethanol production. *Asi. J. Bioetch.* 3(1): 77-83, (2011a).
3. M. K. SOMDA, A. SAVADOGO, C. A. T. OUATTARA, A. S. OUATTARA, A. S. TRAORE. Improvement of bioethanol production using amylasic properties from *Bacillus licheniformis* and yeast strains fermentation for biomass valorization. *Asi. J. Biotech.* 3(3): 254-261, (2011b).
4. M. K. SOMDA, A. SAVADOGO, N. BARRO, P. THONART, A. S. TRAORE. Effect of mineral salts in fermentation process using mango residues as carbon source for bioethanol production. *Asi. J. Industri. Engineer.* 3(1): 29-38, (2011c).

b) Communications

- 1-M. K. SOMDA, A. SAVADOGO, C. A. T. OUATTARA, A. S. OUATTARA, A. S. TRAORE. Isolement et characterization de souches de levures d'intérêt industriel au Burkina Faso Communication orale. Journées portes ouvertes sur les travaux des doctorants. (Mai 2009, Université de Ouagadougou/ Burkina Faso).
- 2- M. K. SOMDA, A. SAVADOGO, C. A. T. OUATTARA, A. S. OUATTARA, A. S. TRAORE. Valorization of agri-resources of Burkina Faso by the biofuels production. Poster presented at the International conference of Research ISP/IPICS Networks/1-4 September, 2009, Addis-Abeba (Ethiopia).

3- M. K. SOMDA, A. SAVADOGO, C. A. T. OUATTARA, A. S. OUATTARA, A. S. TRAORE. Valorization of agri-resources of Burkina Faso by the biofuels production.

Communication at the International conference on Waste and Biomass Residues valorization in Developing countries. Waste Engineering/2Eie.9-11 July, 2009, Ouagadougou (Burkina Faso).

4- M. K. SOMDA, A. SAVADOGO, C. A. T. OUATTARA, A. S. OUATTARA, A. S. TRAORE. Valorisation de la biomasse végétale (mangues) par la recherche de source de biocarburant et contribution à la dépollution de l'environnement. Communication orale. Journées portes ouvertes sur les travaux des doctorants. (Février 2010, Université de Ouagadougou/ Burkina Faso).

5- M. K. SOMDA, A. SAVADOGO, C. A. T. OUATTARA, A. S. OUATTARA, A. S. TRAORE. Valorization of agri-resources of Burkina Faso by the biofuels production. Poster presented at the International conference of Environment Wastes and Durable Development Networks/28 March-02 April, 2010. Alexandrie (Egypt).

Liste des abréviations

a) Organismes et institutions

CEAS :	Centre Ecologique Albert Schweitzer
CRSBAN :	Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles
FAO :	Food and Agricultural Organisation
IFS :	International Foundation for Science
ISP / IPICS :	International Science Programme/ International Program in the Chemical Sciences
UFR/SVT :	Unité de Formation et de Recherche/Sciences de la Vie et de la Terre

b) Autres abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide Ribonucléique
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
DHAP :	Dihydroxyacétone phosphate
DO :	Densité optique
EMP :	Voie d'Embden Meyerhof Parnas
F6P :	Fruucose 6 Phostate
G6P :	Glucose 6 Phostate
PEP :	Phosphoénolpyruvate
PGA:	Phosphoglycérate
SSF :	Procédé de saccharification et fermentation simultanée
T :	Température
X :	Biomasse
X₀ :	Biomasse initiale
Y_{E/S} :	Rendement en éthanol produit par rapport au substrat consommé
Y_{X/S}	Rendement en biomasse produite par rapport au substrat consommé

c) Lettres grecques

α : Alpha

β : Bêta

μ : Vitesse spécifique de croissance

μ_{\max} : Vitesse spécifique de croissance maximale

SOMMAIRE

PREFACE DU PRESIDENT DU RA-BIOTECH	i
DEDICACE	iii
REMERCIEMENTS	iv
Résumé	vii
Abstract	viii
Listes des articles et communications	ix
Liste des abréviations	xi
INTRODUCTION	1
Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. GENERALITES SUR LES MANGUES	5
1. <i>Historique et évolution de la filière mangue</i>	5
2. <i>Importance des mangues au Burkina Faso</i>	6
3. <i>Description générale du fruit (mangue)</i>	8
3.1 <i>Caractéristiques des variétés</i>	10
3.2 <i>Composition et usage des mangues</i>	12
II. BIOMASSE ET BIOETHANOL	13
1. <i>Définition et sources de biomasse</i>	13
2. <i>BIOETHANOL</i>	14
2.1 <i>Définition et historique</i>	14
2.2 <i>Production de bioéthanol par voie fermentaire</i>	15
2.3 <i>Utilisation du bioéthanol</i>	16
2.3.1 <i>Avantages de l'utilisation du bioéthanol comme biocarburant</i>	17
2.3.2 <i>Inconvénients de l'utilisation du bioéthanol comme biocarburant</i>	17
III. PHYSIOLOGIE ET METABOLISME DES MICROORGANISMES IMPLIQUES DANS LA PRODUCTION DE BIOETHANOL	18
1. <i>Taxonomie et morphologie des bactéries du genre Bacillus</i>	18
2. <i>Taxonomie et morphologie des levures</i>	19
2.1 <i>Définition et caractéristique des levures</i>	19
2.2 <i>Classification des levures</i>	20
2.3 <i>Multiplication des levures</i>	20
2.3.1 <i>Multiplication végétative asexuée</i>	21
2.3.2 <i>Reproduction sexuée</i>	21

3. Aspects physiologiques et métaboliques	21
3.1 La glycolyse	22
3.2 Le métabolisme oxydatif	24
3.3 Le métabolisme fermentaire	25
3.4 Le métabolisme oxydo-réductif	26
3.5 Voie des pentoses phosphates	28
4. Besoins nutritionnels	29
4.1 Assimilation de sources de carbone	29
4.2 Assimilation des sources d'azote	30
4.3 Assimilation du phosphore	31
4.4 Utilisation des oligo-éléments, vitamines et facteurs de croissance	31
5. Influence des paramètres environnementaux sur les microorganismes	32
5.1 Effet de la température	32
5.2 Effet du pH	33
5.3 Rôle de l'oxygène	34
5.4 Effet des produits de fermentation et du dioxyde de soufre	34
5.4.1 Effet de l'éthanol	34
5.4.2 Effet de l'acide acétique	36
5.5 Effet du dioxyde de soufre	37
6. Mécanismes de répression catabolique	40
7. Etablissement des équations cinétiques	40
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	42
A. Matériel d'étude	43
1. Les zones concernées par l'étude	43
2. Prospections et collecte des échantillons de mangues	44
B. Méthodologie	44
1. Traitement des échantillons	44
I : EVALUATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES ET MACROMOLECULAIRES	
DES RESIDUS DE MANGUES	46
1. Analyses des paramètres chimiques et composition macromoléculaire des échantillons	47
1.1 Détermination du pH	47
1.2 Détermination du taux d'humidité, de matières sèches et de cendres	47
1.3 Détermination de la teneur en glucides	48
1.3.1 Dosage des sucres totaux	48
1.3.2 Dosage des sucres réducteurs	49
1.4 Détermination du taux d'amidon	50
1.4.1 Extraction et dosage de l'amidon total	50

II : SCREENING DES MICROORGANISMES IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS DE FERMENTATION	51
1. <i>Procédé d'isolement et de sélection des souches de levures et bactéries</i>	52
1.1 Les différentes sources d'isolement des microorganismes	52
1.2 Les différents milieux de cultures	52
1.2.1 Milieu de conservation	52
1.2.2 Milieux d'isolement des levures	52
1.2.3 Milieu pour l'étude de la tolérance à l'alcool	53
1.2.4 Milieu pour la mise en évidence de la production d'acétoïne	53
1.2.5 Milieu pour la détermination du caractère amylolytique des souches bactériennes	53
1.2.6 Milieu pour le test de sporulation des levures	53
1.2.7 Milieu de base pour l'étude de la fermentescibilité des sucres	53
1.3 Isolement	54
2. <i>Biochimie et physiologie des souches</i>	54
2.1 Caractères cultureux	54
2.2 Test de catalase	54
2.3 Test de cytochrome oxydase	55
2.4 Test de sporulation	55
2.5 Tests au rouge de méthyle et Voges-Proskauer	55
2.6 Test de thermo-tolérance	56
2.7 Métabolisme de l'amidon par les souches du genre <i>Bacillus</i>	56
2.8 Etude de la fermentescibilité des sucres	57
2.9 Caractérisation taxonomique : Essai taxonomique	57
3. <i>Les méthodes analytiques</i>	57
3.1 Analyse de la biomasse et paramètres cinétiques	57
3.1.1 Spectrophotométrie (Turbidimétrie)	58
3.1.2 Méthode gravimétrique (Poids sec)	58
3.2 Evaluation de l'activité amylasique et saccharification des bactéries	58
4. <i>Traitement des données</i>	59
III: ETUDE DE L'INFLUENCE DE PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LA BIOMASSE MICROBIENNE ET LA FERMENTATION	60
1. <i>Etude de la tolérance à l'alcool</i>	61
2. <i>Etude de l'effet du pH sur la croissance microbienne et la fermentation</i>	62
3. <i>Influence de la température sur la croissance microbienne</i>	63
IV : PROCÉDÉ D'OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE BIOÉTHANOL	63
1. <i>Procédé simultané de saccharification et de fermentation (SSF) des résidus de mangues</i>	64
1.1 Cocultures de <i>Bacillus</i> sp et <i>Saccharomyces</i> sp sur les résidus de mangues	64
1.2 Détermination de la concentration en éthanol produit	64
1.3 Détermination du pourcentage d'éthanol par spectrométrie	65
1.4 Détermination du pourcentage d'éthanol par CPG	65

<i>2. Etude de l'effet des sels minéraux et de l'azote sur les potentialités des souches et l'optimisation de la fermentation</i>	66
2.1 Effet de NaCl	66
2.2 Effet de FeSO ₄	67
2.3 Effet de MgSO ₄	67
2.4 Effet de KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	67
2.5 Effet de MnSO ₄	67
2.6 Effet de la source d'azote (Extrait de levures)	67
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS	68
Partie 1 : Etude de la composition chimique et macromoléculaire de la biomasse ...	69
(mangues et résidus)	69
1. <i>Composition chimique et macromoléculaire des résidus de mangues</i>	70
Partie 2 : Isolement des souches de bactéries et de levures et essai taxonomique....	73
1. <i>Isolement et identification phénotypique des souches levuriennes</i>	75
2. <i>Sélection et identification phénotypique des souches bactériennes</i>	85
Partie 3 : Etude des paramètres environnementaux sur les potentialités des souches isolées.....	87
Partie 4 : Optimisation du procédé de la production de bioéthanol	96
Partie 5 : Discussion générale	117
1. <i>Composition chimique et macromoléculaire des mangues et résidus</i>	119
2. <i>Isolement et identification phénotypique des souches levuriennes et bactériennes</i>	120
3. <i>Etude de l'effet de paramètres environnementaux sur les potentialités des souches sélectionnées</i>	121
4. <i>Optimisation de la production de bioéthanol</i>	123
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	126
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129
ANNEXES	144

INTRODUCTION

L'épuisement à terme des réserves de pétrole brut ainsi que la prise en compte des problèmes liés à l'environnement ont conduit à rechercher des sources alternatives aux énergies d'origine fossile (Makkar et Cameotra, 2002). La crise pétrolière de 1973, l'augmentation progressive du prix du baril de pétrole, ainsi que les différentes crises économiques que traverse le monde, ont créé une conjoncture favorable au développement des biocarburants par la transformation des matières premières d'origine végétale. Les plantes et les déchets agricoles sont vis-à-vis de la biologie, sources de substances fermentescibles pour la production de bioéthanol, pouvant être employé comme combustible (Alazard-Toux *et al.*, 2006). La recherche sur les énergies renouvelables prend de l'essor dans l'optique de préserver l'environnement d'une exploitation non contrôlée.

Dans le contexte de développement durable pour l'Afrique et le Burkina Faso en particulier, la protection de l'écosystème figure parmi les priorités. En ce sens qu'il faut promouvoir la gestion des déchets afin de réduire leur impact sur l'environnement. La biomasse végétale accumulée constitue une source de déchets biologiques pouvant engendrer la pollution environnementale. Ainsi il est nécessaire de gérer les déchets agro-industriels en y extrayant les biomolécules qu'ils renferment pour les valoriser si l'on veut réduire cette pollution.

En effet plusieurs techniques de valorisation des résidus agro-industriels sont aujourd'hui connues dans le monde. Il s'agit essentiellement de techniques de biotransformation.

Des techniques de biotransformation sont améliorées au Brésil et aux USA où la production de bioénergie est axée sur la matière végétale à travers la synthèse de bioéthanol, par la fermentation de différents sucres contenus dans les déchets (Sree *et al.*, 2000; Kim et Dale 2004; Farrell *et al.*, 2006; Baï *et al.*, 2008). Ces sucres sont présents dans un état plus ou moins polymérisé dans de nombreuses espèces végétales comme la betterave, la canne à sucre, le blé, le maïs, mais également dans le bois (Naim *et al.*, 1983). Le Brésil a produit 14,2 millions de litres d'éthanol en 2004 par fermentation de la canne à sucre (Licht, 2005). L'équipe de Lee en 1992 au Japon a pu améliorer la capacité fermentative de *Zymomonas mobilis* et obtenir ainsi 40 g/L d'éthanol sur 100 g/L d'amidon (Lee *et al.*, 1992).

En 2000, une autre équipe de chercheurs Japonais dirigée par Montesinos, a réussi à obtenir 67 g/L d'éthanol sur de la paille de blé, en utilisant successivement des α -amylases et glucoamylases (Montesinos et Navarro, 2000).

En effet l'amélioration du taux de sucres fermentescibles dans la matière brute est faite en utilisant des enzymes spécifiques telles les α et β amylases (Nakurama *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2003).

En Afrique, le Maroc a fait des essais de production de bioéthanol à partir de l'amidon essentiellement extrait du maïs en utilisant des α -amylases du champignon *Candida tropicalis*. L'utilisation de cette technique a permis d'accroître le rendement de production de bioéthanol jusqu'à 56 g/L (Latifa *et al.*, 2007). En Côte d'Ivoire, Yeboua (1989) utilisant l'hydrolysât d'amidon de manioc a obtenu un rendement de 0,502 g d'éthanol pour 1 gramme de matière utilisée.

Le Burkina Faso n'est pas en reste dans cette dynamique de recherche sur les bioénergies à travers la production d'alcool. De nombreuses expérimentations sont en cours pour la production de bioéthanol à partir de la canne-à-sucre (*Saccharum officinarum*), et de la betterave (*Betavulgaris*) et également la production des bioesters sur les grains de coton (*Gossipum sp.*). Actuellement ce moment, une politique basée sur la production de biocarburants à partir de *Jatropha* (*Jatropha curcas*) est largement vulgarisée à travers tout le pays. Au Burkina Faso, chaque année on enregistre une production importante de fruits (substrats très riches en carbohydrates fermentescibles). En effet la production annuelle est d'environ 150000 tonnes dont on estime 1/3 de pertes (Fogue, 1998). Ces pertes sont liées à plusieurs facteurs : le temps d'écoulement des fruits sur le marché, les conditions de conservation et les attaques par les parasites. Ces déchets peuvent aussi causer de sérieux problèmes sanitaires et environnementaux (De Laroussilhe *et al.*, 1980). Toutefois, les résidus issus de ces pertes sont susceptibles de servir de matières premières dans la valorisation des déchets.

Des stratégies sont recherchées pour la valorisation des déchets de mangues issus non seulement des pertes annuelles mais également de l'activité industrielle. Elles visent aussi à contribuer à la dépollution de l'environnement et à améliorer l'environnement sanitaire pour les populations.

La principale voie de valorisation des mangues est assurée par les techniques de transformation et de conservation développées par des unités industrielles telles que : DAFANI, CEAS, STATION MAYA etc. Mais ces unités gèrent une faible proportion des quantités produites. Les pertes demeurent toujours importantes malgré les transformations susmentionnées et les exportations.

Environ 3000 tonnes de mangues fraîches seulement sur 50000 tonnes de production, ont été exportées vers l'Europe en 2002 (Rey *et al.*, 2004).

Les résidus issus de différentes pertes et transformations industrielles sont susceptibles de servir de matières premières en biotechnologie. La biotransformation de ces résidus de mangues constitue donc une deuxième voie de valorisation de la production des fruits (mangues) au Burkina Faso, à travers la production de divers solvants (bioéthanol) ou de biocarburants (biogaz, biocarburants).

Notre travail s'inscrit dans cette dynamique de production de bioéthanol à partir des résidus de mangues sous l'action de microorganismes. L'objectif général est de valoriser les déchets de mangues par la biotransformation de sucres fermentescibles qu'ils renferment et partant contribuer du même coup à la dépollution de l'environnement.

Pour ce faire nous nous donnons comme objectifs spécifiques:

- ⇒ La détermination de la composition chimique et macromoléculaire des résidus de mangues, afin d'évaluer leur potentiel de bioconversion en alcool;
- ⇒ Le screening à partir de différents biotopes de la flore microbienne capable de convertir les sucres en alcool dans des conditions de mésophilie (20-30°C) et de thermophilie (45-50°C) avec des rendements économiquement intéressants;
- ⇒ L'étude des conditions optimales de métabolisme des souches sélectionnées;
- ⇒ Le suivi de la cinétique de production de bioéthanol pour déterminer les souches les plus performantes et l'optimisation du rendement en bioéthanol, en utilisant des processus simultanés d'hydrolyse et de fermentation dans le même milieu réactionnel.

Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GENERALITES SUR LES MANGUES

1. Historique et évolution de la filière mangue

Le manguier (*Mangifera indica*) aujourd'hui très apprécié en Afrique de l'Ouest pour ses fruits et son ombrage est pourtant d'introduction récente en Afrique.

Originaire d'Inde, le manguier a été signalé pour la première fois en Afrique de l'Ouest, au Sénégal, en 1824. C'est à la fin du 19^e siècle que les manguiers ont commencé à connaître une diffusion significative, surtout dans les zones côtières. Leur extension deviendra importante pendant la première moitié du 20^e siècle. Une des variétés de manguiers "Amélie" introduite au Mali vers 1890 fut à l'origine de nombreux plants greffés qui furent largement diffusés dans les pays limitrophes. Dès la fin des années 1940, des collections furent établies progressivement dans toute la zone et, au cours de la décennie 1970-1980, chaque pays d'Afrique de l'Ouest francophone possédait au moins une collection de manguiers (Rey *et al.*, 2004), (Figure 1).

Le Mali fut le premier pays à exporter, vers la fin des années 1960, des mangues vers l'Europe. Il fut suivi par le Burkina, la Guinée, le Sénégal, et surtout la Côte d'Ivoire, dont les exportations, d'environ 2500 tonnes au début des années 1990, ont été multipliées par 4,5 en 2000. Cette croissance rapide des exportations ivoiriennes a bénéficié de la présence d'une façade maritime et d'un effet de masse créé par les exportations de bananes et d'ananas. La variété "Amélie" a longtemps constitué l'essentiel des exportations de mangue du Mali, du Burkina Faso et de la Côte d'Ivoire. Cependant dès 1971, des expéditions expérimentales de mangues colorées furent réalisées avec succès. La consommation de mangues s'augmentant en Europe, le choix variétal s'est progressivement resserré : Amélie, en début de campagne, puis Kent, Keitt et Palmer (Rey *et al.*, 2004). Parallèlement à cette évolution variétale, les techniques de conditionnement se sont progressivement modernisées.



Figure 1 : Zone d'extension du manguiier en Afrique de l'Ouest francophone (Rey *et al.*, 2004).
 ★ : Site de production de mangues.

2. Importance des mangues au Burkina Faso

Les fruits sont en général des produits alimentaires à haute valeur nutritive et commerciale. Ils contribuent à l'amélioration du bien-être social et à de l'état de santé des populations (FAO, 1999). Ces fruits contiennent généralement de la vitamine A dont la déficience provoque souvent un sévère problème de santé publique (Nana *et al.*, 2006). Au Burkina Faso, diverses spéculations fruitières sont rencontrées, dont 4 connaissent une activité économique importante. Il s'agit de la mangue, des agrumes, de la banane et de l'anacarde (Ouédraogo, 2002).

Occupant 57,73% de la superficie du verger national et 55,78% de la production fruitière nationale, la mangue constitue la première culture fruitière du Burkina Faso (SICAREX, 2000).

L'exportation des produits fruitiers, incluant la mangue fraîche ou séchée, vers des pays de la sous région, de l'Europe et de l'Asie constitue une source d'entrée notable de devises pour l'économie burkinabé. Ces exportations représentaient une valeur d'environ un milliard cent trente millions (1.130.000.000) de francs CFA en 2002 pour la mangue séchée (JUDICOME, 2004). Selon les responsables du terminal fruitier de Bobo-Dioulasso, citant les services de Douane du Burkina Faso, les exportations de mangues fraîches en direction de l'Union Européenne pour la campagne 2005-2006 étaient de l'ordre de 2000 tonnes. Une étude du ministère de l'agriculture conduite en 2004 par le cabinet JUDICOME estimait à environ 5332 tonnes les exportations de mangues fraîches du Burkina Faso vers la sous région. Selon la même source, l'importance de la filière mangue pour l'économie nationale vient aussi du fait qu'elle fait fonctionner de petites unités de transformation et tout un réseau de démarcheurs et de transporteurs, constituant ainsi, une source de revenus pour des milliers de personnes à travers le pays. Dans les régions Ouest et Sud-Ouest du Burkina Faso où sa production est développée, la mangue constitue une source de revenu pour des milliers de producteurs et contribue à améliorer l'alimentation des populations locales. De ce fait, dans le cadre de la politique de développement des filières agricoles, la filière mangue a été retenue comme une des filières porteuses pour le Burkina Faso.

Aussi, l'ouverture du terminal fruitier de Bobo-Dioulasso en avril 2005 et l'implantation d'une usine de transformation de fruits, dont la mangue à Orodara, traduisent la place et l'importance de cette filière dans les Hauts Bassins et particulièrement dans la province du Kénédougou, souvent qualifiée de « verger du Burkina ». Cette province contribue en effet de façon significative à la production fruitière du Burkina Faso.

Les pertes post-récoltes de mangues

A l'instar des autres cultures, la mangue en Afrique, et particulièrement au Burkina Faso, est attaquée par de nombreux prédateurs, dont les phytopathogènes, les insectes, et les acariens (FAO, 1999). Les exportations de mangues fraîches du Burkina en direction de l'Union Européenne ont connu une baisse de l'ordre de 10% entre 1995 et 2002, due aux problèmes phytosanitaires (Dabiré, 2001; JUDICOME, 2004).

La mangue occupe la première place en terme de production et d'exportation de fruits au Burkina Faso. Sa production annuelle est d'environ 150000 tonnes dont 50000 tonnes de pertes (Fogue *et al.*, 1998). Ces pertes sont liées à plusieurs facteurs :

- les attaques parasitaires (mouches Tifridili), champignons (*Aspergillus*), insectes (fourmis) , (Dodd *et al.*, 1998 ; Vayssieres *et al.*, 2004);
- la mauvaise conservation : altérations physiologiques et mécaniques, microbiennes, enzymatiques et non enzymatiques (De Laroussilhe *et al.*, 1980) ;
- les mauvaises techniques de conditionnement qui accroissent les pertes lors des transferts des mangues sur les marchés.

Les infections fongiques latentes retrouvées dans la mangue sont celles causées par: *Alternaria Alternaria* (Prusky *et al.*, 1983), *Colletotrichum sp.* (Peterson, 1986), *Dothiorella sp.* (Johnson *et al.*, 1991) et *Subglutinans Fusarium* (Ploetz, 1994), lequel est présent dans la pousse penche et dans les différentes parties du panicule (Kumar, 1983). Ces contaminants latents peuvent altérer des parties cellulaires de tissu de la plante tel que le cortex, le phloème, le xylème et la moelle du parenchymateuse. Ils affectent la survie de la culture en diminuant la perméabilité de la membrane (Kumar, 1983).

3. Description générale du fruit (mangue)

La mangue est le fruit du manguier *Mangifera indica* L., un des arbres fruitiers les plus anciennement cultivés (De Laroushile, 1980).

Le manguier est une plante de la famille des Anacardiacees appartenant à l'ordre des Sapindales et qui serait originaire de l'Asie du Sud ou de l'archipel Malais (De Laroushile, 1980).

Selon De Laroushile (1980), la mangue est une drupe (fruit charnu), plus ou moins aplatie latéralement selon la variété. Sa forme est très variable (oblongue, réniforme, elliptique, ovoïde, cordiforme ou aplatie) avec à l'extrémité un bec qui peut être de différentes formes. Certaines variétés donnent des fruits qui peuvent avoir moins de 100 g pendant que d'autres donnent des fruits atteignant 1 kg. Des fruits de taille moyenne sont toutefois plus recherchés pour la commercialisation.

De l'extérieur vers l'intérieur, la mangue comporte plusieurs parties qui sont la peau ou épicarpe, la pulpe ou mésocarpe et le noyau ou endocarpe (Figure2).

La peau est assez mince chez les variétés cultivées et son épaisseur est généralement inférieure à 1 mm. Elle est de couleur verte, devenant jaune à jaune-verdâtre chez certaines variétés ou rouge-violacé, soit sur la totalité du fruit, soit par plage sur fond souvent jaune ou orange. Elle présente des lenticelles plus ou moins apparentes.

La pulpe ou mésocarpe est de couleur jaune-orangée, avec une fermeté variable selon la variété. L'endocarpe ou noyau est plus ou moins garni de fibres extérieures qui peuvent pénétrer dans la chair. Celles-ci sont plus ou moins nombreuses, dures et résistantes suivant les variétés. La figure 2 illustre les différentes parties de la mangue. La condition recherchée chez les variétés à grande valeur commerciale, est que même si les fibres se prolongent dans la chair, elles ne doivent pas constituer une gêne à la consommation.

A maturité, les mangues de certaines variétés dégagent une odeur marquée, leur chair est sucrée, très légèrement acidulée, avec une saveur variable. Les mangots (fruits des manguiers sauvages) sont en général très fibreux et ont un goût nettement prononcé de térébenthine. Malgré cela, ils sont très appréciés des populations locales. Ce goût de térébenthine persiste parfois quoique atténué chez certaines variétés sélectionnées.

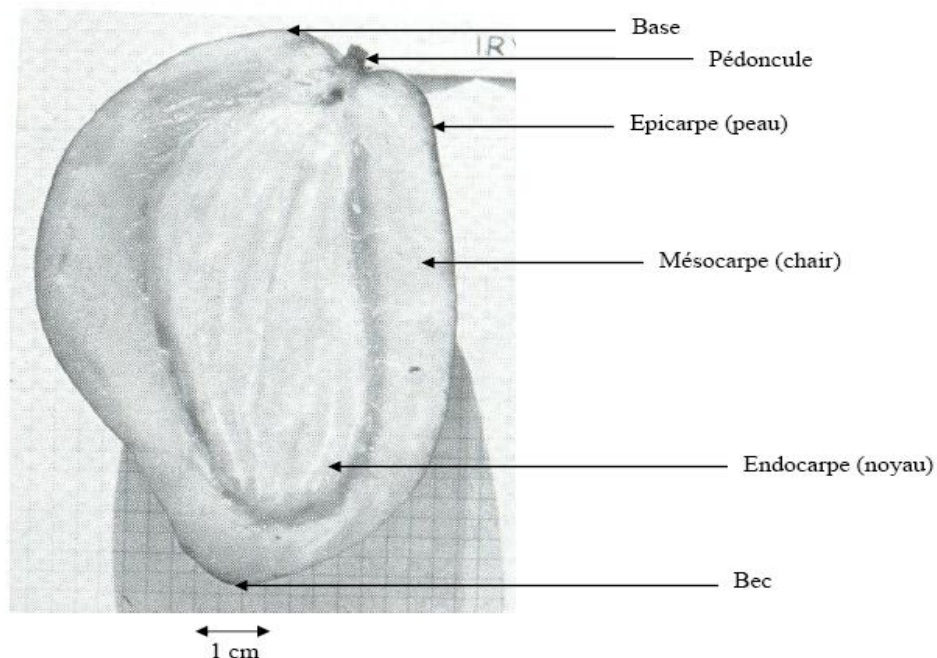


Figure 2 : Différentes parties d'une mangue (De Laroushile, 1980).

3.1 Caractéristiques des variétés

Selon Guira (2003), six variétés de manguiers greffés sont essentiellement cultivées dans les vergers du Burkina Faso. Il s'agit des variétés Amélie, Brooks, Kent, Keitt, Lippens et Springfield.

➤ **Amélie** est une variété à port ramassé en boule et à nouaison bonne et très étalée. C'est une variété de pleine saison. Ses fruits de forme arrondie ont un poids variant entre 300 et 600 g. Leur peau est de coloration vert-orange pendant que la chair de coloration orange-foncée est molle, fondante.

➤ **Brooks** est une variété à port étalé. Elle donne de fortes récoltes avec une nouaison abondante et groupée. C'est une variété tardive dont les fruits oblongs de 450 à 910 g, sont sans bec. La peau du fruit de couleur vert-jaunâtre, avec des lenticelles de taille moyenne, blanchâtres est résistante et épaisse. La chair de couleur jaune-brillant est ferme, moyennement aromatique et légèrement acidulée.

➤ **Keitt** est une variété tardive à production bonne et régulière. Les arbres de cette variété ont un port étalé avec de longues pousses. Ses fruits ovales, sont sans bec avec des poids moyens de 500 à 700 g. Cueillis à demi-coloration, ils mûrissent en 10 jours.

La peau du fruit, à fond jaune-orange est colorée en rose-carminé sur le côté au soleil avec de nombreuses lenticelles jaune-pâles à roux et une assez forte pruine lavande. Epaisse et assez résistante, la peau ne se sépare pas aisément de la chair qui est de couleur orange à jaune-foncée. La chair est relativement ferme, avec un nombre important de fibres de longueur moyenne près de la base du noyau, mais fines et non gênantes.

➤ **Kent** se caractérise par son port dressé à étalé avec des branches érigées peu ramifiées. Variété de fin de pleine saison, elle donne régulièrement de bonnes récoltes. Ses fruits ovoïdes sont sans bec, avec des poids moyens variant entre 440 et 740 g. La peau colorée de rouge-foncé cramoisi en plein ensoleillement avec une légère pruine grisâtre, a une coloration à fond jaune-verdâtre. Elle est épaisse et résistante et se sépare facilement de la chair. De couleur jaune intense à jaune-orange, la chair est de consistance moyenne, sans fibres avec une saveur moyennement aromatique.

➤ **Lippens** a un port étalé parfois érigé, avec un développement végétatif moyen et un feuillage peu épais. C'est une variété de saison qui a un bon rendement avec des fruits légèrement aplatis, avec un bec arrondi. Leur poids moyen est compris entre 200 et 350 g.

La peau est de coloration jaunâtre et la chaire juteuse. Les photos présentent un manguier (a) et les différents types de mangues (b).



Photos 1: Manguier (a) et fruits (b) (Banfora, Mai 2008. Prises par SOMDA K. Marius)

3.2 Composition et usage des mangues

La chair de la mangue contient de l'eau, des glucides (amidon, sucres, cellulose, pectines), des substances minérales, des lipides, des protéines et des esters. Elle contient aussi les vitamines A et C; sa valeur diététique est due essentiellement à sa teneur en sucres et en vitamines. L'amidon se transforme en sucres au cours de la maturation du fruit et il en reste peu dans le fruit mûr. Le tableau 1, établi par De Laroushile (1980), donne la teneur moyenne des différents éléments constitutifs de la chair de la mangue ainsi que sa valeur nutritive.

Les mangues sont consommées vertes ou mûres pour leurs propriétés nutritionnelles. Les mangues vertes sont utilisées pour la fabrication de condiments comme le « chutneys » et les « pickles » très connus en Afrique australe et en Inde (De Laroushile, 1980). Les fruits mûrs sont utilisés comme desserts, sorbets ou entrent dans la préparation de boissons et confitures.

Compte tenu de l'importance des pertes annuelles des fruits sur les exportations de mangue et au niveau des exploitations (baisse de la quantité et de la qualité de la production), un meilleur système d'exploitation serait nécessaire pour mieux gérer le secteur fruitier.

En effet, la valorisation des résidus de mangue constitue un enjeu primordial dans un pays comme le notre où la production agricole est concentrée sur des courtes périodes de récolte.

Tableau 1: Composition de la pulpe de mangue

Constituants	Teneur moyenne	
	<i>Mangue verte</i>	<i>Mangue mûre</i>
Eau (%)	90,0	86,1
Protéines (%)	0,7	0,6
Lipides (%)	0,1	0,1
Glucides (%)	8,8	11,8
Fibres (%)	1,2	1,1
Matières minérales (%)	0,4	0,3
Calcium (%)	0,01	0,01
Phosphore (%)	0,02	0,02
Fer (% mg/g)	4,5	0,3
Vitamines A (UI)	150	4800
Riboflavine (mg/100 g)	0,03	0,05
Thiamine (mg/100 g)		0,04
Vitamine C (mg/100 g)	3	13
Acide nicotinique (mg/100 g)		0.3
Valeurs en calorie pour 100 g	30	50 - 60

Source : (De Laroushile, 1980)

Par ailleurs, des techniques de conservation et de transformation ont été développées par certaines structures telles CEAS (Centre Ecologique Albert Schweitzer), STATION MAYA etc., afin de mieux valoriser ce fruit. Mais cela s'avère insuffisant compte tenu du faible taux d'exportation. Environ 3000 tonnes de mangues fraîches ont été exportées vers l'Europe en 2002, sur une production annuelle d'environ 150000 tonnes dont 1/3 de pertes (Rey *et al.*, 2004).

Ainsi les résidus de mangue considérés comme déchets agro-industriels, peuvent constituer une importante source de biomasse pour la production de bioéthanol.

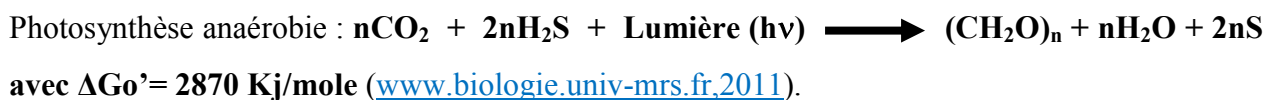
II. BIOMASSE ET BIOETHANOL

1. Définition et sources de biomasse

La biomasse est l'ensemble de la matière organique d'origine végétale, animale ainsi que les sous-produits de transformation (Beer *et al.*, 2006).

Dans le domaine de l'énergie, le terme de biomasse regroupe l'ensemble des énergies provenant de la dégradation de la matière végétale. Le terme «biomasse» désigne également l'énergie récupérable à partir de différentes matières organiques (bois, déchets, cultures), par combustion ou par tout autre procédé (<http://www.actu-environnement.com,2011>). La biomasse est une énergie renouvelable tant que sa consommation ne dépasse pas l'accroissement biologique.

Cette biomasse d'origine végétale provient initialement de l'activité photosynthétique nécessitant de l'énergie :



En effet la biomasse formée par photosynthèse peut constituer une fraction biodégradable générant à nouveau de l'énergie :

On distingue trois constituants principaux, auxquels correspondent des procédés de valorisation spécifiques :

- La biomasse lignocellulosique, ou lignine, constituée par : le bois et les résidus verts, la paille, la bagasse de canne à sucre, le foin. La valorisation se fait plutôt par des procédés par voie sèche, dits conversions thermo-chimiques.

- La biomasse à glucides, riche en substances glucidiques facilement hydrolysables : céréales, betteraves sucrières, cannes à sucre, résidus agro-industriels. La valorisation se fait plutôt par fermentation ou par distillation dits conversions biologiques.
- La biomasse oléagineuse, riche en lipides : colza (*Brassica napsus*), palmier à huile (*Eleae guineensis*) dont la valorisation se fait par extraction.
(<http://www.biomassenergycentre.org.uk,2011>)

2. BIOETHANOL

2.1 Définition et historique

Le bioéthanol se définit comme de l'alcool produit par synthèse chimique à partir d'hydrates de carbones, ou par fermentation à partir de la biomasse. Seule cette deuxième façon de procéder mérite l'appellation bioéthanol (Perréon-Delamette, 2004). Le bioéthanol connaîtra un essor avec le développement de l'automobile. Ainsi lorsque Henry Ford conçut son modèle T de véhicule au début du 20^{ème} siècle, il pensait que l'éthanol, produit à partir de matières biologiques renouvelables, serait la principale source d'énergie dans les transports. Après la première guerre mondiale et jusqu'en 1944, la consommation de bioéthanol comme carburant a été significative et comprise entre 1 million et 2 millions d'hectolitres par an, avec un pic à 4 millions d'hectolitres en 1936 (Pasty, 2004).

Aujourd'hui, d'excellentes perspectives sont notées pour le bioéthanol suite aux soucis de la dégradation de l'environnement et celui de l'épuisement des énergies fossiles comme le pétrole ou le gaz. Il est probablement la source d'énergie alternative la plus utilisée au monde (Agores, 2001). Le Brésil a décidé de produire un combustible à base de canne à sucre. En Amérique du Nord le bioéthanol est utilisé comme agent améliorant l'indice d'octane pour l'essence (Oestling, 2001).

2.2 Production de bioéthanol par voie fermentaire

La production d'éthanol est contrôlée par différents facteurs qu'on peut regrouper en trois catégories : la matière première ; les microorganismes et les technologies de mise en œuvre.

**La matière première* : elle doit être un substrat riche en sucres susceptibles d'être fermentés (saccharose, glucose, fructose ou des composés cellulosiques ou amylacés).

Industriellement, les principales sources de matières premières les plus utilisées sont : les jus de betterave, les mélasses de canne à sucre ou de betterave, les égouts de sucrerie et les jus d'hydrolyse de diverses céréales (blé, maïs, riz et seigle).

**Les microorganismes*: plusieurs microorganismes interviennent dans ce processus de production de bioéthanol. Ce sont les levures et bactéries des genres tels que : *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Bacillus*. Parmi les levures utilisées dans ce processus de fermentation figure l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

**La fermentation* : c'est un processus de transformation biochimique au cours duquel un substrat organique subit des changements chimiques, provoqués par l'action des enzymes produit par les micro-organismes (Jay, 1996). A partir de cette opération biochimique, l'éthanol va être fabriqué. Cette opération de fermentation est l'étape la plus importante dans le procédé de production du bioéthanol. Cette fermentation est étayée par l'équation de fermentation du glucose suivante :



**La distillation* : elle consiste à récupérer du milieu réactionnel, l'alcool qui s'y trouve. C'est l'étape la plus coûteuse dans la fabrication de l'alcool et qui permet de récupérer l'éthanol provenant de la fermentation (Cardona et Sanchez, 1997).

2.3 Utilisation du bioéthanol

L'alcool d'origine agricole (par voie fermentaire) est largement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire, dans les industries chimiques, pharmaceutiques et parapharmaceutiques (parfumerie). Egalement il peut être utilisé sous forme d'éthanol hydraté, éthanol anhydre en mélange avec l'essence, le diesel, l'ETBE (éthyl-tertio-butyl-éther) ou l'estérol.

Actuellement, les principaux pays producteurs d'alcool sont le Brésil, les Etats-Unis et la France (Fargione *et al.*, 2008). Le tableau 2 présente la production du bioéthanol et autres formes de biocarburant.

Tableau 2 : Différents types de biocarburant et leur production sur le plan international

Carburant de base, biomasse	Régions dominantes	Sous-produits	Production brute P_B (tep/ha)	Rendement énergétique R_E= P_N/P_B	Production nette (tep/ha)	Gain GES (%)
Ethanol						
Canne à sucre	Brésil	Bagasse	2,28 a, c	0,81 e	1,8	87h
Betterave	Europe	Pulpes	2,53 a, c	0, 23 f	0,6	32h
Blé	Europe	Drèches	0,48 a, c	0, 23 f	0,1	30h
Maïs	Etats-Unis	Drèches	0,98 a, c	0, 20 g	0,2	12g
Huiles						
Colza	Europe	Tourteau	0,98 b,d	0, 60 f	0,6	39h
Soja	Etats-Unis, Brésil, Argentine	Tourteau	0,43 a, d	0, 48 g	0,2	41g
Palmier à huile	Tropicales	Tourteau	3, 50 a, d	0, 89 e	3,1	70j

PB : production brute d'éthanol ou d'huile par hectare, en valeur énergétique ; **PN** : production énergétique nette par hectare (production brute diminuée de la quantité d'énergie nécessaire, corrigée de la contribution des sous-produits) ; **tep** : tonnes équivalent pétrole. Le gain en gaz à effet de serre (**GES**) est la diminution, exprimée en %, de dégagement de GES quand on utilise le biocarburant au lieu d'essence (cas de l'éthanol) ou de gazole (huiles), sans tenir compte du changement d'usage des sols.

Sources d'informations : **a**/FAO (2008) valeurs mondiales; **b**/ Ballerini (2006); **c**/ 0,5 tep pour 1 000 litres ; **d**/ 0,787 tep pour 1 000 litres ; **e**/ FAO (2008) moyenne de la fourchette; **f**/ Concawe et al. (2007); **g**/ Hill et al. (2006); **h**/ Gosse (2008); **i**/ Fargione et al. (2008).

2.3.1 Avantages de l'utilisation du bioéthanol comme biocarburant

- L'éthanol en remplaçant le plomb dans l'essence, réduit les émissions de particules, notamment de particules fines qui constituent une menace pour la santé des enfants, des personnes âgées ainsi que des personnes atteintes de troubles respiratoires.
- Il est également utilisé à la place du benzène dans l'essence (produit toxique cancérigène, extrait de l'essence),
- L'éthanol est non toxique, soluble dans l'eau et rapidement biodégradable.
- La plupart des obstacles à l'incorporation du bioéthanol dans les carburants fossiles peuvent facilement être surmontés.

2.3.2 Inconvénients de l'utilisation du bioéthanol comme biocarburant

L'utilisation du bioéthanol comme biocarburant présente des atouts mais également des inconvénients en certains points de son application :

- Du point de vue écologique, le principal inconvénient des carburants additionnés de bioéthanol est la formation accrue d'acétaldéhyde (Oestling, 2001). L'acétaldéhyde peut contribuer à la formation de brouillard photochimique lorsqu'il réagit avec d'autres substances à base de carbone organique volatile présentes dans l'air.
- La formation de nitrates de peroxyacétyle (PAN) moins nocifs que le formaldéhyde peut aussi advenir lors du mélange essence /bioéthanol.
- Le mélange avec le bioéthanol est moins énergétique que les carburants provenant du pétrole ; en plus il est corrosif (Mustafa *et al.*, 2008).

L'optimisation et l'intensification de la production de bioéthanol à partir de la biomasse végétale nécessite la recherche de souches microbiennes performantes et mieux adaptées. A cet effet il s'avère nécessaire de faire le screening des microorganismes ayant un potentiel de biotransformation et d'étudier leurs propriétés physiologiques.

III. PHYSIOLOGIE ET METABOLISME DES MICROORGANISMES IMPLIQUES DANS LA PRODUCTION DE BIOETHANOL

1. Taxonomie et morphologie des bactéries du genre *Bacillus*

Ce groupe de bactéries joue un rôle important dans l'hydrolyse des polysaccharides en sucres simples.

Les bactéries du genre *Bacillus* de la famille des *Bacillaceae* regroupent environ 70 espèces bactériennes. Ce sont des bacilles à Gram positif, aérobies à anaérobies. Leur culture sur milieu solide se caractérise par des colonies polymorphes, productrices de catalase.

Ce sont des souches sporulantes dont l'extrême résistance des spores leur confère un caractère ubiquiste. Les espèces appartenant au genre *Bacillus* constituent un ensemble de souches génétiquement et phénotypiquement très hétérogène selon Combet-Blanc (1995).

Les morphologies des sporanges et de la spore sont des critères importants du point de vue de la systématique. Gordon *et al.* (1973) en fonction de ces critères; proposent de classer les espèces appartenant au genre *Bacillus* en trois groupes :

- Le groupe 1 comprend les espèces dont les spores sont ellipsoïdales et ne déforment pas le sporange, mais la cellule mère contient la spore;
- Le groupe 2 comprend les espèces dont les cellules ont également des spores ellipsoïdales mais déformant le sporange;
- Le groupe 3 comprend les espèces dont les spores sont sphériques et déformant le sporange. Ce classement a été en grande partie conforté par les études nutritionnelles.

Les espèces du genre *Bacillus* ne sporulent que dans certaines conditions physiologiques et, d'une manière générale, en fin de phase de croissance. De plus, la proportion des cellules sporulées varie considérablement suivant l'espèce et même suivant la souche. Les spores diffèrent des cellules végétatives par leur réfringence optique, leur composition chimique et leur résistance aux agents physiques et chimiques. Chez certaines souches, l'aptitude à sporuler peut être perdue après une série de repiquages successifs (Combet-Blanc, 1995).

Les bactéries du genre *Bacillus* produisent des α -amylases et β -amylases permettant de dégrader les polymères glucidiques en glucose et en des molécules voisines telles :

fructose, mannose, galactose, tréhalose, saccharose... (Olsen, 2001). L'habitat primaire des *Bacillus* est le sol, mais on les retrouve dans les aliments où ils jouent des rôles utiles à néfastes (Guiraud, 1998; Buchaman et Gibbous, 1975).

2. Taxonomie et morphologie des levures

2.1 Définition et caractéristique des levures

Les levures peuvent être définies comme des champignons unicellulaires mésophiles, de forme ovoïdes se reproduisant par bourgeonnement ou fission, douées de pouvoir fermentaire. Elles sont capables d'assimiler un grand nombre de substrats carbonés mais incapables d'utiliser l'amidon. Elles sont aérobies et anaérobies facultatives (Kreger-Van Rij, 1984).

Les champignons levuriformes sont des protistes eucaryotes unicellulaires, capables de se développer en saprophytes ou en parasites sur presque tous les milieux, tout comme certaines bactéries. Ce sont des micro-organismes hétérotrophes et l'absence de chlorophylle, les différencie à la fois des algues et des végétaux (Guiraud *et al.*, 1984; Konlani *et al.*, 1996).

Les cellules végétatives sont polymorphes et leur taille varie selon les espèces. Certaines espèces peuvent former des associations cellulaires (pseudo mycélium) ou se présenter sous forme de filaments (mycélium) à un certain stade de leur vie, elles sont ubiquistes dans la nature et la majorité est non pathogène (Larpen et Larpen, 1990).

Les levures sont des micro-organismes chimio-organotrophes à métabolisme respiratoire et fermentaire ; capables de se développer dans des conditions extrêmes. (Leclerc *et al.*, 1995). Elles se multiplient par un processus asexué (mitose) qui s'effectue par bourgeonnement dans la plupart des cas ou par scissiparité pour quelques espèces (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) ou encore par un processus intermédiaire de sporulation (Larpen et Larpen, 1990).

Les caractéristiques les plus importantes pour les levures d'après Bouix *et* Leveau (1993) sont:

- une fermentation rapide mais sans excès de croissance en biomasse ;
- une bonne conversion du glucose en alcool (éthanol);

- une résistance à la pression osmotique;
- un caractère floculant et éventuellement une bonne stabilité génétique dans le temps.

2.2 Classification des levures

Les levures appartiennent au groupe des champignons supérieurs et se répartissent essentiellement en trois classes : les basidiomycètes, les ascomycètes, les deutéromycètes. La classification de référence est celle de Lodder (1971) et Kreger Van Rij (1984). Elle est basée sur les caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et nutritionnels des levures.

2.3 Multiplication des levures

La reproduction végétative des levures se déroule généralement par bourgeonnement ou scissiparité (processus asexué) et dans certaines conditions une reproduction sexuée peut être induite avec alternance d'un cycle sporal, c'est-à-dire une phase haploïde et une phase diploïde, (Leclerc *et al.*, 1995).

2.3.1 Multiplication végétative asexuée

A l'exception de quelques genres, les bourgeons apparaissent dans des zones à proximité des extrémités des grands axes des cellules. Certaines espèces de levures sphériques sont caractérisées par un bourgeonnement multilatéral. Il ne se produit pas deux bourgeonnements au même site, exception faite du bourgeonnement bipolaire (Leclerc *et al.*, 1995).

2.3.2 Reproduction sexuée

Lorsque le milieu devient défavorable (peu de nutriments) les levures cessent de se multiplier par bourgeonnement et sporulent. Les levures sont des eucaryotes diploïdes donc présentent les caractéristiques de la division cellulaire mitotique. Seule la membrane nucléaire persiste, ce qui aboutit à la formation de l'asque contenant les ascospores. Ces ascospores sont de deux types « **a** ou **α** », chacun d'entre eux après libération de l'asque peut se développer en cellule haploïde par bourgeonnement.

La fusion d'une cellule **a** avec une cellule **α** conduit à la formation d'un zygote qui est diploïde **aα**. Ce dernier peut à son tour se multiplier par bourgeonnement ou sporuler selon les conditions du milieu (Leclerc *et al.*, 1995).

3. Aspects physiologiques et métaboliques

Les levures ont un métabolisme de type fermentatif ou oxydatif selon l'espèce considérée et les conditions de culture. La première étape de transformation du glucose suit la voie d'Embden Meyerhof Parnas (EMP) aussi appelée glycolyse.

Cette étape qui se déroule dans le cytosol est commune pour la respiration et la fermentation. Elle comprend une série de dix réactions, chacune catalysée par une enzyme spécifique.

La glycolyse conduit à la formation de deux molécules de pyruvate à partir duquel les voies de respiration ou de fermentation seront activées.

3.1 La glycolyse

La glycolyse est la séquence de réactions enzymatiques conduisant à la transformation dans le cytosol, du glucose en pyruvate. La première étape de la glycolyse chez la levure *S. cerevisiae* implique le transport du glucose du milieu extérieur à travers la membrane. Ce transport se fait par diffusion facilitée c'est-à-dire qu'il se fait selon le gradient de concentration à l'aide d'une perméase. L'étape de transport exerce un niveau important de contrôle sur le flux glycolytique chez cette levure et est extrêmement complexe. Au moins 17 gènes HXT (hexose transporter) ont été identifiés (Kruckeberg, 1997). Ils codent pour des transporteurs qui ont des affinités différentes pour le glucose avec un transport régi cinétiquement par des caractéristiques enzymatiques. Ainsi par exemple les HXT 1 et 3 auraient une faible affinité pour le glucose et interviendraient lorsque la concentration en glucose dans le milieu serait élevée alors que les HXT 6 et 7 auraient une forte affinité et interviendraient quand la concentration en glucose serait faible. HXT4 aurait une affinité intermédiaire et HXT 2 une affinité dépendante des conditions de croissance.

Toutefois la procédure expérimentale pour mesurer et interpréter les cinétiques de transport du glucose reste encore le sujet d'un débat continu (Teusink *et al.*, 1999).

Le glucose est dégradé par la voie de la glycolyse ou encore voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) caractérisée par un intermédiaire qui est le fructose-1,6-biphosphate (FBP). La synthèse de cet intermédiaire nécessite 2 ATP (voire figure 3).

Une aldolase rompt ensuite la molécule de FBP en deux trioses phosphate : le D-glycéraldéhyde-3 phosphate (G3P) et le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en équilibre l'un avec l'autre grâce à la triose-phosphate-isomérase.

La partie suivante comporte une oxydation et deux étapes formatrices d'ATP. Elle transforme le G3P en 1,3-bisphosphoénolpyruvate et du pyruvate. La transformation du G3P en acide pyruvique engendre 2 ATP.

Comme chaque molécule de glucose donne deux trioses phosphate, sa transformation en deux molécules de pyruvate produit 4 ATP, soit un gain net de 2 ATP. Le bilan énergétique est positif même si les oxydations s'arrêtent au stade du pyruvate ; cependant 2 molécules de NAD^+ ont été transformées en NADH au cours de l'oxydation catalysée par la glycéraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase et doivent être régénérées.

Il s'agit d'un des impératifs des cellules : outre faire de l'ATP et récupérer des intermédiaires utiles aux synthèses (6 précurseurs métaboliques sont synthétisés au cours de la glycolyse : G6P, F6P, PEP, pyruvate, DHAP et PGA), la cellule doit reoxyder tous ses coenzymes réduits. Cela se déroule dans la chaîne respiratoire dans le cas d'un métabolisme oxydatif et grâce à la réduction du pyruvate en éthanol dans le cas d'un métabolisme fermentaire en anaérobiose. La figure 3 illustre les différents mécanismes.

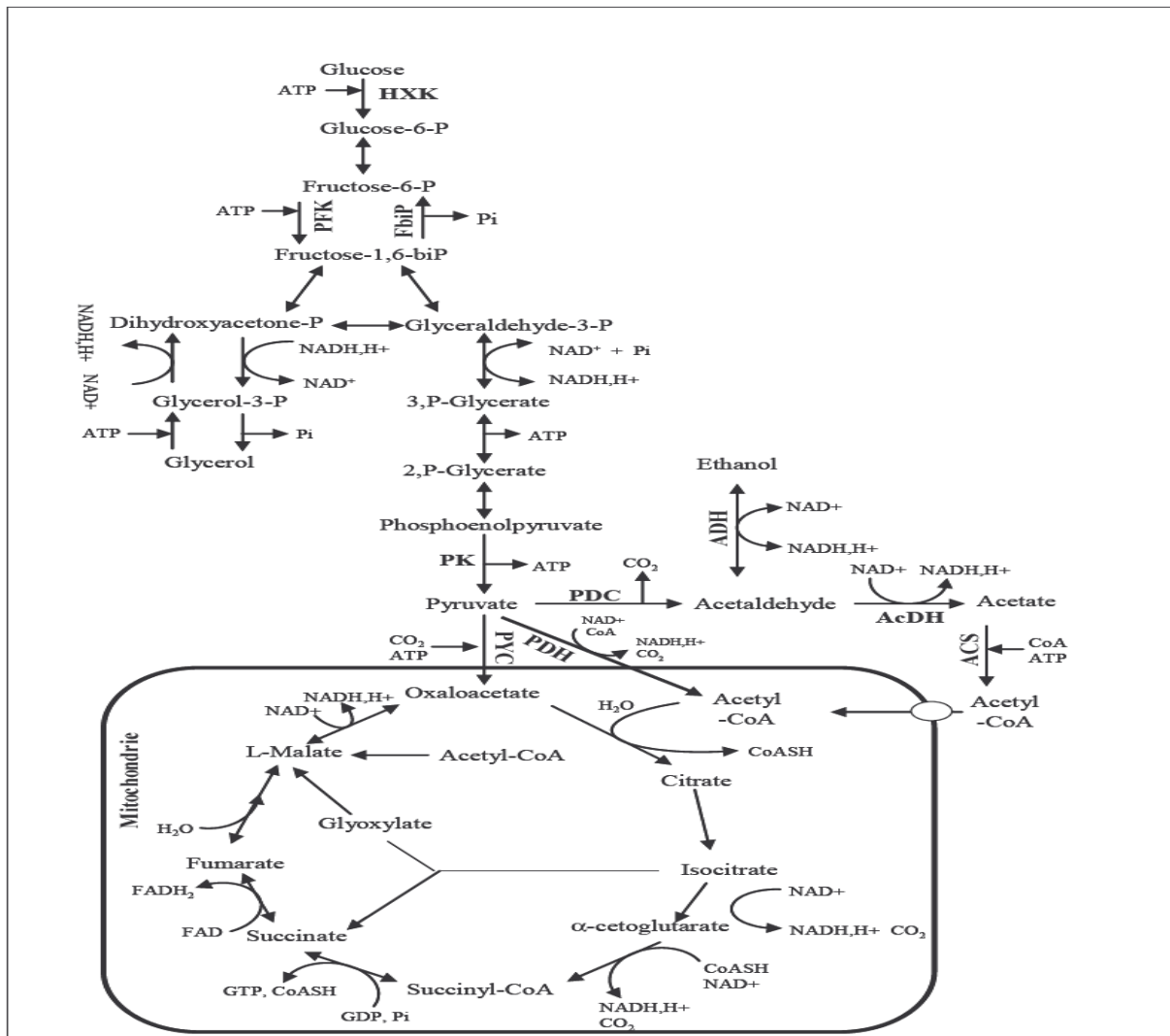
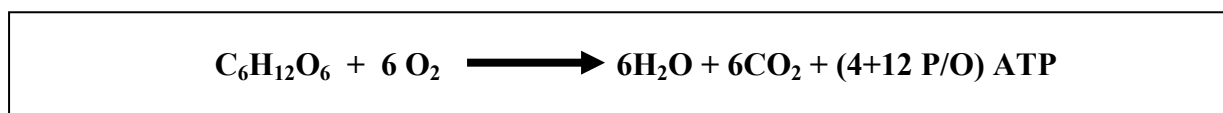


Figure 3 : Schéma métabolique de la glycolyse et du cycle de Krebs (Poilpré, 2002).

3.2 Le métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif du glucose aboutit à son oxydation complète en H₂O et CO₂ au travers de la glycolyse, du cycle de krebbs et de la phosphorylation oxydative. Le bilan énergétique s'écrit ainsi :



Avec **P/O** nombre de moles d'ATP formées par atome d'oxygène consommé.

Le rendement de la conversion du glucose en biomasse en métabolisme oxydatif dépend de la souche. Guillou (1996) a fourni une équation permettant de calculer les besoins théoriques de l'anabolisme pour la synthèse de 1 g de cellules d'après la composition de la levure en protéines, en acides nucléiques, en lipides et en hydrates de carbone :



Le rendement théorique limite correspondant à cette équation est $Y_{x/s} = 0,73 \text{ gXg}^{-1}$. Cependant les rendements pratiques les plus élevés obtenus sont de l'ordre de $0,5 \text{ gXg}^{-1}$.

La régénération des coenzymes réduits NADH et FADH_2 produits dans la voie de la glycolyse et le cycle de Krebs se fait dans la chaîne respiratoire.

L'efficacité de la chaîne respiratoire est illustrée par le rapport P/O qui représente le nombre de moles d'ATP formées par atome d'oxygène consommé.

Il est également variable selon la souche de levure considérée. La valeur du rapport P/O est fréquemment sujette à discussion. Pour *Saccharomyces cerevisiae*, un nombre inférieur à 2 est souvent rapporté (Bruinenberg *et al.*, 1985).

3.3 Le métabolisme fermentaire

En anaérobiose la cellule est privée d'un excellent accepteur d'électron : l'oxygène. En l'absence de celui-ci, la cellule utilise d'abord un accepteur intermédiaire d'électrons autre que le NAD^+ qui est transformé en NADH. Elle doit cependant pour régénérer les NAD^+ , fabriquer son accepteur final qui dérive du substrat de départ.

Il s'agit principalement de l'éthanol pour la levure. La réduction finale de l'acétaldéhyde en éthanol permet ainsi de maintenir l'équilibre de la balance redox en réoxydant les NADH produits au cours de la glycolyse.

L'éthanol est rejeté dans le milieu. Le glucose est utilisé comme source d'énergie puisque de l'ATP est formé en excédent. Mais le rendement est médiocre car chaque molécule de glucose aboutit à la formation de 2 molécules d'ATP alors que son oxydation complète en CO_2 et H_2O par le métabolisme oxydatif aboutit à presque 19 fois plus d'ATP (Cette voie est fonction du type de cellule impliquée).

La fermentation est en fin de compte le compromis trouvé par la cellule, moyennant des oxydations incomplètes et une perte de matière carbonée tout en régénérant leurs NAD^+ . Le bilan énergétique de la transformation du glucose en éthanol s'écrit :



Le rendement théorique limite $Y_{p/s}$ de cette conversion est de 0,51 gramme d'éthanol par gramme de glucose.

Ce rendement ne tient pas compte du fait qu'une partie du glucose est convertie en anaérobiose et transformée en biomasse (environ 0,1 g/g d'après Kapelli, 1986). Les rendements pratiques $Y_{p/s}$ sont en général moins élevés de l'ordre de 0,4 g/g.

D'autres produits secondaires sont aussi formés au cours de la fermentation comme l'acétate, le succinate et surtout le glycérol. La formation de ce dernier semble illogique d'un point de vue énergétique puisqu'elle dévie une partie du flux de carbone de la portion de la voie EMP productrice d'énergie. Schulze (1995) explique la synthèse par le déséquilibre que crée l'anabolisme sur la balance redox. Car si les NAD^+ consommés dans la voie EMP, est équilibrée par la réaction finale de formation de l'éthanol à partir de l'acétaldéhyde, la consommation des intermédiaires pour l'anabolisme déséquilibre la balance vers une accumulation NADH.

La production de glycérol permettrait d'oxyder les coenzymes réduits et d'équilibrer la balance redox au détriment d'une dissipation d'énergie.

La production de l'acétate et du succinate accentue également le déficit de la balance redox et leur production serait également à l'origine de la production d'une partie du glycérol (Schulze, 1995). Le glycérol produit aurait en outre un rôle protecteur et osmorégulateur dans la cellule (Mager et Varela, 1993).

3.4 Le métabolisme oxydo-réductif

Ce type de métabolisme engendre souvent la production d'éthanol en présence d'oxygène et celle-ci, peut avoir plusieurs explications :

- Effet Crabtree observé sur les levures Crabtree positives. Une levure sera considérée comme « Crabtree positive » si on observe pour de fortes concentrations de glucose une répression de son métabolisme oxydatif et donc une formation d'éthanol.

- En culture continue, Fiechter et *al.* (1981) ont démontré qu'il existait chez *Saccharomyces cerevisiae* un taux de dilution critique au-delà duquel la levure commence à produire de l'éthanol. Ce taux dépend fortement de la souche utilisée et du mode opératoire utilisé;

- Bardford en 1990 attribue le passage du métabolisme oxydatif au métabolisme oxydo-réductif à une capacité respiratoire limite des microorganismes;

- Lei *et al.* (2001) fournit une autre interprétation du shift du métabolisme des levures (oxydatif / oxydo-réductif) basée sur le phénomène d'overflow au niveau des nœuds pyruvate et acétaldéhyde. Au niveau du nœud pyruvate, l'enzyme pyruvate désydrégénase à une affinité plus forte pour le pyruvate que l'enzyme pyruvate décarboxylase, mais sa vitesse maximale est plus faible. Aux faibles flux glycolytiques, le pyruvate est converti via la pyruvate désydrégénase vers le cycle de krebb. Quand le flux glycolytique dépasse une valeur critique, la pyruvate désydrégénase est saturée et l'acétaldéhyde est formé. Il en est de même au niveau du noeud acétaldéhyde. Celui-ci est préférentiellement converti en acétate mais lorsque l'acétaldéhyde désydrégénase est saturée, l'acétaldéhyde serait transformé en éthanol. La figure 4 illustre les voies métaboliques de respiration et de fermentation.

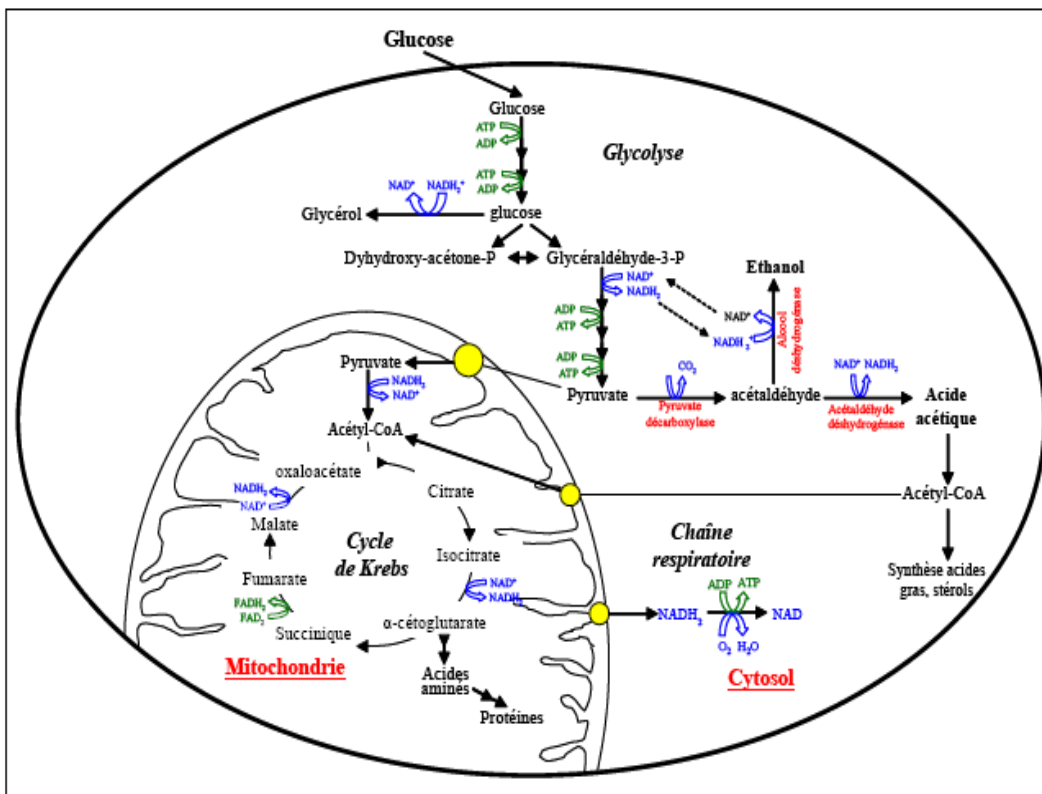


Figure 4 : Schéma récapitulatif des voies métaboliques (respiration et fermentation) et voies annexes pouvant conduire à la production des sous-produits

(Castro-Martinez, 2007).

3.5 Voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates illustrée dans la figure 5 part du glucose-6-phosphate avec deux oxydations successives aboutissant au ribulose-5-phosphate. A partir de celui, il se produit deux isomérisations qui fournissent les intermédiaires essentiels que sont le ribose-5-phosphate et le xylulose-5-phosphate. Une succession d'échanges de chaînons carbonés a lieu à partir du ribose-5-phosphate et du xylulose-5-phosphate, catalysés par des transaldolases et transcétolases et aboutissant au fructose-6-phosphate et à un triose-3-phosphate.

L'intérêt de la voie des pentoses phosphates pour le microorganisme est la fabrication de deux métabolites essentiels :

Le ribulose-5-phosphate (matière première pour la synthèse des acides nucléiques également intermédiaire essentielle chez les organismes photosynthétiques qui fixent le CO₂ par le Cycle de Calvin) et l'érythrose-4-phosphate (précurseur du noyau aromatique dans les acides aminés aromatiques : phenylalanine, tyrosine et tryptophane). Cette voie est également la source de NADPH, agent réducteur requis pour certaines synthèses (exemple : les lipides).

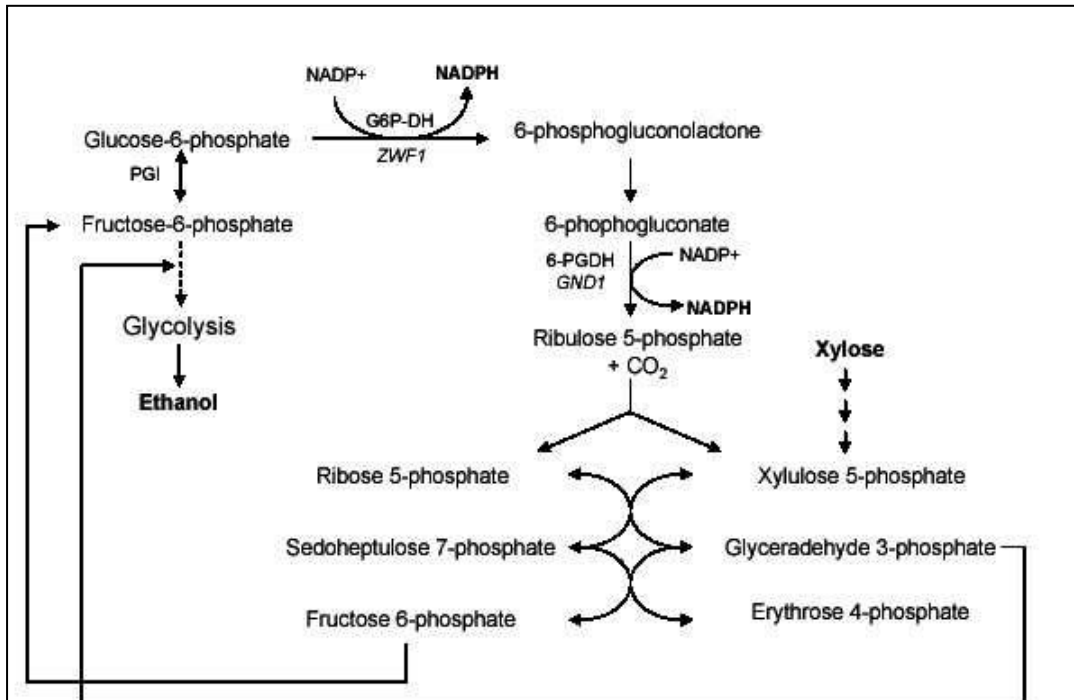


Figure 5 : Schéma métabolique simplifié de la voie des pentoses phosphates.

(Ben-Chaabane, 2006).

4. Besoins nutritionnels

Les levures nécessitent différents substrats pour leur développement. Ces substrats selon leur concentration dans le milieu de culture et leur nature vont avoir un effet activateur ou inhibiteur sur la croissance.

4.1 Assimilation de sources de carbone

Les composés carbonés représentent la source de carbone et d'énergie pour les microorganismes. Les fermentations alcooliques se font sur des milieux riches en sucres.

Les levures du genre *Brettanomyces* peuvent fermenter le glucose, le saccharose, le maltose, le tréhalose, le cellobiose et le lactose (Smith et Van Grinsven, 1984).

Par contre, le genre *Saccharomyces* n'a pas la capacité à fermenter le lactose, le melibiose, la cellobiose, ni les sucres à 5 atomes de carbone comme la xylose ou l'arabinose (Jones *et al.*, 1981). Ces deux genres de levures peuvent assimiler l'éthanol, l'acide lactique, l'acide succinique, entre autres.

En ce qui concerne les mécanismes d'assimilation des sucres, selon Gaunt *et al.* (1988), chez certaines levures comme *Brettanomyces anomalus* le glucose pénètre par transport actif; alors que pour Gancedo et Serrano (1989) le transport du glucose se fait par diffusion facilitée comme chez *Saccharomyces*. Géros *et al.* (1997) ont mis en évidence deux types de transporteurs du glucose chez les levures (précisément *Dekkera anomala*): un transporteur de faible affinité qui accepte aussi le fructose et un transporteur à haute affinité qui accepte le galactose, mais pas le fructose.

Les levures du genre *Saccharomyces* peuvent également croître en présence de l'éthanol comme source de carbone, mais il faut d'abord transformer l'éthanol en acétate. Elles peuvent aussi utiliser l'acide acétique comme source carbonée jusqu'à 3% v/v pour des valeurs de pH comprises entre 3 à 6 (Géros *et al.*, 2000).

4.2 Assimilation des sources d'azote

L'azote représente environ 10% du poids sec de la cellule. Il joue un rôle capital car il entre dans la constitution de molécules simples (acides aminés, nucléotides, vitamines et coenzymes) essentielles au fonctionnement cellulaire.

Les études menées par Ribéreau-Gayon *et al.* (1998) sur *Saccharomyces ellipsoideus* ont montré que plus les levures sont riches en azote, plus forte est leur activité fermentaire et au contraire plus faible est leur activité respiratoire. Cela pourrait s'expliquer par la forte synthèse d'enzymes impliquées dans le processus de fermentation. L'azote peut être utilisé par les levures sous plusieurs formes (inorganique ou organique).

Les levures comme *Brettanomyces bruxellensis* et *B. intermedius* ont la capacité d'utiliser les nitrates contrairement aux genres *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*... pour lesquels la seule source d'azote inorganique assimilée est l'ion ammonium (Larpent, 1991).

L'espèce *Brettanomyces anomalus* possède les enzymes nitrate réductase et nitrite réductase. Cependant, ces enzymes sont inhibées par un excès d'ammonium, ce qui favorise l'utilisation de sources d'azote organique plutôt que minéral.

En règle générale, le sulfate d'ammonium et le phosphate di-ammonique sont les sels les plus utilisés comme source d'azote, puisqu'ils apportent en même temps le soufre et le phosphore nécessaire à la cellule (Brock, 1970). Enfin, l'utilisation et l'assimilation de l'azote ammoniacal et de l'azote aminé varient selon la levure utilisée et sont affectées par de nombreux facteurs à savoir, l'aération, la concentration de substrat carboné, ainsi que par la propre concentration de la source azotée.

Les études réalisées par Aguilar-Uscanga *et al.* (2000) sur les besoins nutritionnels de *Saccharomyces cerevisiae*, et de *Brettanomyces bruxellensis* ont mis en évidence que le sulfate d'ammonium a une influence significative sur la consommation de glucose, la croissance et la production d'éthanol. Dans leurs conditions expérimentales, ces auteurs ont observé un effet inhibiteur sur la croissance de ces levures lorsque la concentration en sulfate d'ammonium excède 2 g/L.

4.3 Assimilation du phosphore

Le phosphore est nécessaire pour la croissance de la levure et pour la fermentation. Il est assimilable par la levure sous forme de phosphate par un mécanisme de transport actif (Jones *et al.*, 1981). Le rôle du phosphore est de maintenir l'intégrité de la paroi cellulaire; il participe aussi dans la synthèse de lipides et carbohydrates.

L'ion phosphate n'apparaît pas généralement comme limitant pour le développement de *Saccharomyces cerevisiae*. Il semble que cet ion soit apporté en quantité suffisante dans les milieux de fermentation « naturels » ou par l'extrait de levure dans les milieux synthétiques. Ainsi, *Saccharomyces cerevisiae* peut être considérée comme une levure peu exigeante sur le plan nutritionnel (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000).

4.4 Utilisation des oligo-éléments, vitamines et facteurs de croissance

Les oligo-éléments sont essentiels pour la cellule, puisqu'ils réagissent comme cofacteurs de diverses enzymes impliquées dans le métabolisme microbien. Ils sont nécessaires en très petites quantités mais un excès peut provoquer une dénaturation d'enzymes, une perturbation de la morphologie et de la physiologie cellulaire, ainsi que de la vitesse de croissance (Blackwell *et al.*, 1995).

Par rapport aux facteurs de croissance, la plupart des levures sont considérées comme auxo-autotrophes, puisqu'il a été montré qu'elles peuvent toujours avoir une croissance en l'absence complète de vitamine. Cependant la présence de ces vitamines est positive. Par exemple, en milieu carencé en thiamine, la population levurienne finale est très faible (10% de la population normale) et la transformation des sucres est extrêmement lente. De même en ce qui concerne la biotine, Castro-Martinez (2007) a montré que son absence retarde beaucoup plus la fermentation de sucre que la croissance.

5. Influence des paramètres environnementaux sur les microorganismes

La croissance microbienne est influencée par les constituants du milieu de culture et par les facteurs physico-chimiques (température, pH, oxygène, etc...). Donc la connaissance de ces facteurs environnementaux pour une levure donnée va permettre de connaître sa distribution écologique et de contrôler son développement.

5.1 Effet de la température

La température est un facteur qui affecte profondément les micro-organismes, comme tous les êtres vivants. En effet, les microorganismes sont particulièrement sensibles à la température parce qu'ils sont unicellulaires et que leur température varie avec celle du milieu extérieur. Il est donc important de connaître les effets de la température sur la croissance du microorganisme et la thermosensibilité des réactions catalysées par les enzymes. Aux faibles températures ($T < 10^{\circ}\text{C}$), l'activité cellulaire microbienne peut être totalement bloquée. Par contre, une élévation de la température ($25^{\circ}\text{C} < T < 37^{\circ}\text{C}$) va augmenter la vitesse de croissance. En effet, on considère généralement qu'à chaque augmentation de 10°C la vitesse de réaction catalysée par une enzyme sera doublée (Torija *et al.*, 2002). Alors, le métabolisme cellulaire sera plus actif aux températures plus élevées et le microorganisme se développera plus vite. Cependant, au-delà d'un certain point, la croissance diminue et des températures élevées sont létales, puisqu'elles endommagent les micro-organismes en dénaturant les enzymes, les systèmes de transport et d'autres protéines. Les membranes microbiennes sont aussi détruites par la chaleur (Converti *et al.*, 1996).

Ainsi, même si certaines enzymes fonctionnelles sont activées à ces températures élevées, le micro-organisme peut être tellement endommagé que sa croissance est inhibée, et ce de façon irréversible (Prescott *et al.*, 1995).

Dans le cas de faibles températures, les membranes perdent leur fluidité et les enzymes travaillent moins rapidement. Enfin, la température optimale d'activité est toujours plus proche de la température maximale que de la température minimale.

La température a également une influence sur les voies métaboliques de la levure. Ainsi une modification de la température de fermentation entraîne des différences dans la formation de métabolites secondaires tels que le glycérol, l'acide acétique, l'acide succinique, etc., (Fleet et Heard, 1993).

5.2 Effet du pH

Le pH est un autre facteur important de la croissance des levures, car il va déterminer l'activité métabolique des cellules. La valeur du pH a un effet sur la solubilité des nutriments et sur la perméabilité de la membrane cellulaire (Martinez *et al.*, 2003). Les pH alcalins sont, d'une façon générale, préjudiciables aux micro-organismes, la limite de leur développement se situant pour des valeurs d'ordre de 9 à 9,5. On observe pour les valeurs de pH entre 1 et 8 différents types de comportement liés à l'aptitude des microorganismes à tolérer et/ou métaboliser les acides organiques (ou minéraux) présents dans le milieu. Ainsi, les bactéries en générale, sont neutrophiles, présentant une meilleure croissance pour les pH voisins de 7 et sont partiellement inhibées à une valeur de pH inférieure à 5. Au contraire, les levures et les moisissures présentent une bonne aptitude à métaboliser les acides organiques et peuvent se développer très bien dans une zone de valeurs de pH comprises entre 2,5 et 8,5 (Martinez *et al.*, 2003).

Contrairement à la température, le pH interne n'est pas nécessairement égal à celui du milieu de culture et sa valeur est proche de la neutralité dans la majorité des microorganismes. Cette différence entre le pH interne et externe peut résulter de l'imperméabilité de la membrane plasmique aux protons. La concentration en ions hydrogène intracellulaire et extracellulaire n'est pas équilibrée et un gradient de concentration d'ions peut être créé à travers la membrane. Ce gradient de concentration, associé au potentiel électrique de la membrane, détermine la force motrice des protons qui contrôle les réactions membranaires.

Le pH interne a une influence importante sur l'activité des cellules et des systèmes intracellulaires tels que la synthèse des protéines, les mécanismes de transport, l'activité enzymatique et l'excrétion des métabolites pendant la fermentation (Liu *et al.*, 2003).

Le pH externe, peut influencer sur la vitesse avec laquelle les molécules sont transportées vers l'intérieur de la cellule et des valeurs de pH extrêmes peuvent endommager la membrane cellulaire et provoquer la mort cellulaire (Liu *et al.*, 2003).

5.3 Rôle de l'oxygène

L'oxygène est une molécule nécessaire pour la biosynthèse de molécules indispensables pour la cellule tout particulièrement celle des acides gras insaturés et des stérols qui protègent les levures du stress alcoolique (Scheffers, 1992).

En fermentation alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae*, une faible aération est donc indispensable pour assurer la survie des levures et l'épuisement complet des sucres en présence de concentrations élevées en éthanol. De plus dans ces conditions, la vitesse spécifique de production d'éthanol est améliorée (Sablayrolles, 1992).

L'oxygène est un "substrat" particulier puisqu'il est difficile de le dissoudre comme d'autres substrats. Son apport doit donc être continu tout au long de la culture.

Cependant, lorsque la concentration levurienne dans le milieu devient importante, le transfert de l'oxygène dans le milieu devient limitant, les besoins de la biomasse étant supérieurs aux flux transférés. La concentration d'oxygène dissous dans le milieu de culture a été identifiée comme l'un des principaux facteurs contrôlant la capacité des levures à se développer en métabolisme oxydatif. Par rapport à la présence d'oxygène, les levures peuvent être aérobies strictes (croissance en présence d'oxygène) ou aérobies facultatives. Il n'existe pas de levures anaérobies strictes (Sablayrolles, 1992).

5.4 Effet des produits de fermentation et du dioxyde de soufre

En fermentation alcoolique, l'effet des produits de la fermentation est très variable et dépend des conditions du milieu de culture et des conditions environnementales. Dans cette partie, nous nous limiterons aux effets liés à l'éthanol, à l'acide acétique et au dioxyde de soufre.

5.4.1 Effet de l'éthanol

L'éthanol est le produit principal de la fermentation alcoolique. Son action est très négative sur le développement des levures, sur la viabilité cellulaire, sur sa propre synthèse (Charpentier, 1993). L'inhibition de la croissance par l'éthanol commence autour de 20 à 40 g/L (Casey et Ingledew, 1986). Chez *Saccharomyces* la concentration inhibitrice (vitesse de croissance = 0) est de l'ordre de 70 à 110 g/L (Casey et Ingledew, 1986) selon l'espèce. Pour la production de l'éthanol, la concentration inhibitrice peut aller jusqu'à plus de 15% (v/v) pour *Saccharomyces cerevisiae* (Hayashida et Ohta, 1981). Enfin, l'effet de l'éthanol sur la viabilité cellulaire est moins marqué que sur la croissance elle-même (Casey et Ingledew 1986). L'éthanol peut aussi conduire à l'inhibition de la fermentation (Moulin *et al.*, 1984). Les facteurs qui ont une influence sur la sensibilité de la levure à l'éthanol sont la température, l'aération et la composition du milieu de culture.

Ainsi, plus la température de fermentation est élevée (30-40°C), plus la croissance, la viabilité et la production d'éthanol sont sensibles à l'éthanol (Aldiguiet *et al.*, 2004). L'augmentation de l'aération en condition de production d'éthanol améliorerait les vitesses de production d'éthanol et diminuerait son effet inhibiteur sur la croissance. L'effet inhibiteur de l'éthanol ajouté sur le taux de croissance et la vitesse spécifique de production dépend aussi des conditions d'aération. Pour ces deux paramètres, l'effet inhibiteur de l'éthanol diminue en condition aérobie par rapport à l'anaérobiose (Aguilera et Benitez, 1985).

La composition du milieu doit contenir des lipides et vitamines qui vont avoir un impact sur la tolérance à l'éthanol (Alfenore *et al.*, 2002). Ces composés protégeraient la surface membranaire de la cellule microbienne.

A ce jour les mécanismes d'inhibition de l'éthanol ne sont pas bien élucidés bien qu'ayant fait l'objet de nombreux travaux.

Les premières études ont été faites par Nagodawithana et Steinkraus (1976) qui ont démontré que l'éthanol produit durant la fermentation était plus toxique pour les microorganismes que s'il est ajouté au milieu de culture. Par la suite, il a été montré que l'éthanol avait un effet inhibiteur sur les enzymes impliquées dans la glycolyse, spécialement sur l'hexokinase (Novak *et al.*, 1981). On pense alors que l'accumulation de l'éthanol à l'intérieur de la cellule serait due à un problème de gradient de diffusion de l'intérieur vers l'extérieur.

Mais cette théorie est contradictoire avec les résultats obtenus par Millar et collaborateurs (1982) qui ne font pas état d'effet inhibiteur de l'éthanol au-dessous de 10%.

Strehaiano (1984) suggère que le problème d'inhibition serait lié à d'autres métabolites excrétés par la levure tels que l'acétate, les alcools supérieurs (Pampulha et Loureiro, 1989). L'éthanol perturbe aussi le flux transmembranaire de protons, qui tend à tamponner le pH du cytosol. Ainsi, l'activité ATPasique est alors activée pour rétablir un gradient électrochimique entre le milieu cellulaire et extracellulaire, en dépensant plus d'énergie.

Cette perte énergétique peut atteindre un niveau supérieur aux capacités cellulaires de compensation. Le cytoplasme s'acidifie et les perméases glucidiques deviennent inactivées c'est l'arrêt de croissance (Leao et Van Uden, 1982).

Enfin, l'explication la plus probable est donnée par Charpentier (1993). Cet auteur explique le phénomène d'inhibition par la présence de sites d'action de l'éthanol dans les sites membranaires mitochondrial et cytoplasmique.

Ainsi, les molécules d'éthanol pénètrent à l'intérieur de la membrane cytoplasmique pour s'associer aux molécules d'acides gras des phospholipides en se substituant aux molécules d'eau. Ce comportement entraîne une altération de la fluidité et de la perméabilité membranaire, causant la mort cellulaire.

5.4.2 Effet de l'acide acétique

L'acide acétique est un produit secondaire de la fermentation alcoolique produit en très faibles quantités pour une fermentation classique. Cependant, il peut être produit par certains micro-organismes (*Brettanomyces*) en quantités plus importantes, ce qui est une des conséquences redoutées en cas de contamination pendant la fermentation. Maiorella et collaborateurs en 1983 ont montré qu'une concentration d'acide acétique comprise entre 0,5 à 9 g/L peut affecter la morphologie des levures *Saccharomyces* qui deviennent irrégulières.

Plus tard, il a été montré que l'acide acétique est un puissant inhibiteur de la croissance de *Saccharomyces* sous sa forme non dissociée (toxique). Cette inhibition est plus marquée sur la synthèse de biomasse que sur la production de l'éthanol et indépendante du pH du milieu de culture (Phowchinda *et al.*, 1995). Le mécanisme d'action de cet acide faible se situe au niveau de l'acidification du cytoplasme et de la modification de certaines enzymes de la glycolyse (Pampulha et Loureiro, 1990), particulièrement l'hexokinase.

Sur l'effet conjoint de l'éthanol et de l'acide acétique Pampulha et Loureiro (1989) ont observé que le pH interne est indépendant de la concentration en acide acétique dissocié et du pH externe. Par contre, il dépend de la concentration en acide acétique non dissociée.

De ce fait, quand le pH interne décroît, la vitesse de fermentation diminue et devient nulle pour un pH interne de 4,8. Lorsque la concentration en éthanol est supérieure ou égale à 8%, l'inhibition est plus importante et elle devient complète pour un pH interne de 5,5.

D'autres auteurs ont souligné que l'acide acétique diminue la tolérance des levures à l'éthanol: Ramos et Madeira (1990), ont observé que la concentration critique en éthanol passe de 11% sans acide acétique à 0% pour 1% d'acide acétique.

5.5 Effet du dioxyde de soufre

Le dioxyde de soufre (SO_2) est le plus ancien additif utilisé en vinification. Le rôle principal du SO_2 est de sélectionner la flore fermentaire, les levures étant plus résistantes que les bactéries. Il est aussi un antioxydant et un solvant.

Le dioxyde de soufre est une molécule qui peut se présenter sous différentes formes chimiques en fonction du pH. Ces formes sont illustrées dans la figure 6. Des constantes de dissociation régissent le passage d'une forme à l'autre.

Le dioxyde de soufre libre est la forme principale qui agit sur la croissance des micro-organismes, ce qui fût confirmé par Ingram et Buttke (1984). Selon Macris et Markakis (1974) seule la forme H_2SO_3 de la partie libre est active vis-à-vis des levures. La forme HSO_3^- (majoritaire dans le vin), se combine d'autant plus que le pH est élevé.

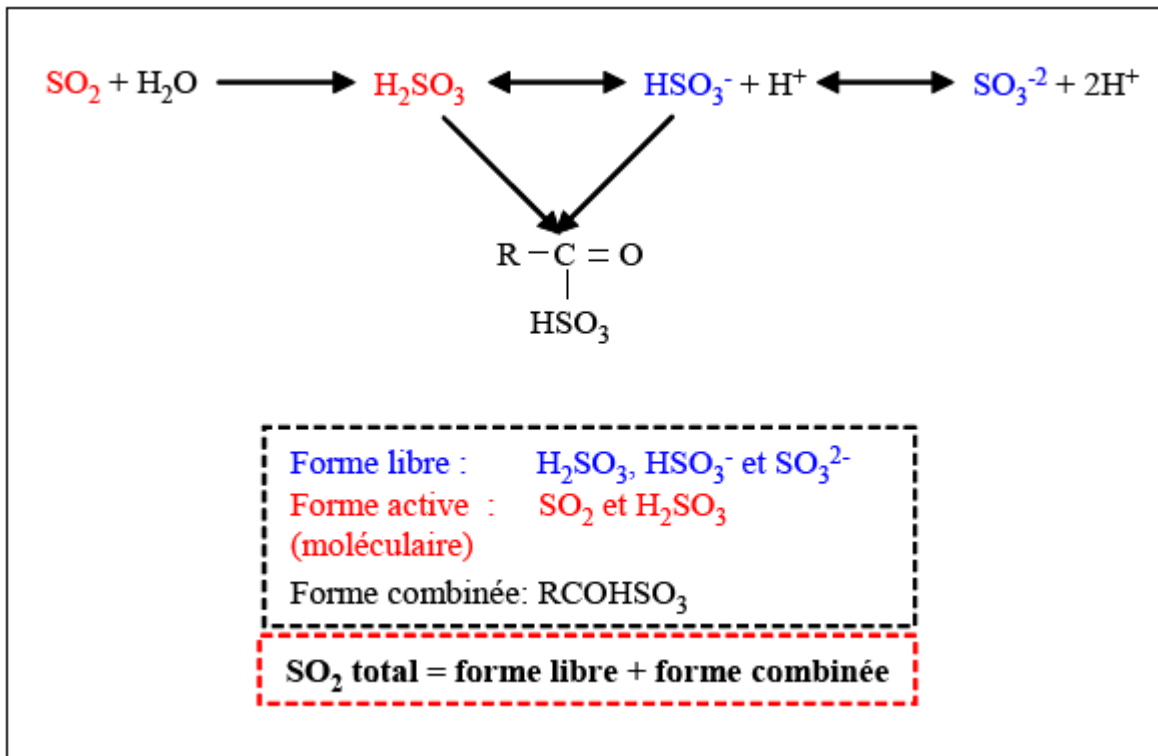


Figure 6 : Les différentes formes de l’anhydride sulfureux (Castro-Martinez, 2007).

Le SO_2 combiné à des concentrations supérieures à 30 mg/L prolonge la phase de latence et limite la croissance dans le vin. A plus de 50 mg/L de SO_2 combiné ou de 100 à 150 mg/L de SO_2 total, la croissance peut être complètement inhibée (Wibowo *et al.*, 1985). Un pH bas et une quantité élevée d’éthanol agissent de façon synergique avec le SO_2 . Les levures peuvent également produire des sulfites pendant la fermentation alcoolique. Habituellement 10 à 30 mg/L de sulfite sont produits au maximum.

La plupart des souches de *S. cerevisiae* en produisent moins de 10 mg/L. Néanmoins, il existe des souches qui produisent jusqu’à 100 mg/L (Alexandre *et al.*, 2004). La résistance des souches de levures au dioxyde de soufre est connue pour être génétiquement déterminée et transmise aux générations suivantes, même en l’absence de dioxyde de soufre (Beech et Thomas, 1985). De plus, cette résistance va dépendre de l’espèce et de la souche de levures. Ces auteurs ont rapporté que *Saccharomyces ludwigii* et *Zygosaccharomyces bailii* peuvent supporter des concentrations en SO_2 supérieures à 500 mg/L.

Romano et Suzzi (1992) ont établi une liste des levures de vinification tolérantes au dioxyde de soufre telles que : *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Zigosaccharomyces* et *Brettanomyces/Dekkera*. Concernant plus particulièrement le *Brettanomyces*, son comportement varie selon l'oxygène et la concentration du SO₂ ajouté au milieu de culture. DU-Toit et collaborateurs (2005) rapportent que des concentrations entre 0,25 et 0,35 mg/L de SO₂ moléculaire inhibent la croissance de *Brettanomyces bruxellensis* après un jour d'incubation. Par contre, la présence d'oxygène diminue l'effet du SO₂ chez *Brettanomyces*.

Le mécanisme d'action antimicrobienne du dioxyde de soufre n'est pas complètement élucidé. En 1987, Ough et Crowell, ont proposé le mécanisme suivant: le SO₂ pénètre dans la cellule par transport actif. Après, dans le cytosol, il peut directement se lier aux molécules carbonylées, les rendant inaptés à emprunter les voies métaboliques normales qui leur sont destinées. Une autre possibilité du dioxyde de soufre est de s'intégrer à la place du soufre dans les protides soufrés, ce qui les dénature (Yang, 1973). Finalement, la forme active du SO₂ diffuse librement dans la cellule et se retrouve sous forme de HSO₃⁻ au pH interne qui est autour de 7 ce qui s'accompagne d'une accumulation de sulfite chargé qui réagit avec les constituants cellulaires et conduit à la mort cellulaire (Gunnison, 1981).

Cependant, ces mécanismes restent du domaine des hypothèses. Beech et Thomas (1985) résument les actions intra et extracellulaires du dioxyde de soufre de la manière suivante: limitation des substances nutritives et de l'oxygène, adsorption, peroxydation des lipides, inhibition de la glycolyse, destruction de la thiamine, dommages sur les protéines post-structurelles, élimination des intermédiaires des cofacteurs et des vitamines, transformation de l'ADN et de l'ARN, mutations (Dorange et Dupuy, 1972).

Au niveau métabolique, le dioxyde de soufre agit en se combinant au glucose et à la dihydroxyacétone-P, au pyruvate et à l'acétaldéhyde, à l'acide oxaloacétique et à l'acide α-cétoglutarique.

6. Mécanismes de répression catabolique

L'activation des voies métaboliques de la levure dépend des mécanismes génétiques de la cellule et des facteurs physico-chimiques tels que : le pH, la température, l'oxygène, la présence de composés inhibiteurs et la concentration en substrats.

Dans ce sens, la concentration en glucose et l'aération dans le milieu de fermentation jouent un rôle important. Ainsi, divers mécanismes de régulation ont été décrits chez les levures (*Saccharomyces*, *Brettanomyces*) tels que: l'effet Pasteur, l'effet Crabtree et l'effet Custer.

7. Etablissement des équations cinétiques

Les équations dérivent de l'étude des paramètres cinétiques des souches.

Les étapes de la croissance microbienne

La croissance microbienne se traduit par une augmentation en taille ou en nombre des micro-organismes. Pour provoquer une croissance microbienne dans une culture il faut fournir aux cellules initiales les nutriments nécessaires et des conditions environnementales favorables. Le schéma de la croissance d'une population microbienne en culture discontinue (c'est-à-dire milieu non renouvelé), selon Sanaa (2002) présente dans la figure 7 se décompose alors traditionnellement en sept phases distinctes :

1) *La phase de latence* : elle correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance à proprement parlé. Il s'agit d'une phase d'adaptation au nouvel environnement. Cette phase dépend soit de l'âge de l'inoculum, soit d'une adaptation enzymatique. Par ailleurs, dans certaines conditions, la concentration initiale en cellules est si faible qu'il est difficile de quantifier l'augmentation du nombre d'individus. Ce phénomène est considéré comme une *pseudo-latence*. La phase de latence peut être réduite en utilisant comme inoculum une pré-culture prélevée en phase exponentielle.

2) *La phase d'accélération* : elle commence à partir de l'adaptation effective des cellules à leurs nouvelles conditions de culture. Durant cette période, la valeur du taux spécifique de croissance (μ) augmente, jusqu'à atteindre sa valeur maximale (μ_{\max}).

3) *La phase de croissance maximale ou exponentielle* : lorsque les concentrations microbiennes sont exprimées en coordonnées semi logarithmiques en fonction du temps, la pente de la droite correspond au taux spécifique maximal de croissance, μ_{\max} (h^{-1}).

Dans cette phase le taux de mortalité est nul, l'activité métabolique est maximale et le taux de croissance est constant.

4) *La phase de décélération ou phase de freinage* : elle intervient au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que des produits toxiques s'accumulent. La population continue à croître mais le temps de génération augmente.

5) *La phase stationnaire maximale* : au cours de cette phase, la population microbienne n'évolue plus ($\mu=0$) donc la population demeure stationnaire. Il y a un équilibre entre le nombre de nouvelles cellules et le nombre de cellules qui meurent. Cette phase peut durer plusieurs heures et même plusieurs jours.

6) *La phase de début de décroissance* : elle correspond à un début de disparition des cellules.

7) *La phase de décroissance exponentielle de la population* : cette phase apparaît lorsque le milieu devient fortement défavorable à la multiplication des micro-organismes et entraîne leur mort rapide (Manry, 2005).

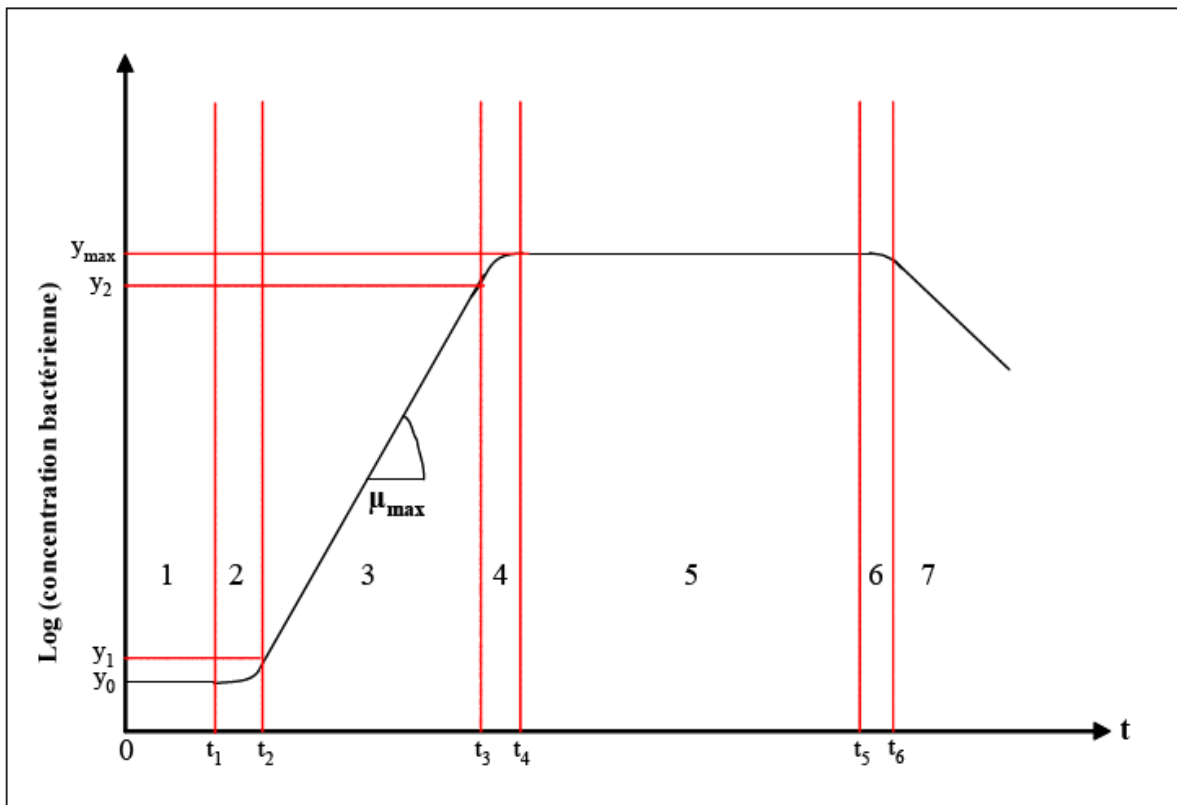


Figure 7 : Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé (batch).

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

A. Matériel d'étude

1. Les zones concernées par l'étude

L'étude s'est intéressée aux sites de vente, de stockage et de transformation des mangues. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés aux régions par excellence de production de mangue au Burkina Faso: Houet (Bobo-Dioulasso), Comoé (Banfora), Kénédougou (Orodora) et Centre (Ouagadougou). Ces différentes régions ont des conditions agroclimatiques différentes. Les différentes zones de production sont mentionnées dans la figure 8.



○ Zones de production de mangues

Figure 8 : Carte du Burkina Faso présentant les sites de prospection.

2. Prospections et collecte des échantillons de mangues.

Des prospections ont été conduites dans toutes les zones productrices de mangues au Burkina Faso et dans les centres de transformation des mangues (DAFANI, CEAS). Cinq Cent Cinquante (550) échantillons de résidus frais de mangues (peau, chaire, noyau) ont été collectés sans distinction de variétés. Le poids moyen pour chaque échantillon est l'ordre de 1kg.

La taille des échantillons par site a été fonction de la quantité de résidus rencontrés sur le site. Pour ce faire, dans la zone Ouest, plus grande zone de production (75% de la production nationale), 400 échantillons ont été retenus, dont 100 à Bobo-Dioulasso, 150 à Banfora et 150 à Orodora. Dans la région du centre et dans les centres de transformation, respectivement 50 et 100 échantillons ont été rassemblés. Ces échantillons conditionnés dans des sacs en plastique sont acheminés au laboratoire. Le tableau 3 présente la répartition des zones d'échantillonnage.

Tableau 3 : Répartition des échantillons de résidus de mangue collectés par site

Site	Bobo-Dioulasso	Banfora	Orodora	Ouagadougou	Unités de transformations
Echantillons	100	150	150	50	100

B. Méthodologie

1. Traitement des échantillons

Les échantillons ont été triés par variété avant toute analyse. Une portion des résidus de mangues (noyau délipidé et pulpe) est broyée séparément à l'aide d'un broyeur électrique. Les filtrats frais obtenus sur une unité de filtration en verre à partir des broyats, sont stockés dans des flacons de 500 ml et conditionnés à +4°C pour bloquer toute action microbienne en toute utilisation. Ainsi la détermination des paramètres physico-chimiques et composition macromoléculaire, portera sur les résidus de broyats frais ainsi que sur les filtrats pour comparaison. Par ailleurs une autre portion des échantillons collectés est séchée à l'étuve à 90°C pendant 72 heures jusqu'à obtention d'un poids constant à 0,2% près.

Elle est ensuite broyée puis tamisée (tamis de maille: 2 mm) pour faciliter la conservation en vue des essais de fermentation. La pulpe et le noyau délipidé sont traités séparément.

**I : EVALUATION DES PARAMETRES PHYSICO-
CHIMIQUES ET MACROMOLECULAIRES
DES RESIDUS DE MANGUES**

1. Analyses des paramètres chimiques et composition macromoléculaire des échantillons

Toutes les opérations sont réalisées en duplicata lors des analyses portant sur les résidus de broyats du noyau délipidé et de la pulpe des échantillons de mangues frais traités séparément.

1.1 Détermination du pH

Le pH est mesuré sur 10 g de chaque échantillon de mangues, homogénéisés avec 20 ml d'eau distillée à l'aide d'un pH-mètre (Hanna Instruments HI8418) préalablement étalonné avec des solutions de tampon phosphate (pH7) et tampon acétate (pH4) à 25°C, selon la méthode de Nout *et al.*(1989).

1.2 Détermination du taux d'humidité, de matières sèches et de cendres

Ces paramètres ont été déterminés à partir de 10 g d'échantillon frais, par pesée différentielle, après passage à l'étuve (Heraeus T5042) à différentes températures en fonction du temps (méthode AOAC, 1990).

Une quantité de 10 g de broyat de chaque échantillon a été pesée dans une capsule en aluminium préalablement tarée. La capsule a été placée ensuite pendant 24 heures dans une étuve (Heraeus T5042) à 105° C. Après refroidissement de la capsule dans un dessiccateur pendant 30 minutes, l'ensemble a été pesé à nouveau à la balance électronique (Denver Instrument Company). L'opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant à 0,2 % près.

Les taux ou pourcentages d'humidité et de matière sèche sont déterminés par les formules suivantes :

$$\% \text{ Hum (g/g)} = (m_0 - m) / m_0 \times 100$$

$$\% \text{ Ms (g/g)} = 100 - \% \text{ Hum}$$

avec : **% Hum** = pourcentage en humidité ; **% Ms** = pourcentage en matière sèche ; **m** = masse du résidu à 105°C et **m₀** = masse de l'échantillon frais.

Les cendres totales ont été déterminées par incinération. Un étuvage à 105°C pendant 24 heures des échantillons, est suivi par une calcination au four à moufle. Un creuset contenant le résidu à 105°C est remis dans le four. La température est alors augmentée progressivement jusqu'à 550°C pendant 5 heures. Après refroidissement pendant 30 minutes au dessiccateur le creuset est pesé à la balance électronique. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant à 0,2 % près. Le taux de cendres exprimé en pourcentage en masse est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ Cendres (g/g)} = [(P_3 - P_1) / (P_2 - P_1)] \times 100$$

avec : P_1 = Poids du creuset; P_2 = Poids du creuset + la prise d'essai ; P_3 = Poids du creuset + Cendres

1.3 Détermination de la teneur en glucides

Elle a été réalisée par dosage spectrophotométrique des échantillons, à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque couplé à un ordinateur muni d'un logiciel KC Junior intégré.

La lecture des densités optiques a été faite à 540 nm et 460 nm respectivement pour les sucres totaux et les sucres reducteurs. Les concentrations des sucres sont calculées à partir de deux courbes d'étalonnage établies respectivement avec du D-glucose et du maltose comme standards.

1.3.1 Dosage des sucres totaux

En milieu acide à chaud, les liaisons glycosidiques des carbohydrates sont hydrolysées. Les oses simples ainsi libérés subissent une déshydratation intramoléculaire pour donner des dérivés furfuraux (furfural ou hydroxyméthyl furfural). La fonction aldéhyde se condense ainsi en milieu acide avec l'hydroxyle d'un composé phénolique pour donner des acétals ou héli-acétals de couleur rougeâtre qui absorbent dans le visible (450-500 nm). Les hexoses sont transformés en 5- hydroxyméthyl furfural, et les pentoses en furfural. Cette méthode permet ainsi de doser tous les glucides totaux d'un matériel biologique.

Préparation des échantillons à analyser

Dans des tubes à essais, 1 g de poudre de chaque échantillon (pulpe ou noyau de mangue) est dispersé dans 10 ml de DMSO à 25% (v/v) dans l'eau. Le mélange est incubé au bain-marie bouillant pendant 15 min puis 0,1 ml du mélange est dilué dans 9,9 ml d'eau.

Une gamme de concentrations de la solution standard de D-glucose à 0,05 mg/ml (0,5 g de glucose dans 100 ml d'eau distillée) a été utilisée pour établir une courbe étalon des sucres totaux. Aux différentes concentrations de glucose ont été ajoutées; 0,5 ml de phénol 5% et 2 ml de H₂SO₄. Après 15 min d'incubation au bain marie " bouillant" puis 15 min d'incubation à l'obscurité, on lit l'absorbance (densité optique) à 492 nm au spectrophotomètre lecture de plaque (type μ quant) couplé à un ordinateur avec un logiciel KC junior intégré.

Pour le dosage des échantillons, 0,5 ml de phénol 5% est ajouté à 0,5 ml de l'échantillon préalablement préparé. Après homogénéisation, on ajoute 2 ml du H₂SO₄ (75%). Le mélange est ensuite traité comme le standard ayant servi à construire la courbe d'étalonnage. L'essai est fait en duplicata. La concentration des sucres totaux est déduite à partir de courbe étalon des sucres totaux (annexe 12) avec le D-Glucose comme sucre de référence (Fox et Robyt, 1991).

1.3.2 Dosage des sucres réducteurs

Une série de concentrations de la solution standard de D-glucose à 0,05 mg/ml a été utilisée pour établir une courbe étalon des sucres réducteurs. Un volume de 1 ml de réactif au DNS (Acide 3,5 Dinitrosalicylique) a été ajouté aux différentes concentrations de glucose. Après 8 min d'incubation au bain marie " bouillant", mesure l'absorbance a été mesuré à 546 nm.

Pour le dosage des échantillons; 0,1 ml de l'échantillon préalablement dispersé dans le DMSO (Diméthylsulfoxyde) pour le dosage des sucres réducteurs est mélangé avec 0,4 ml d'eau distillée. La solution est ensuite mélangée avec 1 ml du réactif au DNS puis incubée au bain marie comme décrit pour le standard des sucres réducteurs. Après homogénéisation, l'absorbance est lue à 546 nm à l'aide du spectrophotomètre. Les concentrations en sucres réducteurs sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage (annexe 13) établie avec le D-Glucose comme sucre de référence (Miller 1958).

1.4 Détermination du taux d'amidon

1.4.1 Extraction et dosage de l'amidon total

Prendre 0,1 g des résidus bien broyé et y ajouter 5 ml de 1 N KOH. Bien homogénéiser la solution à la température ambiante et la neutraliser ensuite avec 5 ml de 1 N HCl.

Bien s'assurer que la solution est neutre à l'aide d'un papier pH. Mettre ensuite le mélange en ébullition au bain-marie pendant 15 min. Réajuster le volume du mélange à 10 ml.

Centrifuger le mélange et prendre le surnageant. Filtrer au besoin le surnageant et l'utiliser pour le dosage de l'amidon. Pour le dosage prélever 0,05 ml de cette solution et ajouter 4,85 ml d'eau distillée et 0,1 ml de réactif I₂/KI puis incuber comme précédemment pendant 10 minutes avant la lecture des densités optiques à 580 nm.

La teneur en amidon a été déterminée en utilisant une courbe étalon (annexe 14) avec une solution d'amidon à 5 mg/ml comme sucre de référence (Jarvis et Walker, 1993).

**II : SCREENING DES MICROORGANISMES
IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS DE
FERMENTATION**

1. Procédé d'isolement et de sélection des souches de levures et bactéries

1.1 Les différentes sources d'isolement des microorganismes

Les souches de levures à sélectionner ont été recherchées dans les différents milieux. Elles sont codifiées (A1 à Ax ; B1 à Bx ; S1 à Sx ; W1 à Wx) selon la provenance. Les sources d'isolement utilisées sont les ferments de levures provenant de la bière locale (dolo), du vin de palme, et des résidus de mangues. Les souches de bactéries du genre *Bacillus* proviennent des échantillons de condiments fermentés (Soumbala, Bikalga). Les souches *Bacillus* sp1(A1M1) et *Bacillus licheniformis* proviennent du laboratoire de CRSBAN (Université de Ouagadougou).

1.2 Les différents milieux de cultures

Différents milieux de culture ont été utilisés selon les objectifs poursuivis. Dans tous les cas le pH est ajusté avant la stérilisation avec des tampons acétate (pH 4) et phosphate (pH 7), puis le milieu de culture est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.

1.2.1 Milieu de conservation

Les souches (levures et bactéries) ont été conservées à 4°C et repiquées à des intervalles réguliers (1 mois) dans le bouillon nutritif de conservation (Annexe 1). Le bouillon nutritif additionné à du glycérol (20 % v/v) à raison de 1,5 ml par cryotube sert de milieu de conservation des souches.

1.2.2 Milieux d'isolement des levures

L'isolement et la sélection des souches des levures ont été effectués sur la gélose de Sabouraud additionnée de Chloramphénicol ou Gentamicine, antibiotiques antibactériens à large spectre. Le pH est ajusté à $6 \pm 0,2$ (Composition du milieu : Annexe 2). La gentamicine ou le chloramphénicol sont ajoutés respectivement à raison de 0,40 g/l et de 0,50 g/l dans le milieu Sabouraud après autoclavage à 121° C pendant 15 minutes et refroidissement de ce dernier dans des conditions stériles. Le test à la cycloheximide a également été utilisé pour confirmer le genre de levure à sélectionner.

Les milieux gélose, farine Maïs et YEPD (Yeast extract Peptone Dextrose), (Annexes 3 et 4), ont servi de milieux de confirmation et de purification (par triple repiquage successif) des souches de levures isolées sur le milieu sabouraud. Le pH est ajusté à $6 \pm 0,2$.

La sélection des bactéries du genre *Bacillus* a été conduite sur milieu PCA (Plate Count Agar).

1.2.3 Milieu pour l'étude de la tolérance à l'alcool

Après stérilisation, le milieu synthétique minimum (Annexe 5) a été utilisé pour cette étude.

1.2.4 Milieu pour la mise en évidence de la production d'acétoïne

Le milieu de Clark et Lubs (Annexe 6) a été utilisé pour mettre en évidence la production d'acétoïne par les souches bactériennes.

1.2.5 Milieu pour la détermination du caractère amylolytique des souches bactériennes

Le milieu gélosé amylicé à 1 % (Annexe 7) a été utilisé pour la mise en évidence du caractère amylolytique des bactéries.

1.2.6 Milieu pour le test de sporulation des levures

Le milieu utilisé pour ce test est un milieu liquide contenant le glucose synthétique comme source de carbone (Annexe 8).

1.2.7 Milieu de base pour l'étude de la fermentescibilité des sucres

La fermentescibilité a été réalisée sur un milieu synthétique liquide contenant soit le le glucose, le fructose, le lactose, l'arabinose, le galactose, le mannose, le raffinose comme source de carbone (Annexe 9-10).

1.2.8 Milieu d'isolement des bactéries

Le milieu PCA a été utilisé pour la sélection des bactéries.

1.3 Isolement

La technique des stries serrées a été utilisée pour l'isolement des levures et bactéries. A cet effet 0,1 ml de la culture pré-enrichie a été repiqué sur le milieu gélosé Sabouraud contenant du chloramphénicol et incubé 24 à 72 heures en aérobiose à 30 °C. Les bactéries ont été isolées sur milieu PCA. Les colonies sélectionnées au niveau du quatrième quadrant, ont été ensemencées par stries sur un nouveau milieu gélosé.

Après croissance, les souches ont été purifiées par trois repiquages successifs par étalement et la pureté partielle a été confirmée par l'obtention de culture homogène et par observation à l'état frais et après coloration de GRAM. Les souches pures ont été réensemencées trois fois par stries sur milieu gélosé et dans du bouillon. Les souches pures obtenues, ont été utilisées pour les tests de caractérisation.

L'identification partielle des souches pures a été basée sur la détermination de leurs caractères morphologiques, culturels, biochimiques et physiologiques.

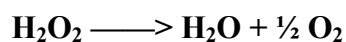
2. Biochimie et physiologie des souches

2.1 Caractères culturels

La morphologie des colonies a été déterminée par une observation directe des colonies sur les milieux gélosés. La forme, la taille et la couleur des colonies ainsi que l'aspect de la culture en milieu liquide ont été notées.

2.2 Test de catalase

Ce test a été réalisé en utilisant de l'eau oxygénée à 10 volumes. La présence de catalase a été révélée par un dégagement gazeux à partir d'une culture sur gélose nutritive où l'on a déposé une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) à 10 volumes (ou 3 %). La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en oxygène et en eau selon la réaction suivante :



Le peroxyde d'hydrogène formé au cours du métabolisme est un agent antimicrobien qui exerce son activité inhibitrice sur les bactéries dépourvues de catalase ou de pseudo-catalase. La peroxydase permet à certaines souches (levures ou bactéries) qui n'ont pas de catalase, de tolérer l'oxygène, mais cette tolérance reste à vérifier quand au peroxyde d'hydrogène.

2.3 Test de cytochrome oxydase

La présence de cytochrome oxydase a été mise en évidence par la technique de Kovacs (1956). Des disques imprégnés d'une solution de tétraméthylphénylène diamine (TMD) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 6% ont été utilisés. En présence d'oxydase, le tétraméthylphénylène diamine (TMD) vire au bleu violacé. Le TMD ne vire pas si le test est négatif. Ce test détecte un type particulier de chaîne respiratoire qui comporte en fin de chaîne, un cytochrome C et l'oxydase associée.

2.4 Test de sporulation

La recherche de formes résistantes des levures et bactéries a été réalisée grâce à la technique du choc thermique. Deux tubes de culture de chacune des souches ont été portés au bain-marie à 90 °C pendant 10 minutes. Une aliquote de chaque suspension bactérienne traitée ainsi a été prélevée pour inoculer deux tubes de milieu neuf stérile. Ces tubes ont été réincubés à 30 °C pour suivre la croissance pendant 24 à 72 heures. Une croissance notée qui se traduit par la turbidité de la culture montre que la souche étudiée est capable de former des formes résistantes. Si la souche est incapable de sporuler, la culture reste limpide.

2.5 Tests au rouge de méthyle et Voges-Proskauer

Ce test est réalisé uniquement pour les bactéries. Le milieu de Clark et Lubs permet de réaliser les tests au rouge de méthyle (RM) et de Voges-Proskauer (VP) selon la technique utilisée par Sévastianos (1977). Ces tests permettent de révéler la nature des produits issus de la fermentation des sucres (acides organiques ou acétoïne). Ces tests ont été réalisés en cultivant 24 heures à 30 °C, la souche concernée. Pour le test VP, 1 ml de la culture a été prélevé deux fois et transvasé dans deux tubes à hémolyse. Un volume de 0,5 ml d' α -naphthol (1% v/v) et un volume égal de base (KOH) concentrée (40% m/v) ont été ajoutés. Le tube est incliné pendant quelques minutes à une heure pour permettre une bonne oxygénation.

Si la réaction est positive (VP⁺), il se forme un anneau rouge en surface. Une réaction négative (VP⁻) se traduit par un anneau jaune en surface. Les souches VP⁺ produisent des quantités moins importantes d'acides organiques et une proportion non négligeable de pyruvate est transformée en produit neutre (l'acétoïne est réduite en général en butanediol). C'est la fermentation butanediolique.

Pour le test RM, à deux tubes contenant chacun 1 ml de la culture, on ajoute deux (02) à trois (03) gouttes de rouge de méthyle. Une coloration rouge traduit une réaction positive (RM⁺) et une coloration jaune, une réaction négative (RM⁻). Les souches RM⁺ produisent des acides organiques par la voie des acides mixtes.

Ces tests permettent de révéler la nature des produits issus de la fermentation des sucres (acides organiques ou acétoïne). Chez les bactéries anaérobies facultatives, ces tests permettent de mettre en évidence la fermentation acide mixte conduisant à la formation de nombreux acides organiques et la fermentation butanediolique qui aboutit à la production de l'acétoïne, précurseur du butanediol.

2.6 Test de thermo-tolérance

Pour tester l'aptitude des souches de levure à croître à 40 et à 50 °C, la croissance sur milieu gélosé a été réalisée respectivement à 40 et à 50 °C pendant 24 heures en aérobose. Trois boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé ont été utilisées pour chaque souche. La croissance ou non est confirmée par trois (03) repiquages successifs.

2.7 Métabolisme de l'amidon par les souches du genre *Bacillus*

Le caractère amylolytique des souches a été testé sur milieu gélosé amylicé à 1% selon la technique utilisée par Bengaly (2001). C'est un milieu gélosé contenant de l'amidon pur comme seule et unique source de carbone. Un test positif se traduit par un halo bien visible autour de la colonie correspondant aux zones d'hydrolyse de l'amidon. Pour un test négatif, le milieu vire au bleu. La gélose a étéensemencée par touche et l'hydrolyse de l'amidon, révélée par vaporisation d'une solution d'iode 0,1 N. Le milieu vire au bleu sauf les zones d'hydrolyse de l'amidon pour lesquelles un halo bien visible se forme autour de la colonie. Trois repiquages successifs ont permis de confirmer les résultats obtenus. Ce test est réalisé uniquement pour les bactéries.

2.8 Etude de la fermentescibilité des sucres

Elle a été effectuée dans des tubes de Hungate contenant le milieu de base (annexes 9-10) stérilisé à 120 °C pendant 15 minutes. Le pH est ajusté à 7,2. Les solutions de sucres et de bleu de bromothymol stérilisées par filtration à l'aide d'un filtre millipore (0,22 µm) ont été ajoutées au milieu de base stérile de manière à obtenir une concentration finale de sucre de 5 grammes par litre (Combet-Blanc, 1995). Les sucres testés sont le glucose, le fructose, le saccharose et le lactose et une suspension levurienne en phase exponentielle de croissance a été utilisée. Deux tubes ont été utilisés pour chaque sucre testé. Après inoculation, la surface d'un des deux tubes a été recouverte d'huile de paraffine pour révéler la production de gaz.

Deux témoins ont été réalisés, un contenant le milieu neuf stérile et l'indicateur coloré, un autre contenant le milieu neuf stérile. Lorsque la souche concernée fermente le sucre testé, la culture initialement verte vire au jaune après 24 à 72 heures. Un test négatif se traduit par une culture bleu-verte. Trois repiquages successifs ont permis de confirmer les résultats obtenus.

2.9 Caractérisation taxonomique : Essai taxonomique

Les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques des souches isolées ont été comparées à celles du « Bergey's manual of determinative bacteriology » neuvième édition afin de proposer une affiliation.

3. Les méthodes analytiques

3.1 Analyse de la biomasse et paramètres cinétiques

Le suivi de la biomasse a été fait par trois méthodes différentes. Ces méthodes apportent des informations complémentaires et leur combinaison augmente la fiabilité de nos résultats. Le suivi de la biomasse a été effectué tout au long du processus de sélection des souches.

3.1.1 Spectrophotométrie (Turbidimétrie)

La densité optique (DO) mesurée traduit le pourcentage de lumière non transmise par la suspension de levures. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de biomasse présente dans l'échantillon. La DO a été mesurée avec un spectrophotomètre lecteur de plaque (type µquant) couplé à un ordinateur avec un logiciel KC junior intégré.

Les mesures ont été réalisées dans des plaques multi-puits (96 puits). Des dilutions sont effectuées afin de rester dans la gamme de linéarité ($DO < 0,8$).

3.1.2 Méthode gravimétrique (Poids sec)

Cette méthode a pour but d'estimer la masse de levures contenue dans un volume donné de l'échantillon. Elle est basée sur la différence de poids sec d'une membrane de porosité déterminée (acétate de cellulose $0,45 \mu\text{m}$) avant et après filtration (et séchage) d'un volume connu (25 et 10 ml) d'échantillon. Les cellules levuriennes cultivées ont été récoltées par centrifugation à 6000 tr/min pour 20 min, puis lavées deux fois avec de l'eau stérile et pesées après 24 h de séchage à l'étuve à $105 \text{ }^\circ\text{C}$. La biomasse sèche est exprimée en g/L.

Elle a été utilisée parallèlement à la mesure turbidimétrique pour obtenir une corrélation DO/concentration en biomasse (Poids sec), afin d'éviter le recours systématique à cette technique longue et peu précise pour les faibles valeurs de biomasse.

Les courbes standards de proportionnalité DO/Poids sec pour les levures ont été réalisées sur milieu minimum à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (annexe 11).

3.2 Evaluation de l'activité amylasique et saccharification des bactéries

L'hydrolyse enzymatique de la matière première (noyau de mangue) a été menée à des températures de $50\text{-}55 \text{ }^\circ\text{C}$, avec des α -amylases produites par des bactéries du genre *Bacillus*. L'évaluation de la performance de l'hydrolyse a été basée sur le rendement de la libération des sucres réducteurs en fonction de la biomasse.

Initialement 1 L de bouillon nutritif contenant 50 g de substrat de mangue (broyat de noyau de mangue: 50 g/L) a été préparé et stérilisé. L'inoculum de chaque souche de *Bacillus* (10 ml) a étéensemencé; puis les cultures sont placées sous agitation lente (100 rpm) pendant 4 heures. La densité optique des préparations est suivie à 600 nm sur une plaque multi-puits à l'aide du spectrophotomètre décrit précédemment. On effectue un dosage progressif du taux de sucres réducteurs libérés au cours de l'hydrolyse. Auparavant les taux de sucres réducteurs et totaux initiaux ont été déterminés.

4. Traitement des données

La moyenne des valeurs numériques de la densité optique (DO) des différentes cultures ainsi que celles des témoins a été obtenue grâce à un tableur Excel 2007.

Calcul des rendements et paramètres cinétiques

La différence entre la densité optique de la culture (DO_{culture}) et celle du témoin ($DO_{\text{témoin}}$) a donné la densité optique réelle ($DO_{\text{réelle}}$) de la culture selon la relation suivante :

$$DO_{\text{réelle}} = DO_{\text{culture}} - DO_{\text{témoin}}$$

Le rendement $Y_{x/s}$ (g biomasse/g substrat) en biomasse par rapport au sucre est défini par :

$$Y_{x/s} = (X_f - X_o) / (S_o - S_f)$$

X_f : biomasse finale; X_o : biomasse initiale ; S_o : concentration initiale en sucre; S_f : concentration finale en sucre.

Le rendement $Y_{p/s}$ (g produit/g substrat) en produit (éthanol) par rapport au sucre est défini par :

$$Y_{p/s} = (P_f - P_o) / (S_o - S_f)$$

P_f : concentration finale du produit (éthanol); P_o : concentration initiale du produit (éthanol)

Les vitesses maximale et spécifique de croissance (μ_{max} , μ) sont définies par:

$$\text{Log}_{10} (DO'/DO) = \mu_{\text{max}}.t + K$$

$$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = (1/X) \times (dX/dt)$$

X : biomasse cellulaire; dX/dt : variation de la biomasse cellulaire en fonction du temps.

DO est la valeur de la densité optique en début de la phase exponentielle de croissance et DO' , celle à l'instant t durant la phase exponentielle de croissance.

K correspond à une constante = Charge cellulaire ou biomasse à l'instant initial.

**III: ETUDE DE L'INFLUENCE DE PARAMETRES
ENVIRONNEMENTAUX SUR LA BIOMASSE
MICROBIENNE ET LA FERMENTATION**

Le but de cette étude est de vérifier l'influence des facteurs du milieu réactionnel sur l'évolution de la biomasse microbienne et de la fermentation.

1. Etude de la tolérance à l'alcool

La technique utilisée a été celle décrite par Obire (2005) pour étudier la tolérance à l'alcool de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* isolée de différents biotopes.

Après stérilisation, des volumes appropriés d'éthanol ont été ajoutés au milieu de culture par filtration à l'aide d'un filtre millipore (0,22 µm) conduisant respectivement à des concentrations alcooliques de 0%, 5%, 7,5%, 10%, 12% et 18% (v/v). La croissance des souches a été réalisée pendant 24 heures à 30 °C. Des milieux alcooliques nonensemencés ont été utilisés comme témoins et pour chaque concentration donnée, la croissance a été réalisée dans trois tubes pour chaque souche. Un volume de 100 µl de chaque suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance, a été utilisé comme inoculum.

La tolérance à l'alcool a été appréciée à travers la croissance des souches pendant 24 heures en mesurant l'absorbance à 600 nm à l'aide du spectrophotomètre type « µQuant » couplé à un ordinateur équipé du logiciel KC Junior susmentionné. Les mesures ont été effectuées en triple pour chaque souche et pour chaque mesure.

La viabilité des souches dans l'alcool a été testée en repiquant la culture réalisée entre 10 et 15 % (v/v) d'alcool sur milieu gélosé. Une croissance positive témoigne de la viabilité de la souche concernée à la concentration alcoolique testée. Les valeurs des DO liées aux différentes concentrations d'alcool après 24 heures ont été utilisées pour tracer une courbe de tendance afin de déterminer l'effet de l'alcool sur chacune des souches retenues. La pente de ces courbes donne l'effet de l'alcool sur les souches.

Le tracé de la courbe de tendance définie par $\log_{10}(DO'/DO)$ en fonction du temps t a permis de déterminer les paramètres cinétiques de croissance durant la phase exponentielle de croissance : la vitesse maximale de croissance μ_{\max} et le temps de génération $t_{1/2}$.

$$\log_{10}(DO'/DO) = \mu_{\max} \cdot t + K$$

La pente de cette courbe de tendance correspond à la vitesse maximale de croissance μ_{\max} et le temps de génération $t_{1/2}$ a été déterminé selon la relation :

$$t_{1/2} = 0,69 / \mu_{\max}$$

DO est la valeur de la densité optique en début de la phase exponentielle de croissance et **DO'**, celle à l'instant **t** durant la phase exponentielle de croissance. **K** correspond à une constante.

L'analyse de nos données a été basée sur la comparaison des paramètres cinétiques de croissance déterminés durant la phase exponentielle de croissance.

2. Etude de l'effet du pH sur la croissance microbienne et la fermentation

En fermentation alcoolique le pH est un paramètre très important, réputé agir sur l'activité métabolique de la levure et moduler la synthèse des acides formés au cours de la fermentation. Il nous a donc paru indispensable d'étudier le rôle du pH sur les souches de levure sélectionnées compte tenu des incidences possibles sur le procédé de fermentation (pertes de productivité, modification de la composition des milieux de fermentation). Pour cela, des cultures en batch ont été réalisées à différents pH. Cette étude a été réalisée dans des fermenteurs type « Biolafite » de 500 ml de volume utile. L'ensemencement est effectué à l'aide au minimum d'un inoculum de 5.10^5 UFC/mL à partir des souches de levures sélectionnées en fin de phase de latence. La température de fermentation a été fixée à 30 °C, l'agitation est de 150 tours/min. La souche de levure a été ensemencée dans une série d'erlenmeyers contenant le milieu synthétique avec 20 mM de glucose dont le seul paramètre variable est le pH (pH allant de 3,5 à 7,5). Ces milieux ont été préparés avec des solutions tampons (tampon acétate de pH variant de 3 à 6 et tampon phosphate de pH variant de 6 à 9). L'intensité de la croissance pour chaque pH est évaluée par la mesure de la densité optique à 600 nm au spectrophotomètre pendant 24 heures, (KONLANI *et al.*, 1996).

3. Influence de la température sur la croissance microbienne

L'effet de la température sur la croissance optimale des souches a été déterminé en mesurant directement l'absorbance des cultures à une longueur d'onde de 600 nm. Les souches de levure ont été ensemencées dans une série de tubes contenant le même milieu de culture (20 mM de glucose, pH 5,5) dont le seul facteur variable est la température d'incubation (20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C et 50 °C).

**IV : PROCÉDÉ D'OPTIMISATION DE LA
PRODUCTION DE BIOÉTHANOL**

1. Procédé simultané de saccharification et de fermentation (SSF) des résidus de mangues

1.1 Cocultures de *Bacillus* sp et *Saccharomyces* sp sur les résidus de mangues

L'hydrolyse des résidus de mangues (broyats de pulpe et noyau) et la fermentation simultanée ont été réalisées dans un Erlenmeyer de 500 ml à 10%, comme concentration en substrat. Le milieu de fermentation contient le broyat de mangue prétraité comme substrat (200 mg/L du metabisulphite de potassium). Après liquéfaction, le pH a été ajusté à 4,5; le metabisulphite de potassium ainsi que les inocula des souches de *Bacillus* (A1M 1, sp2, sp3, sp4) et *B. licheniformis* ont été ajoutés à une température de 55°C pour optimiser la libération des sucres réducteurs durant 4 heures. Après un refroidissement à 45 °C et 40 °C des inocula des souches de levures (avec 5×10^5 - $2,5 \times 10^6$ cellules/ml) sélectionnées ont été ajoutés indépendamment pour chaque ballon de fermentation. Ces souches étaient thermotolérantes. La SSF a été réalisée à 37 °C et 40 °C pour 7 jours à 150 rpm. Le rendement théorique de la SSF a été calculé en supposant que tout le glucose potentiel dans la matière était disponible pour la fermentation. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

La concentration de l'éthanol a été déterminée chaque 24 heures après distillation de 50 ml du milieu durant le processus de la fermentation. La figure 7 résume le procédé expérimental de production d'éthanol.

1.2 Détermination de la concentration en éthanol produit

Le distillat a été collecté à l'aide d'un distillateur à 78°C. L'éthanol produit a été recolté et son volume mesuré dans un cylindre cubique. La quantité d'éthanol produit est déterminée en multipliant le volume de distillat collecté à 78°C par la concentration d'éthanol (concentration théorique : 0,8033 g/ml). La concentration en g/L est équivalente au rendement de 100 g de substrat (Humphrey et Okafoagu, 2007). Le volume et la densité optique de l'éthanol produit ont été déterminés. La concentration est déterminée à l'aide d'une courbe standard donnant la concentration de l'éthanol (g/L) en fonction de la densité optique (600 nm) selon la méthode préconisée par Humphrey et Okafoagu (2007).

1.3 Détermination du pourcentage d'éthanol par spectrométrie

Une courbe standard donnant la densité optique (600 nm) en fonction du pourcentage en l'éthanol a été réalisée. Une série de pourcentages croissants de solution d'éthanol variant de 2 à 20 % (v/v) a été préparée. La densité optique pour chacune des solutions a été mesurée permettant d'établir la courbe standard $DO = f [\% \text{ alcool (v/v)}]$. Le pourcentage d'éthanol produit a été obtenu en utilisant l'équation de la courbe standard.

1.4 Détermination du pourcentage d'éthanol par CPG

Le pourcentage en éthanol a été mesuré par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un chromatographe (121 DFL - Intersmat) utilisant une colonne de verre remplie avec du carbopack B 60/80 et de Carbowax 15% 20M et un détecteur à ionisation de flamme (FID). La température de la colonne était 85°C, celle de l'injecteur ... et le gaz vecteur était l'azote. Le méthanol a été utilisé comme étalon interne.

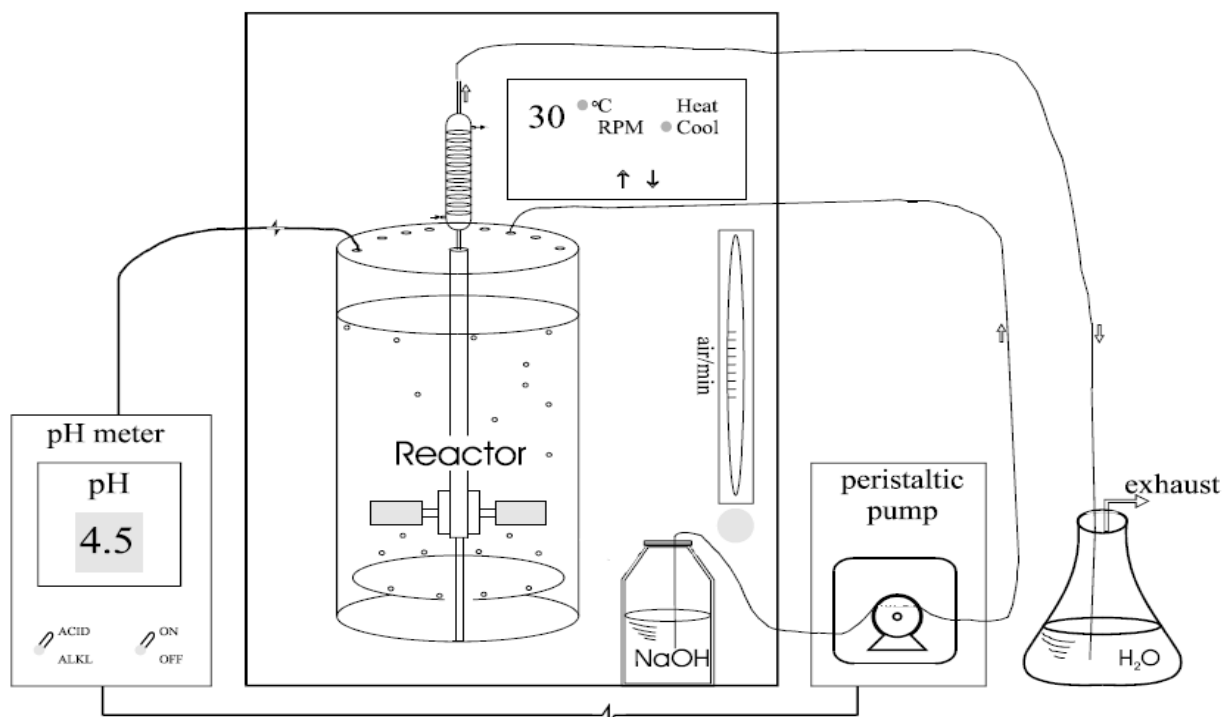


Figure 7 : Schéma de Fermentateur utilisant le procédé Simultané de Saccharification et de Fermentation (SSF).

2. Etude de l'effet des sels minéraux et de l'azote sur les potentialités des souches et l'optimisation de la fermentation

Certains sels ont été retenus pour leurs effets positifs connus sur la croissance et la production d'éthanol. La biomasse est suivie par densitométrie à 600 nm au spectrophotomètre. L'alcool est recueilli par distillation à 78°C. Le volume et la densité optique ont été déterminés. La concentration est déterminée à l'aide d'une courbe standard donnant la concentration de l'éthanol (g/L) en fonction de la densité optique sur la base de la méthode préconisée par Humphrey et Okafoagu (2007). L'étude de l'effet des sels minéraux a été effectuée selon la méthode de Boudjelal et Nancib (2001).

2.1 Effet de NaCl

Le milieu synthétique de fermentation (Annexe 3 sans Agar) a été utilisé comme milieu de base pour étudier l'effet de NaCl. Une gamme de concentrations de NaCl de l'ordre de 2 à 20‰ (g/L) a été réalisée dans des erlemeyers. Un volume de 200 µl de chaque inoculum levurien a été ensemencé dans un milieu de 100 ml. Les cultures contenant 20 mM de glucose sont placées sous agitation (150 rpm). La densité optique est suivie pendant 24 heures. La biomasse ainsi que le taux d'alcool produit sont évalués toutes les heures.

2.2 Effet de FeSO₄

Les cultures levuriennes sont réalisées sur le même milieu synthétique de base. Dans ce cas seule la concentration de FeSO₄ varie graduellement de 0,01 à 0,1g/L. Les cinétiques de fermentation et de production de biomasse ont été suivies pendant 24 heures.

2.3 Effet de MgSO₄

L'expérimentation se conduit avec le milieu synthétique de base. Les concentrations de MgSO₄ varient de 0,1 à 0,8 g/L. La fermentation et la production de biomasse ont été suivies pendant 24 heures.

2.4 Effet de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$

L'effet de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ sur la croissance microbienne (biomasse) et la production d'éthanol a été suivie pendant 24 heures avec des concentrations croissantes de 0,1 à 0,8 g/L. Les mêmes types de cinétiques ont été mesurés durant 24 heures.

2.5 Effet de MnSO_4

Les concentrations de MnSO_4 dans le milieu de culture varient de 0,1 à 0,8 g/L. Pendant la technique a été utilisée. Les cinétiques de fermentation et de production de biomasse ont été évaluées pendant 24 heures.

2.6 Effet de la source d'azote (Extrait de levures)

Afin d'améliorer la production d'alcool par les souches levuriennes, le milieu synthétique de base a été enrichi avec différentes concentrations en extrait de levure respectivement : 5 à 30 g/L. Le même procédé a été appliqué pour le suivi de la fermentation et de la production de biomasse.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

**Partie 1 : Etude de la composition chimique et
macromoléculaire de la biomasse
(mangues et résidus)**

1. Composition chimique et macromoléculaire des résidus de mangues

Le tableau 4 rapporte la composition macromoléculaire et les aspects physico-chimiques obtenus sur les résidus de mangues. Les échantillons analysés sont regroupés par variété.

Tableau 4: Paramètres physico-chimiques des résidus de quatre (4) variétés de mangues.

Paramètre	Variété	Zill (Z)	Sauvage (S)	Brook (B)	Amélie (A)
	Pulpe				
pH		3,61± 0,3	4,48± 0,4	3,51± 0,38	4,71± 0,36
% Humidité (g/g)		76,36 ± 0,2	83,10 ± 0,5	76,50 ± 0,27	78,78 ± 0,29
% Matière sèche totale (g/g)		23,64 ± 0,32	16,90 ± 0,45	23,49 ± 0,35	21,22 ± 0,26
% Cendres (g/g)		2,03 ± 0,1	1,60 ± 0,3	2,71 ± 0,43	3,01 ± 0,16
% Sucres réducteurs (g/g)		2,81 ± 0,4	2,36 ± 0,38	2,82 ± 0,47	5,70 ± 0,29
% Sucres totaux (g/g)		6,38 ± 0,2	4,56 ± 0,3	6,34 ± 0,4	10,39 ± 0,26
% Amidon (g/g)		0,79± 0,2	0,74± 0,11	0,65± 0,25	0,33± 0,15
Noyau					
% Sucres totaux (g/g)		19,81± 0,3	20,40± 0,11	20,12± 0,13	22,62± 0,2
% Amidon (g/g)		18,22± 0,27	18,77± 0,13	18,51± 0,23	21,81± 0,18

La mesure du pH des échantillons de résidus de mangue montre que les variétés Amélie (A) et sauvage (S) présentant des valeurs moyennes respectives de $4,48 \pm 0,4$ et $4,71 \pm 0,36$ sont moins acides que celles de Zill ($3,61 \pm 0,3$) et Brook ($3,51 \pm 0,38$). Les travaux d'Akubor (1996) ont montré que la variété sauvage a un pH de 5,12; de même ceux de Hossain et collaborateurs (2001) indiquent des pH compris entre 4 à 6 pour différentes variétés de mangues.

Le pH est lié à l'acidité totale de la pulpe, due à la présence des acides organiques. Le taux d'acides organiques peut augmenter suite à une oxydation incomplète du glucose; par ailleurs une forte proportion d'acides organiques peut engendrer un pH acide. Ces pH acides offrent un avantage au développement des levures et moisissures par rapport aux autres microorganismes.

Les taux d'humidité compris entre $83,10 \pm 0,5\%$ et $76,36 \pm 0,2\%$ varient d'une manière inversement proportionnelle à ceux de la matière sèche totale. Les taux de matière sèche totale obtenus dans les quatre variétés de mangue varient de $16,90 \pm 0,45\%$ à $23,64 \pm 0,32\%$. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Hossain et collaborateurs (2001) qui indiquent que le taux de matière sèche totale pour la mangue fraîche se situe entre 17,60% à et 23,50%. D'autres recherches antérieures menées par Colin et collaborateurs (1981) avaient montrés des valeurs comprises entre 14,37% et 20,35%.

Les taux de cendres restent faibles avec une moyenne comprise entre $1,60 \pm 0,3\%$ et $3,01 \pm 0,16\%$. Les taux de matière sèche varient de $16,90 \pm 0,45$ à $23,64 \pm 0,32$ témoignant une forte teneur en eau, car il existe une corrélation entre ces deux paramètres. Askar et collaborateurs (1972) ont montré que l'augmentation de la teneur en matière sèche résulte d'une diminution de celle en eau et vice-versa. La teneur eau élevée prédisposerait la mangue fraîche à une prolifération microbienne.

La teneur en sucres réducteurs de la variété Amélie double celle des trois autres variétés. Les teneurs moyennes se situent entre $2,36 \pm 0,38\%$ et $5,70 \pm 0,29\%$ et sont proches de valeurs présentées par Hossain et collaborateurs (2001) qui sont de 6,58% à 10,35% pour la pulpe fraîche. Elles sont comparables également aux valeurs obtenues dans d'autres fruits tels que la banane, l'orange, l'ananas qui varient de 4 à 15 % (Akubor, 1996).

Les faibles taux de sucres réducteurs dans les mangues sont dus à leur dégradation par des enzymes ou l'action microbienne. Les sucres sont alors fermentés et les alcools se condensent avec les acides pour donner des esters. La conséquence est une perte d'eau, de sucres, d'acides et de saveur. Les déchets de mangues peuvent donc en même temps constituer une source pour le prélèvement des souches de microorganismes utilisateurs de sucres.

Les pourcentages en sucres totaux varient de $4,56 \pm 0,3\%$ à $10,39 \pm 0,26\%$ pour la pulpe et de $19,81 \pm 0,3\%$ à $22,62 \pm 0,2\%$ pour le noyau. Ces valeurs pour la pulpe sont faibles par rapport à celles trouvées par Hossain et collaborateurs en 2001 (18,70% à 26,85%) et par Akubor en 1996 (21%), tandis que celles obtenus pour le noyau sont comparables aux données des mêmes auteurs.

Egalement ces valeurs de la pulpe sont également faibles comparées à celles trouvées par Traoré et Konlani (1989) dans la mélasse (38,57%).

Le taux d'amidon dans la pulpe varie de $0,33 \pm 0,15$ à $0,79 \pm 0,2$ et est largement inférieur à celui contenu dans le noyau ($18,22 \pm 0,27$ à $21,81 \pm 0,18$).

Les teneurs en sucres totaux dans les résidus de la pulpe révélées dans nos travaux sont inférieures à celles du noyau. Cette différence peut s'expliquer par la forte proportion d'amidon dans le noyau (difficilement dégradables).

**Partie 2 : Isolement des souches de bactéries
et de levures et essai taxonomique**

1. Isolement et identification phénotypique des souches levuriennes

La sélection basée sur des critères morphologiques et culturels, a permis de sélectionner 20 souches. Les caractéristiques essentielles des souches retenues sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Principales caractéristiques des souches de levures retenues

Souches levuriennes									
Caractéristiques	S1	S2	S3	S4	A1	B1	W1, 2, 5, 6	Saccharomyces sp*	Schizosaccharomyces sp*
Morphologie	O/S	O/S	O/S	O/S	O/S	O/S	O/S	Ovoïde/Sphérique	Ovoïde/Sphérique (o/s)
Bourgeonnement/ Pseudo-mycelium	++	++	++	+/+	+/+	+/+	+/+	+	+
Aéro-anaérobie facultatif	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ascospores	8	8	4	4	4	4	4	4	8
Formation de voile blanche/ Sédiment	++	++	++	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Coloration de GRAM	+	+	+	+	+	+	+	+/+	+/+
Oxydase /Catalase	++	++	++	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Substrats métabolisés									
Acétate de sodium	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Lodder(1971)

Sur milieu solide il y a formation de colonies rondes, blanchâtres et mates ayant un diamètre moyen de 2 à 4 mm avec des contours ronds. La couleur blanchâtre des colonies évolue vers le gris au fur et à mesure que se prolonge la durée de conservation. Au microscope on observe des cellules ovoïdes ou associées par paire formant des pseudo-mycéliums. En plus, on observe en milieu liquide la formation d'un voile blanchâtre avec un dépôt de sédiments au fond du tube ; le milieu trouble s'éclaircit au bout de 72 heures. Parmi les sources de carbone mises à la disposition des souches, seuls l'amidon et le lactose ne sont pas métabolisés. Les différents examens de caractérisation ont permis de rassembler les caractéristiques essentielles afin de regrouper et classer des souches isolées.

Les caractères des souches sélectionnées (Tableau 5) se rapprochent de ceux publiés par Obisanya (1987) sur les levures. Les caractéristiques obtenues des levures ont permis de réaliser leur identification partielle par la clé dichotomique de Lodder (1971). Au regard des résultats du tableau 5, les souches S1, S2 pourraient appartenir au genre *Schizosaccharomyces* et S3, S4, A1, B1, W1, W2, W5, W6 au genre *Saccharomyces*.

La capacité à fermenter et la performance de ces souches ont été testées en milieu glucosé et en milieu contenant les résidus de mangues comme hydrate de carbone. L'article 1 (Somda *et al.*, 2010) rapporte les détails expérimentaux, les résultats majeurs obtenus sur les caractéristiques de 04 souches de levures sélectionnées (S1, S2, S3, S4) et la capacité à fermenter les résidus de mangues de 02 souches de levures (S1, S3). Il en ressort que les colonies obtenues sont lisses, de forme sphéroïdes, de diamètre compris entre 2 à 5mm, et pourvues d'ascospores (4 et 8); pourraient appartenir respectivement au genre *Saccharomyces* et *Schizosaccharomyces*. Elles présentent les atouts nécessaires pour leur utilisation en fermentation. Les souches S1 et S3 retenues, possèdent des rendements de biomasse de l'ordre respectif 0,36 et 0,28; ainsi que des rendements en alcool de 0,46 et 0,39.

Production of alcohol from mango (*Mangifera Indica* L.) using *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces* genus isolated from wasted mangos in Burkina Faso

MARIUS KOUNBÈSIOUNÈ SOMDA¹, ALY SAVADOGO¹, CHEIK AMADOU TIDIANE OUATTARA¹, ABOUBAKAR SIDIKI OUATTARA¹ and ALFRED SABADÉNÉDYO TRAORE¹

¹Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN). Université de Ouagadougou (Burkina Faso).

(Received: May 10, 2009; Accepted: July 04, 2009)

ABSTRACT

Analysis of four varieties mangos juice (*Amelia*, *Brook*, *Wild*, *Zill*) showed that their pulp contained an average 13.12 % (w/w) to 25.78 % (w/w) of total sugar and pH various to 3.61 to 5.20. The sugars were fermented with strains of yeasts isolated from wasted mangos. These yeasts belong to the *Saccharomyces* (S₃) and *Schizosaccharomyces* (S₄) genus. The pH and total sugars values decreased while alcohol increased with increasing period of fermentation. The mango juice fermented respectively with *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces* genus showed 12 % (v/v) and 5.5 % (v/v) of alcohol.

Key words: Biomass, pulp, sugar, yeast, fermentation, ethanol

INTRODUCTION

Burkina Faso and the others developing countries have long been with problems of processing and preservation of locally produced agricultural food products. The lack of solutions to these problems had led to enormous losses of the fruits harvest. Five thousand tones of mango (*Mangifera indica* L.) lossed per year in Burkina Faso (Fogue, 1998). Mango is a climacteric fruit and long distance transport is sometimes a problem. Latent fungal infections reported in mango are *Alternaria alternata* (Prusky *et al.*, 1983), *Colletotrichum* sp. (Peterson, 1986), *Dothiorella* sp. (Johnson *et al.*, 1991) and *Fusarium subglutinans* (Ploetz, 1994), which are present in the shoot tips and in different parts of the panicle even in the healthy ones; though, in lower density (Kumar, 1983). Anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. is regarded as one of the single most significant production and post-harvest problem (Dodd *et al.*, 1998). In West Africa, the tropical fruit like mango grow in abundance even in

the wild (Aderiye *et al.*, 1990). In this way the fruit apple is consumed to a considerable extent, however large quantities are usually wasted. One of the methods of processing and preserving mango is to ferment the mango juice, which has high carbohydrate content into alcohol like ethanol (Obisanya *et al.*, 1987).

Good quality wines as well as acetic acid have been produced from a number of various mangos. But the composition of the available fermentescibles sugars and the acidity are critical factors which determine their suitability for alcohol production (Amerine *et al.*, 1980). Also the mango juice is pasteurised and used for drinking. The object of this study were to analyse the chemical compounds of four mango varieties and undertake the fermentation of mango juice into ethanol using locally isolated yeasts like *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces* genus from the wasted or crop mangos.

MATERIAL AND METHODS

Yeast culture

The yeasts were isolated by separating the cells coming from wasted mangos (*Amelia*, *Brooks*, *Wild*, *Zill* varieties).

These cells were then streaked on plates of malt extract agar (DIFCO) and yeast extract agar (DIFCO) and incubated at 26°C for 48 hours. Pure cells were obtained after three further subcultures and microscopic analysis. The yeast strains were transferred and maintained at 4°C on Wickerham agar slants until needed (Obisanya et al., 1987).

Morphological and cultural characteristics

The morphological characteristics of the yeast were determined by microscopic examination after staining with crystal violet and methylene blue.

The cultural characteristics were studied on corn meal agar, potato dextrose agar and sodium acetate agar plates (Obisanya et al., 1987).

Physiological characteristics

Before each physiological study, the yeasts were subcultured twice on the Wickerham agar medium. Then inocula were grown aerobically in Erlenmeyer flasks containing the synthetic glucose medium contained per liter of water distilled (3g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2g KH_2PO_4 ; 0.5g MgSO_4 ; 0.75g Na_2HPO_4 ; 3g Yeast extract and 20g Glucose); at 26°C on a rotary shaker at 150 rpm for 12h (Konlani et al., 1996).

Experiments on the effect of initial sugar concentration were conducted in 500ml flasks with 200 ml of synthetic glucose medium incubated at 30°C. On a rotary shaker at 150 rpm.

The initial glucose concentrations tested were 5, 10, 20 and 80 g/l. The carbon source was sterilized separately.

Cultures were monitored by sampling (10 ml) at the beginning of each experiment and after each hour of culture. In 10 ml of culture, the residual glucose and the cell biomass were determined before to analyse the yeasts growth kinetics parameters.

Residual sugars were determined as glucose by the colorimetric method using 3,6 dinitrosalicylic acids (DNS): 1 ml of diluted supernatant left after the separation of the biomass was mixed with 1 ml of dinitrosalicylic acid and heated to 100°C for 5 min.

The reaction was stopped in ice and optical density was read at 540 nm against a glucose standard graph (Miller, 1969).

Dry cell mass was determined gravimetrically. Cells were harvested by centrifugation with 10 ml of culture at 10.000 rpm for 10 min, at 25°C, washed twice with saline water (NaCl 9‰) and weighed after 24 h at 105°C (Konlani et al., 1996).

Preparation of mango juice

One hundred (100) mature, ripe and healthy mangos (*Amelia*, *Brooks*, *wild*, *Zill* varieties) were taken from four principles areas producers (Ouagadougou, Bobo-Dioulasso, Koudougou, Banfora) in Burkina Faso. The mangos were sorted, wasted and peeled manually using a clean knife. About 100g of the pulp (each variety) was blended with 500 ml of hot water in Kenwood blender. That gave 1:5 (pulp/ water) dilution. The slurry was filtered through a double folded cloth to obtain the juice. Potassium metabisulphite at 0.1% (w/v) was added and the juice was pasteurised at 60°C for 3 min and stored in a freezer at 5°C until analysis.

Physico-chemical properties analysis from four varieties mangos juice

The pH for each sample (solution of matter quantity of mangos in liquid: 30 % w/v) was measured with a pHmeter standardised with acetate buffer pH4.0 according to AOAC method. Moisture and ash were determined by oven drying respectively at 105°C and 550°C (AOAC, 1980).

Total sugars were estimated by phenol sulphuric acid method (Fox, 1991).

Fermentation of mango juice (Amelia)

The fermentation has carried on the mango juice and the synthetic glucose medium at 30°C for 21 days.

Microorganisms and inoculum preparation

Before each fermentation, four retained yeast were subcultured twice on the Wickerham agar medium and the inocula were grown aerobically in Erlenmeyer flasks containing the glucose medium at 26°C on a rotary shaker at 150 rpm for 24h.

Fermentation condition

The variety Amelia then *Saccharomyces sp.* (S₃) and *Schizosaccharomyces sp.* (S₁) genus were using for the fermentation experiment. Variety Amelia has been choised for it high level sugars contains. For the yeast choice their performance was assessed according to the fermentative potential based on the determination of the kinetic parameter (maximum specific growth speed) and specific production parameters (ethanol and cellular yields). The treated of ten aspirator bottles. Each bottle was seeded with 5% (v/v) of the 24h yeast inoculum separately *Saccharomyces sp.* (S₃) and *Schizosaccharomyces sp.* (S₁). The bottles were closed with rubber stoppers fitted with fermentation locks containing an aqueous solution of 200 mg/l potassium metabisulphite. The mixture was incubated at 30°C for 21 days.

The pH and alcohol concentration were monitored daily during the fermentation. Racking was done for the fermenting juices when evolution of gas diminished at the end of primary fermentation.

The racked fermenting juices were transferred to clean sterile aspirator bottles with fermentation locks containing 250 mg/l potassium metabisulphite. Chemical changes were monitored at 7 days intervals until gas evolution stopped. The alcohol were transferred into bottles and stored in a refrigerator at 10 ± 2°C for alcohol stability. The same experiment is carried on the synthetic glucose medium.

Analytical methods

The pH was measured with a pH meter standardised with acetate buffer pH4.0 according to method AOAC. Ethanol was measured by gas chromatography (121 DFL -Intersmat) using 60/80 carboxack B, 15% Carbowax 20M glass column and a flame ionization detector.

The column temperature was 85°C and the carrier gas was nitrogen. Methanol was used as internal standard.

RESULTS AND DISCUSSION

Yeasts Characteristics

Global isolation has given twenties yeasts, but morphological and cultural characterization permit to retain four yeasts for the following study. The figures (1a, 1b) show the microscopic observation of strains yeasts belonging respectively to *Saccharomyces* and *Schizoaccharomyces* genus. The morphological and cultural characteristics of these yeasts are presented in Table1 below.

The morphological and cultural characteristics of the yeast isolated are presented in table 1. Strains S₁ and S₂ formed eight ascospores per ascus, produced extensive mycelium and multiplied by fission. Both of strains S₃ and S₄ showed the following principal characteristics vegetative of spherical, ellipsoidal or cylindrical cells by budding, production of sparse pseudomycelium after one week, and formation of four ascospores per ascus.

The morphological and cultural characteristics results found on strains S₃ and S₄ show according to Fowell (1969) probably their belong to *Saccharomyces* genus. Other reason of their appurtenance to *Saccharomyces* genus is flocculation ability according to Sree et al. (2000) and Nahvi et al. (2002). Strains S₁ and S₂ were identified as members of the *Schizosaccharomyces* because they formed eight ascospores per ascus and multiplied by fission (Obisanya et al., 1987).

Yeast physiological characteristics

The results related to the influence of initial substrate concentration (S₀) on growth parameters of *Saccharomyces sp.* (S₃) and *Schizosaccharomyces sp.* (S₁) are presented in table 2. The maximum specific growth rate were respectively 0.35 h⁻¹ and 0.37 h⁻¹ on both yeasts and can be compared with 0.388 h⁻¹ found by Neves et al. (2005) on the yeasts during wheat flour simultaneous saccharification and fermentation.

During the yeast strains test, the highest biomass yields per unit of glucose used ($Y_{x/s}$) were observed at low concentration of glucose. An increase in substrate level from 5 to 80 g/l, the percentage of sugar used for production of cell biomass decreased whatever the yeast strain.

At the different glucose concentration tested both yeast strains (S_1 ; S_3) were unable to convert all the sugar into biomass. A portion of the

sugar was transformed into ethanol. This phenomenon which occurred in good aeration conditions is called the Crabtree effect (Van Dijken and Scheffers, 1986) and could explain the present low cell yields compared with that of *Candida utilis* (0.5 g/g). A Crabtree negative yeast strain which does not produce any ethanol under sufficient oxygen supply at a glucose concentration of 20 g/l (Moss et al., 1969). The best biomass yield requires low glucose concentration condition (S_0).

Table 1: Morphological and cultural characteristics of yeast strains

Yeast	Morphology	Pseudomycelium formation	Ascospores per ascus	Diameter of separate colony
S_1	Smooth edges colonies, creamy	Ovoid cells with extensive developed	8	5 mm cells reproducing by fission
S_2	Separated edges colonies, creamy	Extensive cells	8	3 mm cells reproducing by fission
S_3	Smooth edges colonies	Sparsely formed	4	2 mm ellipsoidal cells
S_4	Smooth edges colonies	Extensive cells	4	3mm spherical cells

Table 2: Influence of initial glucose concentration (S_0) on the growth parameters of

Initial glucose concentration (g/l)	Saccharomyces sp (S_2)				Schizosaccharomyces sp (S_1)			
	5	10	20	80	5	10	20	80
Biomass (g/l)	1.60	2.60	4.44	8.92	1.43	2.11	3.08	6.87
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.36	0.28	0.24	0.13	0.28	0.20	0.19	0.08
$Y_{e/s}$ (g/g)	0.25	0.32	0.35	0.46	0.18	0.27	0.29	0.39
Percentage of glucose used for biomass production (Xs)	66	51.6	44.25	44.25	4.40	41.60	38.60	17.10
μ_{max} (h^{-1})	0.25	0.35	0.34	0.20	0.32	0.35	0.37	0.15

Table 3: Physico-chemical properties of four mangos juice

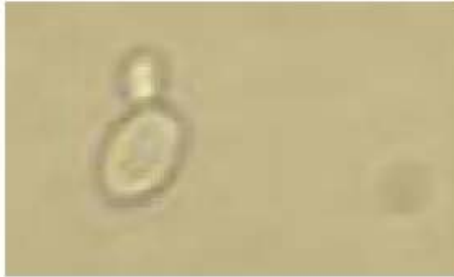
Mangos used	pH	% Ash (g/g)	Moisture (w/w)	%Total sugars (w/w)
Amelia (A)	5.20	1.60	83.64	25.78
Brook (B)	4.71	2.71	83.49	17.68
Wild(W)	4.48	2.30	76.90	13.12
Zill (Z)	3.61	2.05	81.22	16.76

Physico-chemical properties analysis from four mangos juice

The **table3** shows the physico-chemical properties of four varieties mangos juice.

The pH values various from 5.20 to 3.61. Among these varieties; juice of *Amelia* variety was

less acid. These findings were similar to those reported for African bush mango juice (Akubor; 1995) and other fruits like: banana and orange (Maldonado et al., 1975). The sugars proportions averaged 13.12 % (w/w) to 25.78 % (w/w) were highest than these reported by Akubor (1995) on African Bush mango juice. But it can be compare

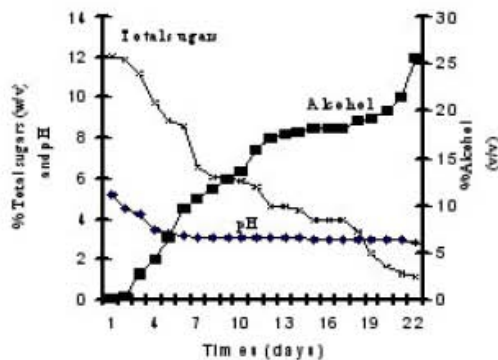


The figures (1a, 1b) show the microscopic observation of strains yeasts belonging respectively to *Saccharomyces* and *Schizoaccharomyces* genus. The morphological and cultural characteristics of these yeasts are presented in Table1 below.

Fig. 1a: *Saccharomyces sp. cells*

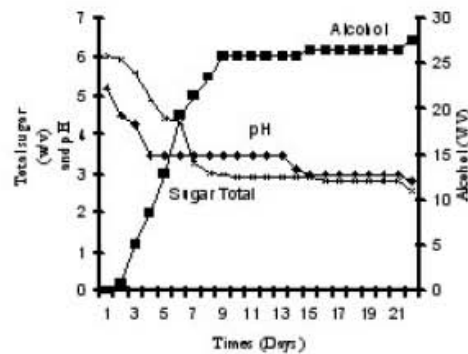
Fig.1b: *Schizoaccharomyces sp. cells*

The colonies have been isolated from wasted mangos.



- ◆ Total sugars
- ◆ pH
- × Alcohol

Fig. 2a: Batch fermentation profile of *Amelia* mango juice using *Saccharomyces sp* (S3). Ethanol, total sugars, and pH evolution during the fermentation by the cultures obtained from the colonies isolated from wasted mangos



- ◆ Total sugar
- ◆ pH
- × Alcohol

Fig. 2b: Batch fermentation profile of *Amelia* mango juice using *Schizosaccharomyces sp* (S1). Ethanol, total sugars, and pH evolution during the fermentation by the cultures obtained from the colonies isolated from wasted mangos

to the tropical fruits like banana, pineapple and orange which ranged between 4 % and 15 % (Maldonado et al., 1975). Concerning the ash content it varies from 1.60 to 2.71 % was highest than the proportion found in bush mango. The ash contents the mineral elements which could be used by yeast to grow.

So these results obtained suggest that variety *Amelia* mango juice will produce a good quality alcohol (ethanol) and since the juice composition would have a remarkable effect on the alcoholic fermentation.

Ethanol production during the mango (*Amelia*) juice fermentation

The fermentation profiles of yeast strains in mango (*Amelia*) are shown in Figure 2a to 2b.

Fermentation with *Saccharomyces sp.* resulted in total sugars decreasing from 25.78 to 9.9 % (w/v) in first 12 days, which corresponding to the primary fermentation period, but later decreasing to 2.5 % (w/v) over the next 21 days. For yeast strains *Schizosaccharomyces sp.* The total sugar decreased from 25.78 to 12.6 % (w/v) in 12 days and decreased to less than over the following 21 days. The yeast strains, which belong to the genus *Saccharomyces*, exhibited a higher fermentative rate than strains *Schizosaccharomyces*. These sugars were used for alcohol and organic acid production. This confirms the findings of Obisanya et al. (2007) that *Schizosaccharomyces* species ferment sugars at a rate of 50 % slower than *Saccharomyces* species.

The pH decrease respectively from 5.2 to 3.0 and 5.2 to 3.5 at the 14th days with strains of *Saccharomyces*, and *Schizosaccharomyces*. Similar observations have been made for wine produced from African bush mango juice with

Akubor (1995) while pH from 5.12 to 3.10. This decrease in pH was desirable as it helped to maintain the pH of the alcohol low enough to inhibit the growth of undesirable microorganisms.

Concerning the alcohol, its level increased from 0.5 to 8.5 % (v/v) and 0.2 to 6.2 % (v/v) at the end of the 14 days respectively for each strain of yeast. This level grows until to 12 % (v/v) for *Saccharomyces* and 6.4 % (v/v) for *Schizosaccharomyces*, although the fermentation juice left for 21 days. A noticeable growth of alcohol during *Schizosaccharomyces* fermentation at the 14 days is due to the utilisation of organic acid (acid malic) to produce alcohol. This characteristic is typical of yeast of the genus *Schizosaccharomyces* according to Kunkee and Amerine (1970). The results obtained can be compared with Akubor (1995) experiment who found 8.5 % (v/v) of alcohol at 21st days.

Other authors like Obisanya et al. (2007) reported 12% (v/v) alcohol produced on sugar with *Saccharomyces sp.* Sree et al. (1999) reported ethanol production by SSF of wheat products using *Saccharomyces cerevisiae*, which was 44.2 g ethanol/l.

As Lee et al. (1992) studied ethanol production using *Zymomonas mobilis* and slurries containing 100g/l of sago starch and found 40 g/l of ethanol. Some authors were able to obtain even higher ethanol production, such as 93 g/l or 140 g/l (Chi et al., 1999).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank The CRSBAN of Ouagadougou (Burkina Faso) for funding our studies on sugar-fermenting yeasts.

REFERENCES

1. AOAC, Official Methods of Analysis, 13th Edn. Association of official Analytical chemists, Washington, DC (1980).
2. Aderiye, B.I., M.A. Akpapunam and P.I. Akubor, Effect of fermentation variables on the quality of cashew wine. *J. Agric. Sci.*

- technol.*, **1**(1): 16-69 (1990).
3. Akubor, P.I., The suitability of African bush mango juice for wine production. *Plant Foods for Human Nutri.*, **49**: 213-219 (1996).
 4. Amerine, M.A., and C.S. Ough, Methods of analysis of musts and wine. In New York, John Wiley. 241 (1980).
 5. Chi, Z., S.D. Kohlwein and F. Paltauf, Role of phosphatidylinositol (PI) in ethanol production and ethanol tolerance by a high ethanol producing yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **22**:58-63 (1999).
 6. Dodd J.C., D. Prusky and P. Jeffris, Fruits diseases. In: Litz RE. The Mango-Botany, Production and Uses. (Eds.). Wallingford Oxon/CAB. International, 257-280 (1998).
 7. Fogue, Technologie de séchage des fruits et légumes. Service d'appui aux PME (SAPE) ; CEAS Ouagadougou. Burkina Faso. 51 (1998).
 8. Fowell, R.R., Life cycles in yeast. In the yeasts, Rose, A.H. and J.S. Harrison, **1**: 303-383 (1969).
 9. Fox, J.D., and J.F. Robyt, Miniaturization of three carbohydrate analysis using a microsample plate reader. *Anal. Bioch.*, **195**: 93-96 (1991).
 10. Johnson, G.I., A.J. Mead, A.W. Cooke and J.R. Dean, Mango stem and rot pathogens-infection levels between flowering and harvest. *Ann. Appl Biol.*, **119**: 465-73 (1991).
 11. Konlani, S., J.P. Delgenes, R. Moletta, A.S. Traore and A. Do, Optimisation of cell yield of *Candida Krusei* S01 and *Saccharomyces* sp. LK3G cultured in sorghum hydrolysate. *J. Bioress. Technol.*, **57**: 275-281 (1996).
 12. Kumar J., Studies on symptomatology, etiology and control of mango malformation. *Ph.D. Thesis*, G.B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar (1983).
 13. Kunkee, R.E. and M.A. Amerine, Yeasts in wine making. In *The yeasts*, Rose, A.H. and J.S. Harrison, (Eds.)s., London: Academic press, **3**: 6-71 (1970)
 14. Lee, C.G., C.H. Kim and S.K. Rhee, A kinetic model and simulation of starch saccharification and simultaneous ethanol fermentation by amyloglucosidase and *Zymomonas mobilis*. *Bioprocess Eng.* **7**: 335-34 (1992).
 15. Maldonado, O., C. Roll, S.S. Cabrera and C.S. Schneider, Wine and vinegar production from tropical fruits. *J. Food Sci.*, **40**: 262-265 (1975).
 16. Neves, M.A., T. Kimura, N. Shimizu and K. Shiiba, Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. *J. Zaffius Biotech.* **1**(2): 1-10 (2005).
 17. Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428 (1969).
 18. Moss, F.J.P., A.D. Richard, F.E. Bush and P. Caigen, The response by microorganism to steady-state growing controlled concentration of oxygen and glucose (1969).
 19. Nahvi, I., G. Emtiazi and L. Alkabi, Isolation of flocculating *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. *J. Biomass Bioenergy* **23**: 481-486 (2002).
 20. Obisanya, M.O., J.O. Aina and G.B. Oguntimein, Production of wine from mango (*Mangifera indica* L.) using *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces* species isolated from palm wine. *J. of App. Bacteriol.*, **63**: 191-196 (1987).
 21. Peterson, R.A., Mango diseases. Proceedings of the CSIRO First Australian Mango Research Workshop. 233-247 (1986).
 22. Ploetz, R.C., Distribution and prevalence of *Fusarium subglutinans* in mango tree affected by malformation. *Can. J. Bot.*, **72**: 7-9 (1994).
 23. Prusky, D., Y. Fuchs, and U. Yanko,

- Assessment of latent infections as a basis for control of post harvest disease of mango. *Plant Dis.*, **67**: 816-818 (1983).
24. Sree, N.K., M. Sridhar, K. Suresh and L.V. Rao, High alcohol production by solid substrate fermentation from starchy substrates using thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioproc. Eng.* **20**: 561-563 (1999).
25. Sree, N.K., M. Sridhar, K. Suresh, I.M. Banat and L.V. Rao, Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Biores. Technol.* **72** : 43-46 (2000).
26. Van Dijken, J.P., and W.A. Scheffers, Redox balance in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**: 199-224 (1986).

2. Sélection et identification phénotypique des souches bactériennes

Les résultats obtenus sur les bactéries et présentés dans le tableau 6 montrent que ce sont des bacilles Gram positif ou négatif, aérobies anaérobies facultatifs, douées ou non d'une mobilité. Leur culture sur milieu solide se caractérise par des colonies polymorphes. Ces souches ont un métabolisme respiratoire et fermentaire. Elles sont productrices de catalase, d'oxydase, mais toutes productrices d'acétoïne. Ce sont des souches non sporulantes ou sporulantes dont l'extrême résistance des spores leur confère un caractère ubiquiste. A la différence des souches de levures, elles ont la capacité ou non de métaboliser l'amidon. La production de catalase par les souches permet d'exclure *B. anthracis* et *B. cereus var. mycoïdes*.

Tableau 6: Caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques des souches bactériennes retenues

Souches	Sb1	Sb2	Sb3	Sb4	Bacillus Sp*
Caractéristiques	(A1M1)				
Aspect	Bord régulier, Blanchâtre, $\varnothing = 1 \text{ mm}$	Bord régulier, Blanchâtre, $\varnothing \leq 2 \text{ mm}$	Bord régulier, Blanchâtre, $\varnothing = 2 \text{ mm}$	Bord régulier, Blanchâtre, $\varnothing \leq 2 \text{ mm}$	Bord régulier, Blanchâtre, $1 \leq \varnothing \leq 2 \text{ mm}$
Forme	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles
Regroupement	chaînettes	chaînettes	Chaînettes	chaînettes	chaînettes
Gram	+	+	-	-	+/-
Oxydase	+	+	+	+	+
catalase	+	+	+	+	+
Mobilité	+	+	+	+	+/-
V P	+	+	-	-	+/-
R M	-	-	+	+	+
Sporulation	+	+	-	-	+/-
Amidon	+	-	-	+/-	+/-
Glucose	+ ^G	+ ^G	+ ^G	+ ^G	+ ^G
Fructose	+ ^G	+ ^G	+ ^G	+ ^G	+ ^G
Saccharose	+ ^G	+ ^g	+ ^G	+ ^G	+ ^G

**Bergey manual of determinative bacteriology*

+^G: Utilisation avec production de gaz ; +^g: Faible production de gaz ; + : test positif ; - : test négatif

V P : test de Voges-Proskauer ; RM : test de rouge de méthyle ; \varnothing = diamètre

Sur la base des critères définis dans le "Bergey's Manual of determinative Bacteriology", les caractéristiques globales morphologiques, biochimiques et physiologiques relatives aux *Bacillus* (Gram, catalase, oxydase, sporulation, respiration, mobilité) permettent d'affilier les souches bactériennes sélectionnées au genre *Bacillus*.

Ces souches peuvent être affiliées à la famille des *Bacillaceae*. Elles pourraient appartenir probablement au genre *Bacillus* car elles possèdent des caractères retrouvés chez *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* et *Bacillus licheniformis* (Buchaman et Gibbons, 1975). Les souches de *Bacillus* sélectionnées ont été utilisées pour l'hydrolyse des glucides non réductibles afin d'améliorer le taux de sucres réducteurs et d'optimiser le rendement de la fermentation.

**Partie 3 : Etude des paramètres
environnementaux sur les potentialités
des souches isolées**

L'étude réalisée sur l'effet de différents facteurs environnementaux concernant la croissance de souches du genre *Saccharomyces* a permis de confirmer que cette croissance microbienne est influencée notamment par les constituants du milieu de culture et mais également par les facteurs physico-chimiques (température, alcool, etc...). Parmi ces facteurs l'influence de la température est principale. Le tableau 7 présente l'influence de la température sur les performances cinétiques de deux souches de levures retenues pour leur performance.

Tableau 7 : Paramètres cinétiques de deux souches levuriennes à 40, 42 to 45°C en présence 80g/l de glucose.

Paramètres cinétiques	Souches levuriennes					
	W6			B1		
	40°C	42°C	45°C	40°C	42°C	45°C
Yx/s (g X/g S)	0,14 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,04	0,1 ± 0,04	0,08 ± 0,04
YE/s (g E/g S)	0,35 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,30 ± 0,04	0,24 ± 0,05	0,16 ± 0,08

Les résultats obtenus montrent que les souches sont thermotolérantes car capables de supporter des températures variant de 40°C à 45°C et qu'elles tolèrent également des degrés alcooliques de 12°. Cette tolérance aux températures élevées pourrait s'expliquer par la synthèse de certains groupes de protéines. Hiraishi et collaborateurs (2006) ont observé ce même phénomène de thermotolérance chez certaines levures, et ont mis en souligné l'implication des protéines.

Les résultats des paramètres cinétiques montrent que la souche W6 présente des rendements de biomasse de 0,14 ± 0,03 et 0,11 ± 0,01 et d'éthanol de 0,35 ± 0,04 et 0,18 ± 0,01 respectivement à 40°C et 45°C. Quant à la souche B1, elle possède des rendements légèrement inférieurs de biomasse de 0,17 ± 0,04 et 0,08 ± 0,04 et d'éthanol de 0,30 ± 0,04 et 0,16 ± 0,08.

L'étude des facteurs environnementaux sur les souches a permis d'accroître leurs potentialités fermentaires dans le processus de fermentation simultanée. Les principaux résultats (Somda *et al.*, 2011a) ont montré que l'hydrolyse enzymatique (par la souche Sb1) des résidus de mangues, a permis d'obtenir 62% de conversion de substrats en sucres réductibles. A la suite de la fermentation simultanée, les souches levuriennes W6 et B1 ont fournis des rendements alcooliques de l'ordre respectif de 0,35 et 0,30 (g/g).

Thermotolerant and Alcohol-Tolerant Yeasts Targeted to Optimize Hydrolyzation from Mango Peel for High Bioethanol Production

M.K. Somda, A. Savadogo, C.A.T. Ouattara, A.S. Ouattara and A.S. Traore

Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), Université de Ouagadougou (Burkina Faso), 03 BP: 7131 Ouagadougou, 03/Burkina Faso

*Corresponding Author: Marius Kounbèsiounè SOMDA, Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), Université de Ouagadougou, (Burkina Faso), 03 BP: 7131 Ouagadougou, 03/Burkina Faso
Tel/Fax: (00226) 50 33 73 73*

ABSTRACT

The use of mango peel (agricultural waste with no appreciable value to industries or competitive use as food) as alternative and cost-effective biomass for the production of bioethanol was examined. Thus, the aim of this study was to select performed yeasts strains able to ferment sugars containing in peel mango. The methods used, included: enzymatic hydrolysis with *Bacillus* and simultaneous saccharification and fermentation with W6 and B1, yeasts isolated from wine and among bakers yeasts, respectively. The kinetics parameters results showed that the optimum alcohol releasing like 35% (g E/g S) and 30% (g E/g S) respectively from W6 and B1 be spread out at 40°C. The maximum volume of ethanol produced from peel mango by W6 and B1 were, respectively 13 and 10.1 g L⁻¹ at the 120th.

Key words: Mango peel, fermentation, amylase, yeast, ethanol

INTRODUCTION

Tolerance to high temperatures and high ethanol concentrations are important properties of microorganisms of interest to industry. The fermentation efficiency of *S. cerevisiae* at high temperatures is very low due to increased fluidity in membranes to which the yeast responds by changing its fatty acids composition (Ohta *et al.*, 1988; Van Uden, 1984). For an efficient conversion of fibrous biomass to ethanol, another desirable microorganism characteristic is the capacity to ferment other sugars besides glucose, such as d-xylose and cellobiose obtained from hydrolysis of the material (Banat *et al.*, 1998; Miller, 1969).

The microorganisms employed in the fermentation of sugars from raw biomass into ethanol are principally bacteria and yeasts (Almeida *et al.*, 2007; Klinke *et al.*, 2004). The *Saccharomyces cerevisiae* yeast has proved to be more robust than bacteria, being more tolerant to ethanol and inhibitors present in hydrolysates of raw biomass materials like cellulosic (Olson and Hahn-Hagerdal, 1996).

Due to their potential applications, thermotolerant yeasts at temperatures above 35°C have been the object of many studies (Szczodrak and Targonsky, 1988; Liu *et al.*, 2009).

Stress or environmental stimuli can cause structural changes and/or metabolic changes in an organism acting as expression activator for genes involved in the synthesis of specific compounds that protect the organism (Banat *et al.*, 1998). Abiotic factors can be temperature, osmotic stress,

anaerobic conditions, heavy metals, growth regulators, ultraviolet radiation, metabolic repressors and pH (Chen and Chen, 2004; Rajoka *et al.*, 2005; Cakar *et al.*, 2005).

Stress due to temperature has been the most studied abiotic factor, where both heat and cold induce the synthesis or storing of a group of proteins that increase stress resistance (Hiraishi *et al.*, 2006; Yacoob and Fillion, 1987). Most of the time yeasts performances are researched to valorize biomass in this way it is necessary to find thermotolerant and alcohol-tolerant yeasts. Among the biomass researched, carbohydrates coming from mango are mainly important in Burkina Faso. And yet hydrolyzation of mango peel could optimize carbohydrates rate.

During processing of mango, byproducts such as peel and kernel are generated. Peel contributes about 15-20% of the fruit (Beerh *et al.*, 1976). As peel is not currently utilized for any commercial purposes, it is discarded as a waste and becoming a source of pollution. This waste should be treated as a specialized residue due to high levels.

The objective of this study was to select yeasts strains able to ferment sugars containing in peel mango pre-treated at high temperature and also able to resist alcoholic degree above.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and media: The selection was carried out on a total of 20 yeast strains. The strains codified as W1 to W10 were *S. cerevisiae* strains of wild origin isolated from wine cultures. Also the strains codified as B1 to B10 the Baker's yeast microorganism commonly used in industrial wine making. These strains were selected in Laboratory of Biotechnology and Microbiology during 2009.

The maintenance medium (used in agar plates) contained 20 g of glucose, 20 g of agar, 5 g of peptone, 5 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ per liter. The growth medium utilized in the liquid inoculation contained 50 g glucose, 5 g of yeast extract, 1 g of KH_2PO_4 , 0.3 g of NH_4Cl and 2 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ per liter. The fermentation medium in 0.05 M citrate buffer pH 4.8; 1.5 g peptone, 5 g of yeast extract, 1 g of KH_2PO_4 , 0.3 g of NH_4Cl and 2 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ per liter (Reference: Standard medium for yeasts growth).

Growth conditions: The evaluation of biomass was carried out in an orbital shaker at 150 rpm at different temperatures and times in 250 mL Erlenmeyer flasks, where each one contained 50 mL of growth medium.

The flasks were inoculated with a cell suspension at 5% (v/v) with 5×10^6 cells mL^{-1} . The biomass increase was determined by gravimetric and the results were expressed in mg in dry base.

Acclimatization treatment: The first selections of strains were carried out on Petri dishes with the maintenance medium by incubating them in an oven at 35, 40, 42, 45 and 50°C to isolate thermotolerant strains during 72 h. Biomass production and ethanol yield were evaluated. The fermentation yield was calculated assuming that 0.51 g ethanol/glucose in the culture medium. The verification of the thermotolerant qualities of the cultures obtained after acclimatization were performed by growing the yeasts on Petri dishes in the maintenance medium and incubating at 40, 42, 45 and 50°C.

Alcohol treatment: The same yeasts submitted to acclimatization treatment have been used alcohol treatment. Fermentation was conducted to 10, 12, 14, 15 and 18% (v/v) of alcohol (ethanol). Biomass production and ethanol yield were evaluated. The alcohol tolerant qualities verification of cultures is obtained by growing the yeasts on Petri dishes.

Colony selection: Colonies from strains that grew and produced ethanol at 40, 42 and 45°C and supported alcohol 15% were isolated from different biotope, in a maintenance medium; and evaluated by measuring the CO₂ displacement in a growth medium in a standard Hungate tube saccharimeter at 40°C and 24 h. The homogeneous cultures that achieved displacement above 30 mm were evaluated measuring the glucose consumption and production of biomass and ethanol. The concentration of reducing sugars was determined by dinitrosalicylic (DNS) colorimetric assay using glucose as sugar standard (Miller, 1959). The ethanol concentration was determined by distillation method (Humphrey and Okafoagu, 2007).

Dry weights were determined by drying yeast cells from 5 mL samples, for 24 h at 65°C, after centrifugation at 2000 g for 10 min and washing twice with 0.9% NaCl (w/v). All determinations were done by means of standard curves; results were the mean of three repetitions.

Peel liquefaction optimization: The hydrolysis was conducted at 55°C, with α -amylases produced by *Bacillus* A1M1 (Lab., of Poitiers). The peel hydrolysis performance was evaluated based on the liquefaction yield (g-reducers sugars/g-substrate).

Initially 1 L slurries containing 50 g L⁻¹ of mango substrate (peel) were prepared in distilled water and α -amylases from *Bacillus* were added; the samples were hydrolysed at the suitable temperature for 4 h with mild agitation (100 rpm).

Simultaneous saccharification and fermentation of mango substrate: The simultaneous peel hydrolyze and fermentation was carried out in a 500 mL Erlenmeyer flask at 10% substrate consistency in the SFF medium containing peel mango pre-treated as substrates (200 mg L⁻¹ potassium metabisulphite). After liquefaction, the pH was adjusted to 4.5, potassium metabisulphite and α -amylases from *Bacillus* have been added and temperature growing to 55°C to optimize reducers sugars releasing. At last yeasts inoculums (5% v/v with 2.5×10⁸ cells mL⁻¹) from the selected strains were added independently for each flask at 40°C. These yeasts were thermotolerant. SFF was performed at 40°C for 7 days at 150 rpm. The ethanol concentration was determined during fermentation process.

The theoretical SFF yield was calculated by assuming that all the potential glucose in the pretreated material was available for fermentation. The experiments were performed in triplicate.

Determination of ethanol

Determination of quantity of ethanol produced: The distillate collected over a slow heat at 78°C was measured using a measuring cylinder and expressed as the quantity of ethanol produced in g L⁻¹ by multiplying the volume of distillate collected at 78°C by the density of ethanol (0.8033 g mL⁻¹). The G L⁻¹ is equivalent to the yield of 100 g of dried substrate (Humphrey and Okafoagu, 2007).

Determination of percentage ethanol concentration: A standard ethanol density curve was prepared by taking series of percentage (v/v) ethanol solutions, which were prepared in volumetric flasks and the weight was measured. The density for each of the prepared ethanol solutions was calculated and a standard curve of density against percentage ethanol was plotted. The percentage ethanol concentration of ethanol produced was obtained by comparing its density with the standard ethanol density curve (600 nm).

RESULTS

Screening of thermotolerant and alcohol tolerant strains: All the yeasts grew in the maintenance medium at 35 and 40°C also resist at alcohol degree until 14°C. Only two strains (W2; B1) grew at 42°C and strains (B1, W5; W6) at 45°C.

- Selection of thermotolerant and Alcohol tolerant strains for ethanol production

The yeasts W6 and B1 present good yield of alcohol bioconversion respectively between 0.35 and 0.30 (g g⁻¹).

- Peel liquefaction optimization
- Ethanol production from peel mango sugar performed by simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

DISCUSSION

Screening of thermotolerant and alcohol tolerant strains: Only two strains (W2; B1) grew at 42°C and strains (B1, W5; W6) at 45°C. These strains could synthesis or storing of a group of proteins that increase stress resistance to the high temperature and alcohol degree. The same phenomenal resistance has been observed and explained by Hiraishi *et al.* (2006).

Selection of thermotolerant and alcohol tolerant strains for ethanol production: The strains that grew at 40, 42 and 45°C in the maintenance medium were incubated in the growth medium and the biomass and ethanol production were evaluated at 72 h in the same temperatures. These kinetics parameters results showed that the optimum alcohol releasing like 35% (g E/g S) and 30% (g E/g S), respectively from W6 and B1 be spread out at 40°C for the both kind of yeasts. In opposite the biomass get lower level. The thermophile nature of strains W6 and B1 is shown in Table 1. These two yeasts are indeed able to continue a fermentation rate close to normal beyond 37°C. This property could possibly be utilized simultaneously with amylase from *Bacillus* for peel substrate fermentation. The similar process using simultaneous yeast and amylase was realized on starch (Jamai *et al.*, 2007). At finally they found 49% (g E/g S).

Peel liquefaction optimization: The hydrolysis was conducted up to 4 h on mango peel containing 22.62% (g g⁻¹) of carbohydrates and the results shown in Fig. 1, shows that releasing of reducers sugars increased with enzymatic activity of *Bacillus*. Likewise it is noticed that there has not significant change or variation of reducers sugars rate without enzyme presence.

Table 1: Kinetics parameters for two yeasts at 40, 42 to 45°C at 72 h and average value of 3 replicates

Kinetics parameters (glucose) = 80 g L ⁻¹	Yeasts					
	W6			B1		
	40°C	42°C	45°C	40°C	42°C	45°C
Yx/s (g X/g S)	0.14±0.03	0.12±0.01	0.11±0.01	0.17±0.04	0.10±0.04	0.08±0.04
YE/s (g E/g S)	0.35±0.04	0.21±0.01	0.18±0.01	0.30±0.04	0.24±0.05	0.16±0.08

Yx/s (g X/g S): Yield of biomass (g) produced by substrate consumed (g). YE/s (g E/g S): Yield of ethanol (g) produced by substrate consumed (g). X: Biomass, S: Substrate, E: Ethanol

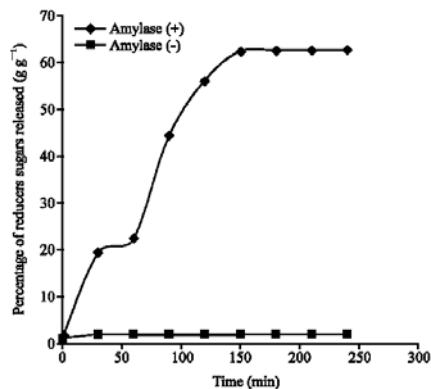


Fig. 1: Following of reducers sugars percentage releasing through carbohydrates hydrolysis on peel mango, incubated with α -amylase of *Bacillus*

The liquefaction conduct at middle temperature (55°C) result a higher yield of reducers sugars released (62% g g⁻¹), which might be related to the type of enzyme utilized.

Thus fermentables sugars percentage obtained by using *Bacillus* enzymatic activity is relatively very higher than enzyme absence (2% g g⁻¹). It can be explained that the enzyme has the capacity of decomposing into hexose all polysaccharides which are built up of glucose residues united by α -1,4 glycosidic bonds and also it is thermostable. Therefore this potentiality *Bacillus* could be used to fermentation process in medium containing polysaccharides substrates like mango peel.

Ethanol production from peel mango sugar performed by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF): Peel mango was used to produce ethanol through enzymatic hydrolysis and SSF with, respectively two yeasts strains (W6, B1). In SSF, the two different microorganisms behaved differently, according to their nutrient requirements, but synergistically in the degradation of organic substrate. An enzyme (carbohydrate hydrolases produced by *Bacillus* A1M1, Lab., of Poitiers) was able to hydrolyze peel mango. The saccharification products were simultaneously utilized by yeasts strains (W6, B1) for ethanol production. These yeasts are able to produced ethanol due to the presence of pyruvate decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH), which are key enzymes in ethanol formation, as reported by Gunasekaran and Chandra (2007). Figure 2 shows that the maximum volume of ethanol (13 g L⁻¹) produced from peel mango by W6 and B1 (10.1 g L⁻¹) in this study at the 120th h is lower than the results found by Agulejika *et al.* (2005), who also reported maximum ethanol yield at 120th h from fresh fruit (64.01 g L⁻¹) and waste fruits (21.14 g L⁻¹) using *Z. mobilis*. The higher ethanol yield from fresh fruit was due to higher presence of fructose and glucose in fresh fruits, as stated by Micheal and Rosaline (2000). The maximum volume of ethanol produced from peel mango is lower than the 59 g L⁻¹ reported by Gunasekaran and Chandra (2007) at 120th h from cassava starch hydrolysate.

This is due to cassava containing more carbohydrates, which could be fermented to ethanol. Present results are in agreement with those found previously by these authors quoted.

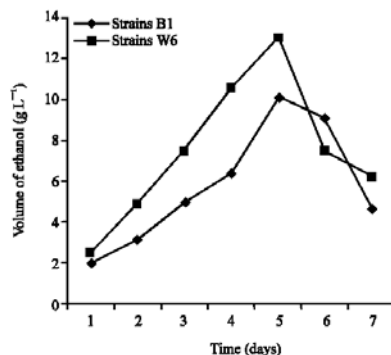


Fig. 2: Ethanol produced (g L^{-1}) from mango peel using yeasts strains B1 and W6 separately and each with amylase presence simultaneously

The results revealed that ethanol could be produced from agricultural residues, such as peel mango using thermotolerants and alcohol tolerant yeasts strains (W6, B1) as fermenting organisms. Considering the cost-effectiveness, in addition to being a means to control environmental pollution, the use of peel mango for ethanol production is concluded as a worthwhile venture.

ACKNOWLEDGMENT

Author is grateful to Dr. Aly Savadogo for his guidance. Also my thank to Pr. Alfred S. Traore Director of CRSBAN where I done research training.

REFERENCES

- Almeida, J., T. Modig, A. Petersson, H. Hn-Ha, B. Gerdal, G. Liden and M. Gorwa-Grauslund, 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Chem. Technol. Biotechnol., 82: 340-349.
- Banat, I., P. Nigam, D. Singh, R. Marchant and A. McHale, 1998. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I- Yeasts in general. World J. Microbiol. Biotechnol., 14: 809-812.
- Beerh, O.P., B. Raghuramaiah, G.V. Krishnamurthy and N. Giridhar, 1976. Utilization of mango waste: Recovery of juice from waste pulp and peel. J. Food Sci. Technol., 13: 138-141.
- Cakar, Z., U. Seker, C. Tamerler, M. Sonderegger and U. Sauer, 2005. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res., 5: 569-578.
- Chen, K. and Z. Chen, 2004. Heat shock proteins of thermophilic and thermotolerant fungi from Taiwan. Bot. Bull. Acad. Sinica, 45: 247-256.
- Gunasekaran, P. and K.R. Chandra, 2007. Ethanol Fermentation Technology: Z. Mobilis. Madurai Kamary University, India, pp: 1-22.
- Hiraishi, H., M. Mochizuki and H. Takagi, 2006. Enhancement of stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of ubiquitin ligase Rsp5 and ubiquitin-conjugating enzymes. Biosci. Biotechnol. Biochem., 70: 2762-2765.

- Humphrey, C.N. and U.C. Okafoagu, 2007. Optimization of ethanol production from *Garcinia kola* (bitter kola) pulp agrowaste. *Afr. J. Biotechnol.*, 6: 2033-2037.
- Jamai, L., K. Ettayebi, J.E.L. Yamani and M. Ettayebi, 2007. Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. *Bioresour. Technol.*, 98: 2765-2770.
- Klinke, H., A. Thomsen and B. Ahring, 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 66: 10-26.
- Liu, L.Z., M. Menggen and S. Mingzhou, 2009. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Mol. Genet. Genomics*, 282: 233-244.
- Micheal, C. and F. Rosaline, 2000. *Advanced Chemistry*. Oxford University Press, USA., pp: 446-480.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Ohta, K., S. Wijeyaratne and S. Hayashida, 1988. Temperature-sensitive mutants of a thermotolerant yeast, *Hansenula polymorpha*. *J. Fermentation Technol.*, 66: 455-459.
- Olson, L. and B. Hahn-Hagerdal, 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.*, 18: 312-331.
- Rajoka, M., A. Khalid and M. Ferhan, 2005. Kinetic and thermodynamics of ethanol production by a thermotolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Applied Microbiol.*, 40: 316-321.
- Szczodrak, J. and Z. Targonsky, 1988. Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 31: 300-303.
- Van Uden, N., 1984. *Advances in Microbial, Physiology*. In: *Temperature Profiles of Yeasts*, Rose, A.H. and D.W. Tempest (Eds.). Academic Press, London, pp: 195-248.
- Yacoob, K. and W. Filion, 1987. The effect of cold temperature stress on gene expression in maize. *Biochem. Cell. Biol.*, 65: 112-119.

Partie 4 : Optimisation du procédé de production de bioéthanol

Cette étude qui venait en complément à l'étude sur la recherche des souches thermo-tolérantes et alcool-tolérantes a été réalisée dans le but d'optimiser le rendement en bioéthanol en utilisant un processus simultané d'hydrolyse et de fermentation.

Le procédé d'hydrolyse de la matière première en vue d'accroître le taux de sucres réducteurs, a fournit les résultats consignés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Cinétique de l'hydrolyse des carbohydrates des résidus de mangues et de libération des sucres réducteurs

Temps d'hydrolyse (min)	% sucres réducteurs			
	<i>B. licheniformis</i>		<i>Bacillus AIM 1</i>	
	Amylase (-)	Amylase (+)	Amylase (-)	Amylase (+)
0	2	0	0	0
20	4	8	2	5
40	5	15	3	10
60	5	19	5	17
80	5	22	6	24
120	5	49	5	46
160	5	78	6	62
200	5	78	6	62
240	5	78	6	62

Le procédé enzymatique performant pour la biotransformation des carbohydrates non fermentescibles, a permis de libérer à partir des résidus le maximum de sucres fermentescibles en bioéthanol. Les souches de *Bacillus AIM1* et *Bacillus licheniformis* ont pu hydrolyser les carbohydrates non réductibles des résidus de mangues et libérer respectivement 62% et 78% (g/g) de sucres réducteurs. Par ailleurs en l'absence de l'enzyme, il n'ya pas de différence majeure de taux de sucres réducteurs. Ainsi les sucres libérés ont été simultanément fermentés en éthanol. Le tableau 9 résume les concentrations respectives en éthanol obtenues suite à la fermentation par les souches levuriennes sélectionnées.

Tableau 9 : Production d'éthanol par les souches levuriennes

Souches de levures	W1	B1	A1	S3
Concentration en Ethanol (g/l)	19-21,75	10,1	14,4	16

La production d'alcool par les souches retenues est de l'ordre de 10,1 à 19. Mais l'influence positive des éléments minéraux (notamment l'azote) additionnés de manière contrôlée dans le milieu de fermentation, a permis d'optimiser la concentration de l'éthanol à 21,75.

Les résultats issus du procédé d'optimisation de la production d'éthanol (Somda *et al.*, 2011b), montrent que les souches levuriennes A1 et A3 produisent des concentrations alcooliques respectives de 14,4 g/l et 16 g/l. Quant à la souche B1, elle produit un taux nettement inférieur aux autres souches avec une concentration de 10,1 g/l. Par ailleurs l'introduction contrôlée des sels minéraux a permis d'accroître la performance fermentative des souches. Ainsi l'apport de l'azote dans le milieu réactionnel révèle son influence positive selon Somda *et al.* (2011c). Cela s'est traduit par la hausse de la concentration d'alcool de 19 à 21,75 g/l au niveau de la souche W1 (retenue pour sa performance).

Improvement of Bioethanol Production using Amylasic Properties from *Bacillus licheniformis* and Yeasts Strains Fermentation for Biomass Valorization

M.K. Somda, A. Savadogo, C.A.T. Ouattara, A.S. Ouattara and A.S. Traore

Research Center in Biological, Food and Nutritional Sciences, University of Ouagadougou, 03 BP 7131 Ouagadougou 03, Burkina Faso

Corresponding Author: Marius Kounbèsiounè Somda, Research Center in Biological, Food and Nutritional Sciences, University of Ouagadougou, 03 BP 7131 Ouagadougou 03, Burkina Faso Tel/Fax: (00226) 50 33 73 73

ABSTRACT

Saccharomyces is a potentially useful organism for the commercial production of ethanol as it is not capable of fermenting starch containing in the mango peel. To enhance this carbon source utilization and increase the rate of alcohol production, simultaneous saccharification and fermentation were conducted using *Bacillus licheniformis* and yeasts. The proposal of this research was to study amylasic activity, rate and amount of starch utilization and ethanol yields increasing several-fold in coculture due to the synergistic metabolic interactions between the species. The methods used, included: enzymatic hydrolysis with *B. licheniformis* and simultaneous saccharification and fermentation with S3 and A1. These two yeasts strains were isolated from wine and among local beer yeasts respectively. The enzymatic hydrolysis has allowed to obtain 78% (g g^{-1}) of reducers sugars released. The maximum concentration of ethanol produced from peel mango by S3 and A1 during 5 days were, respectively 16 and 14.4 g L^{-1} .

Key words: Biomass, amylase, fermentation, ethanol, yeast

INTRODUCTION

Saccharomyces strains were used widely and traditionally for industrial ethanol production because of its ability to produce high concentrations of ethanol from hexoses and its high tolerance to ethanol and other inhibitory compounds. However, *S. cerevisiae* is naturally unable to metabolize pentoses, such as xylose, arabinose and also polysaccharides (starch). Fribous (lignocellulosic) is the second major source of carbohydrates in hard woods and vegetable biomass, so its fermentation is essential for the economic conversion of starch to ethanol, which may provide an ideal alternative fuel source in the future (Lin and Tanaka, 2006). The use of renewable resources, such as lignocellulosic biomass, to produce ethanol offers several environmental benefits and averts competition (Kumar *et al.*, 2009; Lin and Tanaka, 2006).

Many microorganisms, including *Saccharomyces cerevisiae*, are not able to degrade starch and they do not produce starch decomposing enzymes as amylase, pullulanase or isoamylase and glucoamylase (Gupta *et al.*, 2003). The ethanol-fermenting microorganisms, such as *S. cerevisiae* are lack of amylolytic enzymes and unable to directly convert the starch into ethanol (Ang *et al.*, 2001).

Considering that the main potential feedstock (biomass) for producing bioethanol is composed of carbohydrates, which include starch, cellulose and hemicelluloses, among others, the use of enzymes to break down these oligosaccharides into easily fermentable sugars is a requirement, previous to conducting the fermentation (Kim and Dale, 2004).

It is necessary either to use starch enzymes producing strains in order to get free carbohydrates monomers for using as carbon source (Altintas *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2002). Starch fermentations with *S. cerevisiae* transformed with amylase and glucoamylase genes showed ethanol productivity similar to that observed when starch decomposing enzymes were added to the medium (Ulgen *et al.*, 2002; Eksteen *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Shigechi *et al.*, 2004). Starch is converted into ethanol in starch plants where the raw material, is milled and then treated with a combination of heat and enzymes without prior separation of its constituents (Bothast and Schlicher, 2005). Industrial processes such as starch liquefaction demands the process to be carried out at high temperature so economical application of amylase to such process, its thermostability is of a prime importance (Joshi, 2011).

Several agricultural wastes have been tested for their bioethanol-producing potential. In the present study, the utilization of some agricultural residues (like mango residues) containing carbohydrates for the production of bioethanol was evaluated. Also, In Burkina Faso, enormous quantities of mango are lost per year and contribute to increase the environmental rate residues. In order to valorize these residues, it was important to research the possible ways. The aim of this study was to improve the bioethanol production by simultaneous fermentation of yeasts using amylasic properties from *Bacillus licheniformis* in the way to valorize mango biomass.

MATERIALS AND METHODS

Collection and processing of samples: Mango residues (70 samples as 25 kg) were collected from waste dumping sites in the principals mango production areas. Three regions (Banfora, Houet, Orodara) and peripheral area of Ouagadougou (Capital of Burkina Faso) were concerned to the sampling. The sampling was done during, April to May, 2010.

Isolation and selection of microorganisms: The selection was carried out on a total of 8 yeasts strains. The strains codified as A1 to A4 were *S. cerevisiae* strains isolated from wine cultures. Also the strains codified as S1 to S4 the Baker's yeast microorganism commonly used in local drinking beer (dolo).

The yeasts strains were isolated in maintenance medium (used in agar plates) contained 20 g of glucose, 20 g of agar, 5 g of peptone, 5 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ per liter. In the way to select the strains having best growth; the in the liquid inoculation contained (growth medium) 50 g glucose, 5 g of yeast extract, 1 g of KH_2PO_4 , 0.3 g of NH_4Cl and 2 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ per liter has been utilized. The fermentation medium contained 0.05 M citrate buffer pH 4.8; 1,5 g peptone, 5 g of yeast extract, 1 g of KH_2PO_4 , 0.3 g of NH_4Cl and 2 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ per liter. It was used to select the best strains producing alcohol.

Carbohydrate (sugar) fermentation: The ability of the yeasts to ferment various carbohydrates using glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose and arabinose was determined by growing the isolate in liquid standard medium containing 1% (w/v) of the particular carbohydrate. Durham-tubes were inverted into the culture tubes for gas collection. The incubation was at 30°C for 24 h and uninoculated broths were used as control. The standard medium used for fermentation was it recommended by Konlani *et al.* (1996).

Bacillus licheniformis isolation: *Bacillus licheniformis* has been isolated from and characterized in laboratory (CRSBAN).

Also it was performed to improve amylolytic property using different physiological conditions (Temperature, pH, percentage of starch). This process is driven to select the *Bacillus licheniformis* strains having a best enzymatic hydrolysis activity.

Bioethanol production: Methods used for production of bioethanol include enzymatic hydrolysis, fermentation and fractional distillation.

Enzymatic hydrolysis: An optimization of temperature and enzyme activity was performed. The performance during starch hydrolysis was evaluated based on the reducers sugars production and the liquefaction yield for the substrate (peel mango) (Miller, 1959).

One hundred grams of mango peel was weighed into seven 1 L conical flasks and 2 mL of solution containing amylase from *B. licheniformis* was added to each conical flask.

The flasks were covered with cotton wool, wrapped in aluminum foil, heated for 2 h in a water bath and then autoclaved for 30 min at 121°C. The Flasks were allowed to cool, filtered through Whatman filter paper and the pH was adjusted to 4.5 with acetate tampon medium.

The amylasic hydrolysis activity of *B. licheniformis* was setting in evidence by following of kinetic of reducers sugars released through carbohydrates hydrolysis during 5 h.

Fermentation: The fermentation was carried out along with saccharification (Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)), as described by Kroumov *et al.* (2006) and Oghren *et al.* (2006). The flasks containing the hydrolyzed samples were covered with cotton wool, wrapped in aluminium foil, autoclaved for 15 min at 121°C and allowed to cool at room temperature. Yeasts performing strains A1 and S3 were each aseptically inoculated into each flask and incubated at 30°C. Two flasks of each sample (containing mango peel) were removed after every 24 h, up to 7 days.

Fractional distillation: The fermented broth was dispensed into round-bottom flasks fixed to a distillation column enclosed in running tap water. A conical flask was fixed to the other end of the distillation column to collect the distillate. A heating mantle with the temperature adjusted to 78°C was used to heat the round-bottomed flask containing the fermented broth.

Determination of quantity of ethanol produced: The distillate collected over a slow heat at 78°C was measured using a measuring cylinder and expressed as the quantity of ethanol produced in g L⁻¹ by multiplying the volume of distillate collected at 78°C by the density of ethanol (0.8033 g mL⁻¹). The g L⁻¹ is equivalent to the yield of 100 g of dried substrate (Humphrey and Okafogun, 2007).

Determination of percentage ethanol: A standard ethanol density curve was prepared by taking series of percentage (v/v) ethanol solutions, which were prepared in volumetric flasks and the weight was measured. The density for each of the prepared ethanol solutions was calculated and a standard curve of density against percentage ethanol was plotted. The percentage ethanol concentration of ethanol produced was obtained by comparing its density with the standard ethanol density curve.

RESULTS

Selection of performed yeasts: Among 8 yeasts coming in different biotope, only two yeasts (S3, A1) were retained for ethanol fermentation process.

Peel saccharification optimization: The amylasic activity of *B. licheniformis* show the kinetic of reducing sugars released as shown in Fig. 1. The optimal rate of reducing sugars attains 78% (g g^{-1}).

Ethanol production from peel mango sugar performed by simultaneous saccharification and fermentation (SSF): The kinetic of ethanol production by two yeasts strains (S3; A1) is shown in Fig. 2.

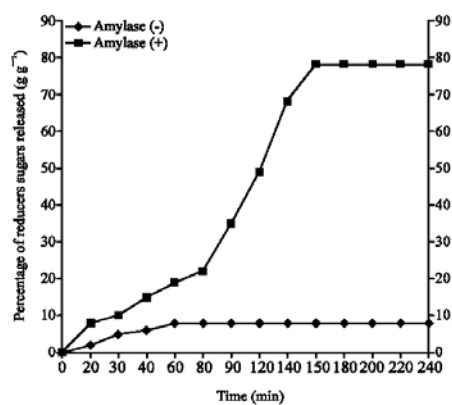


Fig. 1: Following of reducers sugars percentage releasing through carbohydrates hydrolysis on peel mango, incubated with α -amylase of *B. licheniformis*

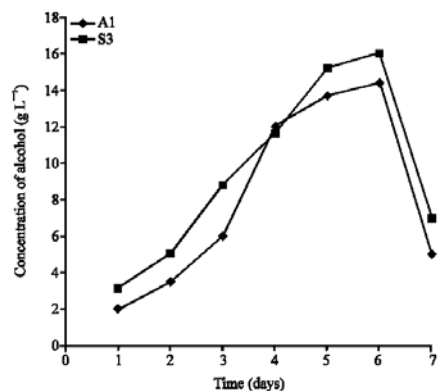


Fig. 2: Ethanol produced (g L^{-1}) from mango peel using yeasts strains S3 and A1 separately and each with amylase presence simultaneously

DISCUSSION

Selection of performed yeasts: The yeasts strains S3, A1 were selected according to their specific growth performance, that varies respectively at 0.31 to 0.24. And yet it can be noticed that specific growth parameters must not be directly link or attach to the ethanol high production.

Peel saccharification optimization: On mango peel containing 22.62 % (g g^{-1}) of carbohydrates (polysaccharides), the hydrolysis was conducted up to 4 hours and the results presented in Fig. 1, shows that releasing of reducing sugars increased with enzymatic activity of *B. licheniformis*. This result is demonstrated while varying the volume of the inoculum (contained the strains). Likewise it is noticed that there has not significant change or variation of reducers sugars rate without enzyme presence. Kim and Hamdy (1985) showed that the same trend was observed when the hydrolysis of potato was studied.

So liquefaction is a preliminary step for saccharification, by which large quantities of D-glucose can be produced from inexpensive sources.

The liquefaction conduct at middle temperature (55°C) result a higher yield of reducing sugars released ($78\% \text{ g g}^{-1}$), which might be related to the type of enzyme utilized. This result was greater than that obtained by Lazic *et al.* (2004) in the two-step enzyme hydrolysis (61 %).

Thus, fermentescibles sugars percentage obtained ($78\% \text{ g g}^{-1}$) by using *B. licheniformis* enzymatic activity is relatively very higher than at which found in *Bacillus* absence.

This value is slightly superior to which reported by Somda *et al.* (2010) using other species of *Bacillus* on peel mango ($62\% \text{ g g}^{-1}$). It can be explained that the enzyme has the capacity of decomposing into hexose, all polysaccharides which are built up of glucose residues united by α -1, 4 glycosidic bonds and also it is thermostable. And yet the incomplete utilization of polysaccharides (starch) by enzymes may due to lack of enough oxygen or feedback inhibition of amylase activity by glucose released, as reported by Abouzied and Reddy (1986). Others authors have explained mechanism of polysaccharides hydrolysis with some microorganisms.

Lagzouli *et al.* (2007) showed that the production of glucoamylase in presence of starch and of glucose suggests that the glucoamylase produced by *Candida guilliermondii* is an enzyme greatly led by the starch. And that its activity is probably under the effect of a glucose repression catabolic.

The same phenomenon of repression catabolic has been observed at *Clostridium thermohydrosulfuricum* (Hyun and Zeikus, 1985) and *Bacillus* sp. (Kiran *et al.*, 2005).

As *B. licheniformis* expressing both α -amylase and glucoamylase activities. Therefore this potentiality *Bacillus* could be used to fermentation process in medium containing polysaccharides substrates like mango peel.

Kinetic of amylasic hydrolysis of peel starch and simultaneous fermentation to ethanol:

The hydrolyzate obtained by amylase of *B. licheniformis* was used as substrates for bioethanol production respectively by yeasts strains A1 and S3. This effect is shown in Fig. 2. Peel mango was used to produce ethanol through enzymatic hydrolysis and SSF with respectively two yeasts strains (S3, A1).

In SSF, the two different microorganisms behaved differently, according to their nutrient requirements, but synergistically in the degradation of organic substrate. An enzyme (carbohydrate hydrolases produced by *Bacillus licheniformis*) was able to hydrolyze peel mango. The saccharification products were simultaneously utilized by yeasts strains (S3, A1) for ethanol production.

These yeasts are able to produce ethanol due to the presence of Pyruvate Decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH), which are key enzymes in ethanol formation, as reported by Gunasekaran and Chandra (2007). Figure 2 shows that the maximum volume of ethanol (16 g L^{-1}) produced from peel mango by S3 and B1 (14.4 g L^{-1}) in this study at the 120th h is lower than the results found by Agulejika *et al.* (2005) who also reported maximum ethanol yield at 120th hour from fresh fruit (64.01 g L^{-1}) and waste fruits (21.14 g L^{-1}) using *Z. mobilis*. The higher ethanol yield from fresh fruit was due to higher presence of fructose and glucose in fresh fruits, as stated by Micheal and Rosaline (2000). The maximum volume of ethanol produced from peel mango is lower than the 59 g L^{-1} reported by Gunasekaran and Chandra (2007) at 120th h from cassava starch hydrolysate. This is due to cassava containing more carbohydrates, which could be fermented to ethanol. Thus, Sree *et al.* (2000) reported about the ethanol production by SSF of wheat products using *Saccharomyces cerevisiae*. Those authors were able to produce up to $44.2 \text{ g-ethanol L}^{-1}$ when, fine wheat flour was used as substrate and 34.1 g L^{-1} using damaged wheat flour. Present results are in agreement with those found previously by these authors quoted.

Also, Tasic *et al.* (2008) have conducted fermentation on potato tuber mash and found during 18 to 33 h of incubation, an ethanol concentration growing at 31.2 to 32.9 g L^{-1} .

Ethanol produced from treated sample (bitter kola, pulp agrowaste) by Humphrey and Okafogau (2007) was 11.2 g L^{-1} at 96 h and 12.9 g L^{-1} at 216 h. These values were lower than our values.

The decline and stabilization in ethanol noticed at some stages may be due to the inhibitory effect of ethanol on growth and transport metabolism of the yeast (D'Amarc and Stewart, 1987; Xu *et al.*, 1996).

Present results revealed that ethanol could be produced from agricultural residues, such as peel mango using performed yeasts strains (S3, A1) as fermenting organisms.

Considering the cost-effectiveness, in addition to being a means to control environmental pollution, the use of peel mango for ethanol production is concluded as a worthwhile venture.

CONCLUSIONS

Present results demonstrate that the simultaneous saccharification and fermentation of mango peel carbohydrates with *B. licheniformis* and yeasts (S3 and A1) is sufficient to increase bioethanol production. This led us to suggest that it would be interesting to use this carbohydrates fermentation process in repeated fed-batch or continuous fermentation for further improvements of bioethanol production.

Finally, studies using *B. licheniformis* expressing α -amylase are promising and will lead to valuable applications in ethanol production from renewable feedstocks and the conversion of mango peel into ethanol.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by IFS (International Foundation of Science) and ISP/IPICS (International Sciences Programm/International Programm in the Chemicals Sciences).

REFERENCES

- Abouzieid, M.M. and C.A. Reddy, 1986. Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Environ. Microbiol., 52: 1055-1059.
- Agulejika, E.O., F.I. Olabode and K.A. Babatunde, 2005. Ethanol production from waste fruits. Int. J. Food. Agric. Res., 2: 190-194.

- Altintas, M.M., K.O. Ulgen, B. Kirdar and Z.I. Onsan and S.G. Oliver, 2003. Optimal substrate feeding policy for fed-batch cultures of *S. cerevisiae* expressing bifunctional fusion protein displaying amyolytic activities. *Enzyme Microbial. Technol.*, 33: 262-269.
- Ang, D.C., S.A. Aziz, H.M. Yusof, M.I.A. Karim, A. Ariff, K. Uchiyama and S. Shioya, 2001. Partial purification and characterization of amyolytic enzymes obtained from direct fermentation of sago starch to ethanol by recombinant yeast. *Pak. J. Biol. Sci.*, 3: 266-270.
- Bothast, R.J. and M.A. Schlicher, 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 67: 19-25.
- D'Amare, T. and G. Stewart, 1987. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microbial. Technol.*, 9: 322-330.
- Eksteen, J.M., P. Van Rensburg, R.R. Cordero Otero and I.S. Pretorius, 2003. Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis Wbuligera*. *Biotechnol. Bioeng.*, 84: 639-646.
- Gunasekaran, P. and K.R. Chandra, 2007. Ethanol Fermentation Technology: Z. Mobilis. Madurai Kamary University, India, pp: 1-22.
- Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami and B. Chauhan, 2003. Microbial amylases: A biotechnological perspective. *Process. Biochem.*, 38: 1599-1616.
- Humphrey, C.N. and U.C. Okafogwu, 2007. Optimization of ethanol production from *Garcinia kola* (bitter kola) pulp agrowaste. *Afr. J. Biotechnol.*, 6: 2033-2037.
- Hyun, H.H. and J.G. Zeikus, 1985. Simultaneous and enhanced production of thermostable amylases and ethanol from starch by cocultures of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Applied Environ. Microbiol.*, 49: 1174-1181.
- Joshi, B.H., 2011. A novel thermostable alkaline α -amylase from *Bacillus circulans* PN5: Biochemical characterization and production. *Asian J. Biotechnol.*, 3: 58-67.
- Kang, N.Y., J.N. Park, J.E. Chin, H.B. Lee, S.Y. Im and S. Bail, 2003. Construction of an amyolytic industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing the *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene. *Biotechnol. Lett.*, 25: 1847-1851.
- Kim, K. and M.K. Hamdy, 1985. Acid hydrolysis of sweet potato for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.*, 27: 316-320.
- Kim, S. and B.E. Dale, 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy*, 26: 361-375.
- Kiran, O. and U. Comlekcioglu and B. Arikan, 2005. Effects of carbon sources and various chemicals on the production of a novel amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. K-12. *Turk. J. Biol.*, 29: 99-103.
- Konlani, S., J.P. Delgenes, R. Moletta, A. Traore and A. Doh, 1996. Isolation and characterization of yeasts involved in sorghum beer production. *Food. Biotech.*, 10: 29-40.
- Kroumov, A.D. and A.N. Modenes and M.C. de Araujo Tait, 2006. Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain. *J. Biochem. Eng.*, 28: 243-255.
- Kumar, P., D.M. Barrett, M.J. Delwiche and P. Stroeve, 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48: 3713-3729.
- Lagzouli, M., R. Charouf, E.M. Yachioui, M. Ouhssine, E.H. Berny and M. Djadal, 2007. Optimization of the growth and the glucoamylase extracellular production by *Candida guilliermondii*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146: 251-270.

- Lazic, M.L., S. Raskovic, M.Z. Stankovic and V.B. Veljkovic, 2004. Enzymatic hydrolysis of potato starch and ethanol production. *Chem. Ind.*, 58: 322-326.
- Lin, Y. and S. Tanaka, 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 69: 627-642.
- Micheal, C. and F. Rosaline, 2000. *Advanced Chemistry*. Oxford University Press, USA., pp: 446-480.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Nakamura, Y., T. Sawada and A. Komatsu, 2002. Ethanol production from raw starch by recombinant yeast having saccharification and fermentation activities. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 77: 1101-1106.
- Oghgren, K., H.B. Hahn and G. Zacchi, 2006. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam pretreated corn stover at high fiber content with *S. cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 126: 488-496.
- Shigechi, H., J. Koh, Y. Fujita, T. Matsumoto and Y. Bito *et al.*, 2004. Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -amylase. *Applied Environ. Microbiol.*, 70: 5037-5040.
- Somda, M.K., A. Savadogo, C.A.T. Ouattara, A.S. Ouattara and A.S. Traore, 2010. Thermotolerant and alcohol-tolerant yeasts targeted to optimize hydrolyzation from mango peel for high bioethanol production. *Asian J. Biotechnol.*, 3: 77-83.
- Sree, N.K., M. Sridhar, K. Suresh, I.M. Banat and L.V. Rao, 2000. High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.*, 24: 222-226.
- Tasic, M.B., B.V. Konstantinovic, M.L. Lazic and V.B. Veljkovic, 2008. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. *Biochem. Eng.*, 43: 208-211.
- Ulgen, K.O., B. Saygili, Z.I. Onsan and B. Kirdar, 2002. Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain YPG-AB. *Process Biochem.*, 37: 1157-1168.
- Xu, P., A. Thomas and C.D. Gilson, 1996. Combined use of three methods for high concentration ethanol production by *Sacchromyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 18: 1439-1440.

Effect of Minerals Salts in Fermentation Process using Mango Residues as Carbon Source for Bioethanol Production

¹Marius Kounbèsiounè Somda, ¹Aly Savadogo, ¹Nicolas Barro, ²Philippe Thonart and ¹Alfred Sabadénédyo Traore

¹Research Center in Biological, Food and Nutritional Sciences University of Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

²Centre Wallon de Biologie Industrielle, Unité Bio-industries, Gembloux, Agro-Bio Tech, Université de Liège, Belgique 2, Passage des Déportés, B-5030, Gembloux, Belgium

Corresponding Author: Somda K. Marius, Research Center in Biological, Food and Nutritional Sciences, University of Ouagadougou, 03 BP: 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso Tel: (00226) 78805242

ABSTRACT

In this study, the use of mango (*Mangifera indica*) residues as substrate for bioethanol production was investigated. The batch cultures were realized to study the nutritional requirement of the yeasts strains and to optimize the fermentation conditions. Minerals salts play an important role in fermentation process and affecting microbiological stability. In the present study, the effects of diverse salts on the fermentation profiles were studied. Method was batch fermentation process in supplemented medium, using adapted yeast strain W1 (*Saccharomyces cerevisiae*). Different supplementations, such as yeast extract, MgSO₄, MnSO₄, FeSO₄ and KH₂PO₄ have been proposed. Effectively with mango hydrolysate supplemented a satisfactory bioethanol concentration like 21.75 g L⁻¹ was obtained.

Key words: Residues, mango, substrate, supplementation, fermentation, bioethanol

INTRODUCTION

Bioethanol produced from renewable biomass, such as sugar, starch or lignocellulosic materials, is one of the alternative energy resources, which is both renewable and environmentally linked (Mojovic *et al.*, 2010). The commercial viability of ethanol production from agricultural residues is dependent both on the availability in great quantities at low cost. The bioconversion of waste to useable energy is also a part of utilization of waste, as by burning solid fuel for heat, by fermenting plant matter to produce fuel, as ethanol, or by bacterial decomposition of organic waste to produce alcohol (Prasad *et al.*, 2009). Ethanol is a desirable fuel additive because it allows fuel to burn more cleanly and lowers green house gas emissions. It is cost-effective to blend ethanol into gasoline in view of high crude oil prices in recent years (Louime and Uckelmann, 2008). Also bioethanol can be synthesized from cellulose and hemicellulose that originates from the many sources of biomass (Cheng *et al.*, 2007a,b; Nigam, 2001). Lignocellulose is the structural component of plant biomass and can be derived from trees, grasses, cereal, paper waste etc. Both the cellulosic and hemicellulosic portions of the material (which in case of plants may comprise 60-80% of the non-sugar and starch components) can be converted to bioethanol (Beer *et al.*, 2006).

The biochemical production of alcohol from agricultural residues involves conditioning the residues by physical treatment, hydrolysis of cellulosic components to sugars and fermentation of

these to alcohol which must then be concentrated for use as fuels or chemical reagents. The real difficult is the control of fermentation process in the way to optimize alcohol rate. Most of the time the physico-chemicals parameters of medium fermentation affect the yield of bioethanol production (Somda *et al.*, 2011a). So many experiments have been realized with different feedstock, but the research of new source of biomass and fermentation control always remains to explore. So in Burkina mango residues coming from industrial area, market and site stockage can attain, 50,000 tons in year. These residues generate annually environmental pollution (Ajila *et al.*, 2007; Somda *et al.*, 2011a). Mango contains such carbohydrates such: starch, glucose, fructose, cellulose, pectins and tannins, whose glucose is the majority component (Ajila *et al.*, 2007). Of this fact the mango residues contained an important rate of carbohydrate, can constitute a biomass source and have needed to investigate for bioethanol production using yeasts (Somda *et al.*, 2011a, b).

So for bioethanol production the medium composition affects yeast performance. Yeast sugar metabolism is strongly influenced by the concentration of mineral components in growth media. Several metal ions are essential for optimal yeast growth and fermentation at millimolar concentrations (for example, Magnesium), (Birch *et al.*, 2003). The bioavailability of certain metal ions in grape must has been shown to be an important factor in governing fermentation performance by yeasts (Birch *et al.*, 2003). For example Magnesium is involved in numerous functions essential to yeast physiology, including: cell division and growth; mitochondrial structure and function; respiro-fermentative metabolism and responses to environmental stress (Birch and Walker, 2000). Premature cessation of yeast growth and alcoholic fermentation is a serious problem in bioethanol making because it produces a bioethanol with residual unfermented sugar and low alcohol content. These problems may be influence by the mineral compounds of growth media.

The present study has focused on the effect of minerals salts in fermentation capacity activation of yeast to optimize bioethanol production, using mango residues as carbohydrates sources.

MATERIAL AND METHODS

This present study entering in the project plan has been achieved to the laboratory of biotechnology in the CRSBAN (Research Center in Biological, Food and Nutritional Sciences [University of Ouagadougou, Burkina Faso]) into August to October 2010.

Screening and selection of yeast: The selection was carried out on a total of 10 yeasts strains. The strains codified as A1 to A4 were *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine cultures. Also the strains codified as S1 to S4 the Baker's yeast microorganism commonly used in local drinking beer (dolo). And those codified W1-W2 come of the local palm wine (Bangu).

The yeast strains were isolated in maintenance medium (used in agar plates) contained 20 g of glucose, 20 g of agar, 5 g of peptone, 5 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ per liter. In the way to select the strains having best growth; the in the liquid inoculation contained (growth medium) 50 g glucose, 5 g of yeast extract, 1 g of KH_2PO_4 , 0.3 g of NH_4Cl and 2 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ per liter has been utilized. These selected yeast, were adapted in medium containing mango residues hydrolyzed and minerals concentrations.

Adaptation of the yeast to the hydrolysate: Adaptation of the yeast was performed by sequentially transferring and growing cells in media containing 80% mango residues hydrolyzed; 10 glucose, 5; yeast extract, 1; $(NH_4)_2HPO_4$, 2; $(NH_4)_2SO_4$, 1.0; $MgSO_4 \cdot (g L^{-1})$, 0.5 and pH 5.0. The

sub-culturing was carried out 48 h to obtain 'adapted strains'. It was maintained on nutrient broth containing (g L^{-1}): yeast extract, 1.0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 2.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5. The hydrolysis of mango residues has been achieved by enzymatic way using *Bacillus licheniformis*.

Preparation of the mango residue hydrolysate for fermentation: Mango residues (70 samples as 25 kg) were collected from waste dumping sites in the principals mango production areas. Three regions (Banfora, Houet, Orodara) and peripheral area of Ouagadougou (Capital of Burkina Faso) were concerned to the sampling.

Mango residues was hydrolyzed at 55°C using *Bacillus licheniformis* for 5 h and the pH was adjusted to 4.5 with acetate tampon medium, with an initial solid to liquid ratio of 100 g L^{-1} , under shaking in Incubator shaker Innova™ 4000 stirred at 350 rpm. Before enzymatic hydrolysis process the flasks were covered with cotton wool, wrapped in aluminum foil, heated for 2 h in a water bath and then autoclaved for 30 min at 121°C .

The suspension was then centrifuged to remove the supernatant residue and to extract the sugars. The performance during enzymatic hydrolysis was evaluated based on the reducing sugars production and the liquefaction yield for the substrate (peel mango). Total reducing sugars was determined colorimetrically using a Dinitrosalicylic (DNS) acid reagent (Miller, 1959).

Fermentation process for bioethanol production

Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) in medium of fermentation: Six minerals salts have been choised for their effect positives on microbial growth and bioethanol production: MgSO_4 , MnSO_4 , FeSO_4 , KH_2PO_4 , Nitrogen source.

The fermentation was carried out along with saccharification (Simultaneous Saccharification and Fermentation [SSF]), as described by Kroumov *et al.* (2006) and Oghgren *et al.* (2006). It means that in the same medium a step of enzymatic hydrolysis is achieved using *Bacillus* and followed by strain W1 yeast fermentation step. The reason was to permit the yeast strain to use directly the reducing sugar released in the medium by enzyme action under non fermentables carbohydrates as starch, tannins.

Medium of fermentation added MgSO_4 : Different concentrations of MgSO_4 , respectively: 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 g L^{-1} contained in the mango residue hydrolysate have been tested.

Medium of fermentation supplement MnSO_4 : The MnSO_4 of has been studied at different concentration: 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.06, 0.08 and 0.1 g L^{-1} .

Medium of fermentation completed FeSO_4 : The bioethanol production has been followed at various concentrations: 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.06, 0.08 and 0.1 g L^{-1} .

Medium of fermentation containing KH_2PO_4 : The effect of on rate bioethanol production has been studied at 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 g L^{-1} of KH_2PO_4 concentration.

Medium of fermentation containing Nitrogen source: In order to improve the bioethanol production by yeast strains (w1, w2), the mango residue hydrolysate has been enriched with different concentrations of yeast extract, respectively: 0, 5, 10, 20 and 30 g L^{-1} .

The flasks containing the hydrolyzed samples were covered with cotton wool, wrapped in aluminium foil, autoclaved for 15 min at 121°C and allowed to cool at room temperature. The hydrolysate and the basal media were autoclaved separately and mixed aseptically before fermentation. Yeasts performing strains W1 and W2 were each aseptically inoculated into each flask and incubated at 37°C. Two flasks of each sample (containing mango peel) were removed after every 24 h, up to 7 days for each medium of fermentation.

Fractional distillation: The fermented broth was dispensed into round-bottom flasks fixed to a distillation column enclosed in running tap water. A conical flask was fixed to the other end of the distillation column to collect the distillate. A heating mantle with the temperature adjusted to 78°C was used to heat the round-bottomed flask containing the fermented broth.

Determination of quantity of ethanol produced: The distillate collected over a slow heat at 78°C was measured using a measuring cylinder and expressed as the quantity of ethanol produced in g L⁻¹ by multiplying the volume of distillate collected at 78°C by the density of ethanol (0.8033 g L⁻¹). G L⁻¹ is equivalent to the yield of 100 g of dried substrate (Humphrey and Okafoagu, 2007).

Determination of percentage ethanol: A standard ethanol density curve was prepared by taking series of percentage (v/v) ethanol solutions, which were prepared in volumetric flasks and the weight was measured. The density for each of the prepared ethanol solutions was calculated and a standard curve of density against percentage ethanol was plotted. The percentage ethanol concentration of ethanol produced was obtained by comparing its density with the standard ethanol density curve.

Statistical methods: All analyses were carried out in triplicate and data sets shown are the average of the sum of these sets, unless otherwise stated. Graphs were plotted with Microsoft excel.

RESULTS

Selection of performed and adapted yeasts: Among 10 yeasts coming in different biotopes, five yeasts (S3, A1, A3, W1 and W2) were performed for ethanol fermentation process. But only yeast strains W1 was able to keep its fermentation properties and stability in hydrolysate medium. Their maximum specific growth rate (μ_{max}) varies from 0.32 to 0.35 h⁻¹.

Saccharification of mango residues: The following of the amylasic activity of *B. licheniformis* show the kinetic of reducing sugars released at the end of 5 h. The optimal middle rate of reducing sugars attains 76% (g/g). These released sugars were available to yeasts strains for alcoholic fermentation.

Profile of bioethanol production from mango residue hydrolysate by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

Effect of MgSO₄, KH₂PO₄ on bioethanol kinetic production: The ethanol concentration gradually increased during the fermentation with MgSO₄, KH₂PO₄ concentrations

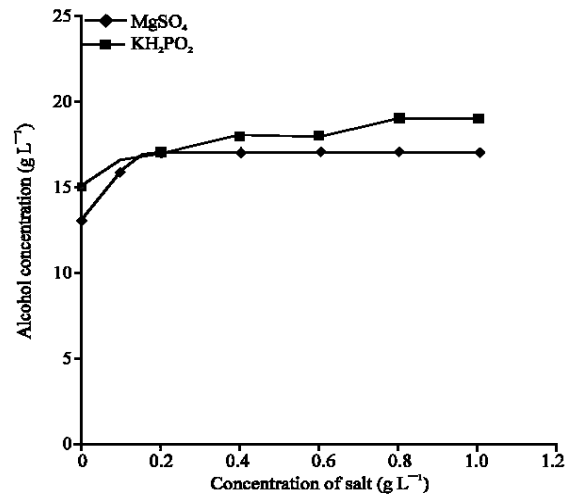


Fig. 1: Kinetic of bioethanol production in medium containing MgSO₄ or KH₂PO₄

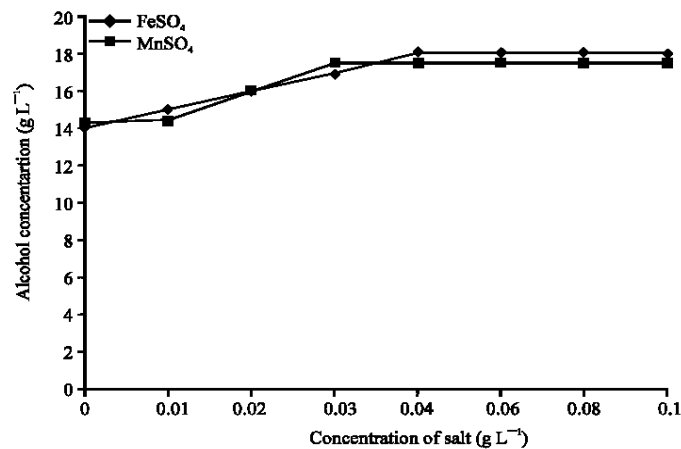


Fig. 2: Kinetic of bioethanol production in medium containing FeSO₄ or MnSO₄

gradient, respectively. The maximal values of ethanol concentration after 7 days were attained respectively 17 g L⁻¹ for MgSO₄ and 19 g L⁻¹ for KH₂PO₄. The profile of ethanol released in the medium was mentioned in Fig. 1.

Effect of MnSO₄, FeSO₄ on bioethanol kinetic production: The profile of bioethanol production on medium containing separately MnSO₄ and FeSO₄ has shown in the Fig. 2. In presence of MnSO₄, alcohol rate increased and ranged at 14.2 to 17.5 g L⁻¹. Also FeSO₄ bioethanol rate was attained 18 g L⁻¹ after 7 days.

Effect of nitrogen source on bioethanol kinetic production: It was tested the influence of nitrogen source on cell growth and the bioethanol yield. The concentration of bioethanol increased concomitantly with nitrogen source in fermentation medium and to be stabilised at 21.75 g L⁻¹ during 7 days. The kinetic of bioethanol production has shown in Fig. 3.

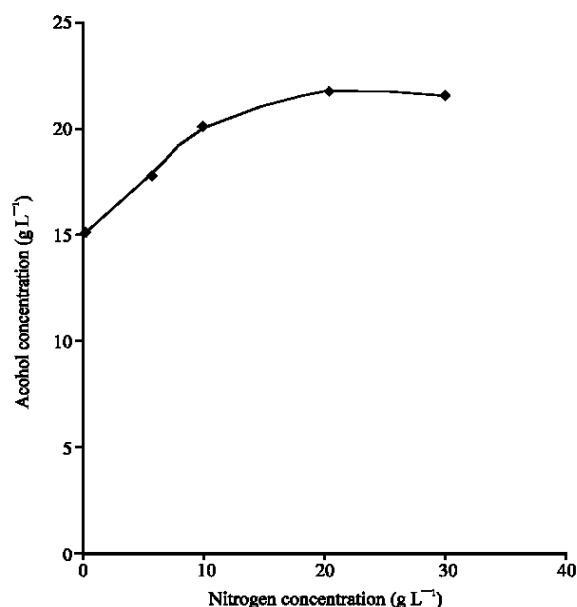


Fig. 3: Kinetic of bioethanol production in medium containing Nitrogen

DISCUSSION

Selection of performed and adapted yeasts: The yeast strain W1 was retained among other according to its specific capacity to grow on mango residue hydrolysate. So it has been selected for its possibility to adapt in hydrolysate medium which will be used for fermentation process. The maximum specific growth rate (μ_{max}) of yeast strain W1 attained 0.35 h^{-1} is acceptable for its use in alcoholic fermentation. Compared to some data as those of Ezeronye (2004) on the starter yeasts, our strain W1 has a good growth capacity and is located in the interval determined by this author (0.18 to 0.22).

Saccharification of mango residues: Saccharification using *B. licheniformis* permit to obtain 76% of reducing sugars. It is approximative with values found by Somda *et al.* (2011b). Prasad *et al.* (2009) explained that the enzyme has the capacity of decomposing into hexose, all polysaccharides which are built up of glucose residues united by α -1, 4 glycosidic bonds and also it is thermostable. And yet the incomplete utilization of polysaccharides (starch) by enzymes may be due to lack of enough oxygen or feedback inhibition of amylase activity by glucose released. Lagzouli *et al.* (2007) showed that the production of glucoamylase in presence of starch and of glucose suggests that the glucoamylase produced by *Candida guilliermondii* is an enzyme greatly repressed by the starch. And that its activity is probably under the effect of a glucose repression catabolic.

Also the same phenomenon of catabolic repression has been observed at *Clostridium thermohydrosulfuricum* and *Bacillus* sp. (Kiran *et al.*, 2005). So the reducing sugars released in the medium could be used by yeast W1 for fermentation alcohol.

Effect of salts MnSO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 , KH_2PO_4 on bioethanol kinetic production: The effect of salts was studied separately of interest from the medium formulation. Mineral salts at all concentrations tested were shown to give a significant effect on bioethanol production of yeast

strain W1. Figure 1 and 2 have showed the effect of different salts on the fermentations of yeasts using mango residues sugars.

Bioethanol achieved after 7 days of cultivation for salts cultures was range of 13 to 19 g L⁻¹. This value is superior to which reported by Somda *et al.* (2011b) using uncontrolled concentration salts in medium of fermentation. They found 16 g L⁻¹ of bioethanol produced with mango residue hydrolysate. The reason of this value superior can be explain to the medium composition in minerals. It activates the membrane permeability and increase the intra-cellular glucose uptake. So our results are below compared to those found by Birch *et al.* (2003). They found 50 g L⁻¹ of ethanol with a ratio 0.5 L⁻¹ of magnesium and calcium in fermentation medium. And yet they explained that elevation of magnesium levels resulted in decreased yeast doubling times, together with increased ethanol yields and faster rates of sugar consumption. However, very high magnesium/calcium ratios had a deleterious effect on fermentation performance, indicating inhibitory effects on yeast sugar consumption and ethanol production.

The osmotic properties of yeast cell are due to selective permeability of the cell wall with regard to solutions. This selectivity plays an important role in controlling the movement of nutrients into a cell. The permeability of the cell wall also permits the release of alcohol and carbon dioxide from the cell during fermentation.

Therefore, it was concluded that Mn²⁺, K⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ were the ions that Yeast needed to alcohol fermentation process. Fitzpatrick *et al.* (2001) have showed the beneficial effect of Mn²⁺ for metabolites production by *Lactobacillus casei*, due to its role as a constituent of lactate dehydrogenase. Jin-Bong *et al.* (1990), Gawande *et al.* (1998) and Owades (1991) have also found Mg²⁺ to be essential for enzyme production and consequently alcohol released. Mori *et al.* (1985) showed that Magnesium acts as activator of some enzymes (phosphatidyl transferase and decarboxylase). Ion K⁺ is indispensable for the growth and Fe²⁺ stimulates the breathing and the cellular multiplication (Shockey and Barta, 1991).

These different authors confirm the importance of the minerals salts on the microbial metabolism. It comes to reinforce our results finding.

Effect of Nitrogen source on bioethanol kinetic production: The kinetic of bioethanol production with nitrogen positive influence within 7 days is reported in Fig. 3. So the optimal for nitrogen concentration, created bioethanol increasing range from 17 to 21.75 g L⁻¹, also it was indicated that increasing concentration of this component is less critical for enzyme (alcohol dehydrogenase) production.

Then the maximal bioethanol rate found in this work (21.75 g L⁻¹) with using nitrogen source in medium is very higher than result found by (Somda *et al.*, 2011b) in their previous research (16 g L⁻¹), also those found by Humphrey and Okafoagu (2007) like 11.2 g L⁻¹ at 96 h and 12.9 g L⁻¹ at 216 h. Otherwise our alcohol maximal value is lower than these reported by Tasic *et al.* (2008). They have conducted fermentation on potato tuber mash and found during 18h to 33 h of incubation, an ethanol concentration growing at 31.2 to 32.9 g L⁻¹.

During fermentation, nitrogen is taken up from the medium by the cell and directly incorporated into proteins or transformed into other cellular nitrogenous constituents (Ferchichi *et al.*, 2005). By contrast, the cell spends more energy and time in synthesizing amino acids for protein synthesis from inorganic nitrogen sources (Ferchichi *et al.*, 2005; Kalil *et al.*, 2008).

Among organic nitrogen sources, differences in protein and amino acid composition could have accounted for the differences in the production rates and yields observed. Kalil *et al.* (2008) have

showed that microflora requires a proper nitrogen supplement for metabolism during fermentation and suggested 70% the C/N ration. They found that yeast extract nitrogen source at concentration of 13 g L⁻¹ was the best organic source and resulted in 85% metabolites yield of 308 mL g⁻¹ glucose utilized.

While referring to our results obtained in fermentation process, it can be noticed that high concentrations of sugars, salts and other solubles inhibit yeast fermentation as a result of effects produced by high osmotic pressures.

Basically, all fermentable sugars begin to exert an inhibiting effect on yeast when their concentration exceeds about 100 g L⁻¹, with the degree of inhibition becoming progressively greater as the concentration of the sugar rises (Konlani *et al.*, 1996; Somda *et al.*, 2011a).

This inhibitory effect is more pronounced with such sugars as sucrose, glucose and fructose than with maltose. The sensitivity of yeast to osmotic pressure varies with different yeast strains, with some being better suited than others for fermenting sweet doughs with their high sugar contents. Some mineral salts in excess and are capable to inhibit yeast growth (Rose, 1987).

D'Amarc and Stewart (1987) and Xu *et al.* (1996) have showed that the decline and stabilization in ethanol noticed at some stages may be due to the inhibitory effect of ethanol on growth and transport metabolism of the yeast. Finally it can be retained that the presence of minerals salts at the adapted concentration increased rates of ethanol production, reduced fermentation times and faster yeast growth rate.

CONCLUSIONS

The results obtained from the tests of fermentation on minerals medium has showed that the yeast strain W1 can produce until 13 g L⁻¹ of bioethanol on mango residue hydrolysate broth containing 76% of reducing sugars. And yet the maximal production like 21.75 g L⁻¹ of bioethanol has been reached after optimization of the chemical condition.

ACKNOWLEDGMENT

The author would like to thank IFS (International Foundation of Science) for financial assistance under grant No E/4890-1.

REFERENCES

- Ajila, C.M., S.G. Bhat and U.J.S.P. Rao, 2007. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chem.*, 102: 1006-1011.
- Beer, T., T. Grant, G. Morgan, J. Lapszewicz and P. Anyon *et al.*, 2006. Comparison of transport fuels. Final Report (EV45A/2/F3C) to the Australian Greenhouse Office on the Stage 2 study of Life-cycle Emissions Analysis of Alternative Fuels for Heavy Vehicles. <http://www.environment.gov.au/settlements/transport/comparison/index.html>.
- Birch, R.M. and G.M. Walker, 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 26: 678-687.
- Birch, R.M., M. Ciani and G.M. Walker, 2003. Magnesium, calcium and fermentative metabolism in wine yeasts. *J. Wine Res.*, 14: 3-15.
- Cheng, C.K., H.H. Hajar and K.I.K. Syahidah, 2007a. Production of bioethanol from oil palm empty fruit bunch. *IcoSM*, pp: 69-72.

- Cheng, C.K., H.H. Hani and K.S.K. Ismail, 2007b. Production of Bioethanol from oil palm empty fruit bunch. Proceedings of the 1st International Conference on Sustainable Materials, June 9-12, Universiti Malaysia Perlis (UniMAP), pp: 69-72.
- D'Amarc, T. and G. Stewart, 1987. Ethanol tolerance of yeast. Enzyme Microbial. Technol., 9: 322-330.
- Ezeronye, O.U., 2004. Nutrient utilization profile of *Saccharomyces cerevisiae* from palm wine in tropical fruit fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek, 86: 235-239.
- Ferchichi, M., E. Crabbe, W. Hintz, G.H. Gil and A. Almadidy, 2005. Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021. World J. Microbiol. Biotechnol., 21: 855-862.
- Fitzpatrick, J.J., M. Ahrens and S. Smith, 2001. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. Proc. Biochem., 36: 671-675.
- Gawande, B.N., R.K. Singh, A.K. Chauhan, A. Goel and A.Y. Patkar, 1998. Optimization of cyclomaltoextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus*. Enzyme Microbial. Technol., 22: 288-291.
- Humphrey, C.N. and U.C. Okafoagu, 2007. Optimization of ethanol production from garcinia kola (bitter kola) pulp Agrowaste. Afr. J. Biotechnol., 6: 2033-2037.
- Jin-Bong, H., S.H. Kim, T.K. Lee and H.C. Yang, 1990. Production of maltodextrin from *Bacillus stearothermophilus*. Korean J. Applied Biotechnol., 19: 578-584.
- Kalil, M.S., H.S. Alshiyab and W.M. Wan Yusoff, 2008. Effect of nitrogen source and carbon to nitrogen ratio on hydrogen production using *C. acetobutylicum*. Am. J. Biochem. Biotechnol., 4: 393-401.
- Kiran, O., U. Comlekcioglu and B. Arikan, 2005. Effects of carbon sources and various chemicals on the production of a novel amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. K-12. Turk. J. Biol., 29: 99-103.
- Konlani, S., J.P. Delgenes, R. Moletta, A. Traore and A. Doh, 1996. Optimization of cell yield of *Candida krusei* SO1 and *Saccharomyces* sp. LK3G cultured in sorghum hydrolysate. Biores. Technol., 57: 275-281.
- Kroumov, A.D., A.N. Modenes and M.C. de Araujo Tait, 2006. Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain. J. Biochem. Eng., 28: 243-255.
- Lagzouli, M., R. Charouf, E.M. Yachioui, M. Ouhssine, E.H. Berny and M. Djadal, 2007. Optimization of the growth and the glucoamylase extracellular production by *Candida guilliermondii*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146: 251-270.
- Louime, C. and H. Uckelmann, 2008. Cellulosic ethanol: Securing the planet future energy needs. Int. J. Mol. Sci., 9: 838-841.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31: 426-428.
- Mojovic, L., M. Rakin, M. Vukasinovic, S. Nikolic, J. Pejin and D. Pejin, 2010. Production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal by immobilized yeast. Chem. Eng. Trans., 21: 1333-1338.
- Mori, H., S. Shimizu and T. Yamane, 1985. Automatic supplementation of minerals in Fed-batch culture to high cells mass concentration. Biotechnol. Bioenerg., 27: 192-201.
- Nigam, J.N., 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. J. Biotechnol., 87: 17-27.

- Oghgren, K., H.B. Hahn and G. Zacchi, 2006. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam pretreated corn stover at high fiber content with *S. cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 126: 488-496.
- Owades, J.L., 1991. Method of making salt-free sauerkraut. United States Patent US5064662. <http://www.freepatentsonline.com/5064662.html>
- Prasad, M.P., S. Rekha, M. Tamilarasan and K.S. Subha, 2009. Production of bioethanol using various agricultural raw materials by two step enzymatic process. *J. Adv. Biotechnol.*, 9: 41-43.
- Rose, A.H., 1987. Responses to the Chemical Environment. In: *The Yeasts*, Rose, A.H. and J.S. Harrison (Eds.). Academic Press, London, pp: 5-40.
- Shockey, W.L. and A.L. Barta, 1991. Effect of salt on fermentation of alfalfa. 1. Treatment with potassium chloride. *J. Dairy Sci.*, 74: 155-159.
- Somda, M.K., A. Savadogo, C.A.T. Ouattara, A.S. Ouattara and A.S. Traore, 2011a. Thermotolerant and alcohol-tolerant yeasts targeted to optimize hydrolyzation from mango peel for high bioethanol production. *Asian J. Biotechnol.*, 3: 77-83.
- Somda, M.K., A. Savadogo, C.A.T. Ouattara, A.S. Ouattara and A.S. Traore, 2011b. Improvement of bioethanol production using amylasic properties from *Bacillus licheniformis* and yeasts strains fermentation for biomass valorization. *Asian J. Biotechnol.*, 3: 254-261.
- Tasic, M.B., B.V. Konstantinovic, M.L. Lazic and V.B. Veljkovic, 2008. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. *Biochem. Eng.*, 43: 208-211.
- Xu, P., A. Thomas and C.D. Gilson, 1996. Combined use of three methods for high concentration ethanol production by *Sacchromyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 18: 1439-1440.

Partie 5 : Discussion générale

1. Composition chimique et macromoléculaire des mangues et résidus

La composition des mangues et résidus est très favorable à leur valorisation. Les résidus (pulpe et noyau) renferment 4,56% à 22,62% de glucides totaux (Tableau 4), comprenant: amidon, glucose, fructose, cellulose, pectines. A ce titre ils constituent une excellente source de bioénergie ou biocaburant. L'équipe de Gopalan et ses collaborateurs en 1999 ont trouvé un taux inférieur au nôtre dont 15,9% de carbohydrates dans les résidus de mangues. Par ailleurs Ajila et ses collaborateurs en 2007 par l'hydrolyse acide réalisée sur les noyaux de mangue ont obtenu une valeur supérieure (28,2%). Ainsi la teneur en carbohydrates des résidus mangues, montre qu'ils peuvent constituer une source importante de biomasse au même titre que les principales sources déjà existantes que sont les résidus de céréales (maïs, sorgho, blé, mil, riz), de tiges des plantes (canne à sucre), de tubercules (bêta-racine, patate, igname) et surtout de fruits (mélasse, papaye, orange...) mais aussi d'herbes renpentes (Ibeto *et* Okpara, 2010).

Nos résidus de mangues renferment des composés difficilement métabolisables, mais l'hydrolyse enzymatique a permis d'obtenir 17,46% carbohydrates bioconvertibles (Somda *et al.*, 2011b), soit un rendement de bioconversion de l'ordre de 0,78. Ce résultat est inférieur à celui de Rowan et ses collaborateurs au Maryland, qui en 2009 ont pu valoriser par procédé enzymatique le Kudzu (*Pueraria montana var lobata*), une plante parasite des cultures de champ en optimisant le taux de carbohydrates utilisables à 37 %. La paille du blé contenant de l'hémicellulose a été analysée en Inde par Nigam (2000). Le processus d'hydrolyse leur a permis d'obtenir un taux de 25 % de sucres simples bioconvertibles (glucose, arabinose), supérieur au nôtre. Le taux de sucres fermentescibles obtenu dans les déchets de mangues (17,46 %) représente une valeur moyenne comparée aux autres types de déchets agro-industriels. En effet il varie en fonction de la nature des résidus et du procédé de transformation utilisés. Ainsi Les travaux de Chantata et collaborateurs en 2008, ont montré que l'enveloppe de la pomme après extraction du jus constituait un déchet agro-industriel valorisable, car elle représente 15-30 % de carbohydrates fermentescibles. Pour la rationalisation des déchets agricoles, l'équipe de Yamaji et ses collaborateurs (2006) ont établi un processus d'hydrolyse enzymatique permettant d'obtenir 30 % de carbohydrates réductibles à partir de résidus (son) des céréales. Au Nigéria Akin-Osanaiye et collaborateurs en 2008, ont montré que les résidus de fruit de papaye contiennent 20,82 % de carbohydrates réductibles. Ces résidus peuvent être valorisés.

En Algérie Boujelal et Nacib (2001) ont trouvé que les déchets de dattes renferment 55 % de sucres totaux. Au Burkina Faso, Traoré et Konlani (1989) ont pu montrer que les résidus de mélasse renfermeraient plus de 25 % de sucres réducteurs.

L'amélioration par moyen enzymatique du pourcentage de glucides fermentescibles dans les résidus de mangues ainsi que les travaux de ces différents auteurs sur les résidus agro-industriels, confirment que les résidus de mangues pourraient être exploités par la voie biotechnologique.

2. Isolement et identification phénotypique des souches levuriennes et bactériennes

Les caractéristiques morphologiques et culturelles des souches retenues se rapprochent de celles citées dans la littérature sur les levures par Accolas (1984), Guiraud et collaborateurs (1984) et Obisanya (1987). Ces souches sont immobiles. La présence des ascospores dans les souches permet de les affilier à la classe des ascomycètes ou ascosporogènes. Ces souches assimilent les nitrates et ne présentent pas de filamentation, contrairement à *Candida albicans* (Bouchet *et al.*, 1990). Les caractères physiologiques (assimilation et fermentation des sucres) sont régis par la loi de Kluyver selon Bouchet et collaborateurs (1990) stipulant que toute souche qui fait fermenter un sucre l'assimile nécessairement. Les souches étudiées sont oxydase et catalase positives, mais également aéro-anaérobies facultatives.

Il en résulte de l'étude des différents critères (morphologiques, biochimiques et physiologiques) que les souches identifiées appartiennent au groupe des levures et à la classe des ascomycètes. Elles possèdent un métabolisme fermentaire et respiratoire et une tolérance au milieu acide qui permet de les classer dans le genre *Saccharomyces*.

Les souches isolées et purifiées sont constituées de cellules ovoïdes. L'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques a permis de donner une approche d'identification des souches selon la clé dichotomique de Lodder (1971). Du fait des antibiotiques (gentamycine ou chloramphénicol) utilisés qui inhibent spécifiquement les procaryotes et non les eucaryotes, on peut affirmer que ces souches sont des eucaryotes. Aussi le test au cycloheximide confirme que les souches isolées sont du genre *Saccharomyces*. Les différents résultats permettent de tirer les conclusions suivantes :

Les souches appartiennent au groupe des levures, à la classe des ascomycètes, à l'ordre des endomycétales, à la famille des *Saccharomycetaceae*, à la sous famille des *Saccharomycetoideae*, au genre *Saccharomyces*.

Les caractéristiques globales morphologiques, biochimiques et physiologiques montrent que les souches bactériennes retenues pourraient être affiliées à la famille des *Bacillaceae*. Elles pourraient appartenir probablement au genre *Bacillus* car elles possèdent des caractères retrouvés chez *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* et *Bacillus licheniformis* (Buchaman et Gibbons, 1975). Les souches ayant des caractéristiques similaires à celles du genre *Bacillus* ont été également isolées par certains auteurs au cours de la fermentation des graines de *Parkia biglobosa* (Jideani et Okere, 1991) et de *Bi-kalga* (Bengaly, 2001). L'habitat primaire des *Bacillus* est le sol, mais on les retrouve dans les aliments où ils jouent divers rôles (Guiraud, 1998).

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* constituent un ensemble de souches génétiquement et phénotypiquement très hétérogène (Combet-Blanc, 1995). Les bactéries du genre *Bacillus* produisent des α -amylases à action endomoléculaire leur permettant de dégrader les polymères glucidiques en glucose et en des molécules voisines. La β -amylase à action exomoléculaire est excrétée par *Bacillus subtilis* (Bengaly, 2001). Egalement les enzymes hydrolysant les polymères des glucides comme les amylases, sont produites par ces bactéries (O'Toole, 1999).

3. Etude de l'effet de paramètres environnementaux sur les potentialités des souches sélectionnées

Les résultats obtenus, montrent l'importance des paramètres environnementaux sur la croissance des souches et leurs capacités de fermentation. La concentration en éthanol et la température ont un effet significatif.

Parmi les vingt souches levuriennes sélectionnées, seules les souches (W2) et (B1, W5, W6) respectivement croissent à 42 °C et 45 °C tout en tolérant un degré alcoolique de 14% dans le milieu de croissance. Le pH affecte le profil cinétique des souches. Ainsi les souches sélectionnées ont réalisé un métabolisme optimal autour d'un pH de 4,5. Pour des températures allant de 40 °C à 45 °C, les souches W6 et B1 ont présenté des rendements maximaux en bioéthanol respectifs de l'ordre de 35% et 30%. Les quantités de métabolites et de biomasse produites diminuent avec l'augmentation de la concentration en alcool.

Ces résultats mettent également en évidence une variabilité importante entre les souches d'un point de vue cinétique, même si les tendances sont les mêmes pour toutes. Toutes les souches n'ont pas la même sensibilité à l'éthanol. L'augmentation de la température, du pH et de la concentration en alcool a un effet négatif sur la croissance et l'activité fermentaire des souches testées. Obire et collaborateurs (2005) au Nigeria, ont montré que la bactérie *Zymomonas mobilis*, isolée du vin de palme était moins sensible à l'alcool que *Saccharomyces* et que celle-ci pouvait tolérer 15% d'alcool dans un milieu de pH4. Des souches de *Saccharomyces* survivant à 55°C, ont été obtenues par Rikhvanov et collaborateurs (2001), grâce à l'adaptation des cellules à des températures graduelles. Edgardo et collaborateurs (2008) ont également pu sélectionner des souches de *Saccharomyces* capables de croître et de fermenter le glucose (20%) à 45°C, en procédant à l'adaptation des ces souches.

L'effet de l'éthanol et du pH sur la synthèse de biomasse peut être expliqué par la consommation de substrat pour l'énergie de maintenance. Lorsqu'il y a une concentration critique d'éthanol, le stress de la cellule augmente globalement les pertes d'énergie observables par une diminution de quantité de biomasse formée. Ainsi, l'influence négative de l'éthanol sur le développement des micro-organismes peut s'expliquer par une augmentation de l'énergie de maintenance de ces derniers (Torija *et al.*, 2002). Cette énergie de maintenance est dépensée pour assurer les fonctions de motilité, les régulations ATPasiques pour le maintien du potentiel transmembranaire, les flux de relargage d'excès de substrat (Torija *et al.*, 2002). Cette dépense d'énergie pourrait conduire à ralentir ou arrêter la croissance cellulaire.

Par ailleurs, l'action inhibitrice de l'éthanol pouvait être liée à la perméabilité de la membrane des cellules modifiant la solubilité en lipides de la membrane (Leao et Van Uden, 1982).

L'éthanol peut également empêcher l'action de l'hexokinase et de quelques enzymes impliquées dans la synthèse des acides aminés. Des insuffisances métaboliques sur la reproduction peuvent alors être constatées (Nagodawithana *et al.*, 1977). Des études réalisées sur la tolérance de souches de bactéries lactiques ont permis d'établir une relation entre la tolérance à l'alcool et la constitution lipidique membranaire (Kalmar et Lonvaud, 2001). Cette étude a montré que la teneur en phosphore, en acides gras saturés des extraits lipidiques de la membrane diminue quand la concentration en éthanol augmente dans le milieu de culture. En même temps, celle des acides gras insaturés, certains glycolipides et la longueur moyenne des acides gras totaux augmentent.

Des études rapportées par Nedwell (1999) sur l'effet de la température ont montré qu'une augmentation de ce paramètre favorise la croissance des microorganismes par l'augmentation de la fluidité de membrane et donc l'augmentation du système de transport des protéines.

Des comparaisons entre les résultats obtenus dans notre étude et ceux de travaux menés par différents auteurs ont permis de confirmer l'importance des paramètres environnementaux sur le développement des souches de levures.

4. Optimisation de la production de bioéthanol

La maîtrise des paramètres environnementaux a été un facteur essentiel permettant l'optimisation du rendement en bioéthanol. Le procédé couplant successivement une saccharification par hydrolyse enzymatique suivi d'une fermentation a abouti à une nette amélioration du taux de bioconversion des résidus de mangues en alcool. Les souches de *Bacillus* Sp1 (A1M1) et *Bacillus licheniformis* ont pu hydrolyser les carbohydrates non réductibles des résidus de mangues et libérer respectivement 62% et 76% à 78% (g/g) de sucres réducteurs. Les résidus de mangues renferment en plus des sucres réducteurs, des hydrates de carbone non fermentescibles (amidon, tannins). Les souches de bacillus produisent des α -amylases et glucoamylases capables de rompre ces ponts osidiques et de libérer ainsi des sucres simples. Les bactéries du genre *Bacillus* ont été exploitées dans ce procédé d'optimisation car elles peuvent synthétiser une diversité de vitamines dont la thiamine, la riboflavine et la biotine. Ces vitamines joueraient un rôle dans l'amélioration de la tolérance alcoolique de *Saccharomyces* (O'Toole, 1999).

Lagzouli et collaborateurs (2007) ont montré que *Candida guilliermondii* produit des glucoamylases capables d'hydrolyser l'amidon. L'activité enzymatique subit parfois une répression catabolique du glucose libéré réduisant ainsi le rendement de l'hydrolyse.

Des fermentations simultanées à la suite des hydrolyses enzymatiques (réalisées par des souches de *Bacillus*) des résidus de mangues ont montré que les souches de *Saccharomyces* S3 et B1 ont produit des concentrations alcooliques respectives de 16 et 14,4 g/L. Par ailleurs les résultats obtenus sur l'utilisation séquentielle des éléments minéraux dans le milieu de fermentation, ont élucidé l'influence de ces derniers sur la capacité fermentaire des souches levuriennes.

La souche W1 conservant sa stabilité dans l'hydrolysate de mangues, a produit 14,2 à 17,5 g/L de bioéthanol sous l'effet de $MnSO_4$ et 18 g/L en présence de $FeSO_4$. Quant à l'azote, il a exercé une influence plus positive sur l'activation de la souche W1 permettant d'obtenir une concentration éthanolique de 21,75 g/L.

Le procédé SSF (saccharification simultanée et fermentation) effectuant l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique en une seule étape a montré une réduction de l'inhibition de l'enzyme par le glucose qui est consommé par les micro-organismes fermentaires au fur et à mesure de son apparition. Il en résulte souvent une augmentation des taux et vitesses d'hydrolyse et de production globale en éthanol. Par ailleurs, les risques de contamination microbienne de l'hydrolysate riche en glucose sont amoindris. Les principaux inconvénients de la SSF sont la différence des températures optimales de l'hydrolyse enzymatique (50°C) et de la fermentation éthanolique (30°C à 35°C) et l'impossibilité de recycler les levures. Le rendement est fonction de la tolérance des souches à l'alcool libéré dans le milieu. Pour une meilleure tolérance à l'alcool, la disponibilité des acides gras et leur incorporation dans des fractions de glycolipides spécifiques au niveau membranaire seraient d'une grande importance (Kalmar et Lonvaud, 2001). La concentration en acide cis-vaccénique et en hopanoïdes rares dans la membrane sont responsables de la haute tolérance à l'éthanol. Les Hopanoïdes sont des acides gras pentacycliques présents dans les membranes plasmiques des bactéries pour réguler leur fluidité. Chez les eucaryotes c'est le cholestérol qui joue un rôle similaire (Buchholz *et al.*, 1987).

Des études menées par certains auteurs tels Nigam et collaborateurs (2000) sont parvenues à atteindre un rendement 0,41 (g/g) d'éthanol (80,4% de rendement théorique) supérieur au nôtre en utilisant des enzymes provenant de *Pichia stipitis* sur de l'hémicellulose de la paille de blé. Oyeleke et Jibrin (2009) au Nigeria ont pu valoriser les déchets agricoles, en procédant simultanément à une saccharification de la paille de maïs et de mil par *Aspergillus niger* suivi d'une fermentation de *Zymomonas mobilis*. Des concentrations éthanoliques respectives de 26,83 g/L et 18,31 g/L ont été obtenues sur la paille de maïs et de mil. Cette production d'alcool à partir de la paille de maïs est supérieure à celle issue de mangues que nous avons enregistrée (21,75 g/L), et peut s'expliquer selon Gunasekran et Chandra (2007) par la présence de pyruvate décarboxylase et d'alcool déshydrogénase chez *Zymomonas mobilis*, facilitant une fermentation avec un fort taux d'éthanol.

Lekneth et collaborateurs (1994) ayant travaillé sur les sucres du sorgho, obtinrent une concentration de 27,7 g/L, concentration supérieure à la nôtre. L'équipe de Suresh et collaborateurs (1999) en utilisant une hydrolyse par des α -amylases de *Bacillus subtilis* suivie d'une fermentation de *S. cerevisiae*, ont pu obtenir des concentrations de 34 g/L sur la paille de blé et 27 g/L sur les résidus de tiges de sorgho.

La concentration de l'éthanol produit à partir des résidus de mangues obtenue dans notre étude (21,75 g/L) est nettement supérieure à celle de Palmarola-Adrados et collaborateurs (2005). Ces auteurs ont pu produire un taux d'éthanol de 13 g/L sur la paille de blé.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion

La recherche de valorisation des résidus de mangues par la biotransformation a été réalisée par des techniques biochimiques et microbiologiques. Au terme de cette étude, les résultats obtenus confirment que les résidus de mangues constituent une source importante de biomasse exploitable pour la production de bioéthanol.

Les objectifs qui ont suscité cette étude peuvent être considérés comme atteints, car nous disposons en amont : de la maîtrise des paramètres environnementaux sur le potentiel des souches ; et en aval des procédés d'optimisation de fermentations aboutissant à des concentrations alcooliques satisfaisantes (21,75 g/l).

Les souches de *Bacillus* sp1 (A1M1) et *Bacillus licheniformis* retenues ont présenté une stabilité vis-à-vis de leur capacité à hydrolyser par voie enzymatique les polymères de glucose et les polysaccharides. Egalement les souches de *Saccharomyces* sélectionnées ont témoigné leur capacité à conserver leur potentiel fermentaire et à s'adapter aux différentes conditions de culture (Température de 45 °C et 14 degré alcoolique).

Le SSF a permis la réduction de l'effet inhibiteur des co-produits de l'hydrolyse ou de la fermentation. Les micro-organismes, notamment *S. cerevisiae*, peuvent dégrader certains inhibiteurs. Par exemple, le furfural peut être oxydé en acide furoïque.

L'utilisation des résidus de mangues pour la production de bioéthanol présenterait de multiples avantages :

- du point de vu environnemental à travers la valorisation des co-produits et déchets,
- du point de vu socio-économique, il n'existe pas de compétition avec l'usage alimentaire ou agroalimentaire, mais un moindre coût de la matière première.

Enfin les déchets de mangues ; loin d'être uniquement des polluants pour l'environnement, peuvent être valorisés par la production d'alcool (bioéthanol) et par conséquent contribuer à l'assainissement de l'environnement. C'est assurément la solution la plus pérenne à une extension de l'utilisation du bioéthanol.

Différents schémas et livres de procédé existent, basés sur des expérimentations menées à des échelles représentatives. Cependant, certaines étapes sont complexes et leur amélioration nécessite de progresser sur des aspects cognitifs, notamment sur l'enzymologie de la cellulolyse et sur la physiologie des levures.

Perspectives

L'implantation d'une unité pilote de production industrielle est un enjeu majeur dont l'avenir repose en grande partie sur les retombées de l'essor des biotechnologies.

Les résultats obtenus au cours de nos travaux sont encourageants et méritent d'être approfondis par :

- La maîtrise du comportement physiologique de la levure en condition de forte teneur en éthanol par la quantification de l'efficacité métabolique fermentaire;
- L'investigation et l'identification des phénomènes entraînant les inhibitions, toxicités et létalité des souches;
- L'identification des cibles moléculaires impliquées dans l'adaptation de la levure à de fortes teneurs en éthanol (>15%) ;
- La réalisation d'une identification complète des souches de levures performantes obtenues reposant sur des caractérisations génétiques et biomoléculaires;
- L'adaptation des souches à supporter des degrés alcooliques élevés par des transferts de gènes de résistance à l'alcool.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

- AOAC** (1990). Association of Official Analytical Chemists 930 (04). Official method of analysis, 15th ed. Arlington, VA. pp. 40-69.
- Accolas, P.** (1984). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. pp.132-144.
- Agores** (2001). Biofuels Market Barriers.
<http://www.europa.eu.int/en/comm/dg17/atlas/html/biodbarr/html>.
- Aguilar-Uscanga, M. G., Della, M., Strehaiano, P.** (2000). Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: Growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Can. J. Microbiol.* 46 : 1046-1050.
- Aguilera, F., Benitez, T.** (1985). Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 142 : 389-392.
- Ajila, C. M., Bhat, S. G., Prasada-Rao, U. J. S.** (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chem.* 102 : 1006-1011.
- Akin-Osanaiye, B. C., Nzelibe, H. C., Agbaji, A. S.** (2008). Ethanol production from *Carica papaya* (pawpaw) fruit waste. *Asi. J. Biochem.* 3 :188-193.
- Akubor, P. I.** (1996). The suitability of african bush mango juice for wine production. *Plant food Hum. Nutri.* 49 : 213-219.
- Alazard-Toux, N., Ballerini, D., Dohy, M., Montagne, X., Sigaud, J. B.** (2006). La place des biocarburants dans le contexte énergétique mondial, IFP Publications - Editions Technip - Paris, *Les Biocarburants : Etat des lieux, perspectives et enjeux du développement*. ISBN: 2-7108-0869-2. pp. 1-77.
- Aldigui, A. S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribelarrea, J. L., Guillouet, S. E., Molina-Jouve, C.** (2004). Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioproc. Byosyst. engineer.* 26 : 217-222.
- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J., Guillouxbenatier, M.** (2004). *Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Internat. J. F. Microbiol.* 93 : 141-154.

- Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S. E., Uribelarrea, J. L., Goma, G., Bendadis, L.** (2002). Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Ap. Microbiol. Biotechnol.* 60 : 67-72.
- Askar, A., El-Tamani, A., Raouf, M.** (1972). Constituents of mango fruit and their behaviour during growth and ripening. Germany. *Mitteilungen* : Rebe ,Wein , obstban and fruchterver werting. 22 (2) : 120-125.
- Bai, F.W., Aderson, W. A., Moo-Young, M.** (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* 26 : 89-105.
- Ballerini, D.** (2006). Les biocarburants. Paris : *Editions Technip*.135p.
- Bardford, J. P.** (1990). A general model for aerobic yeast growth. Batch growth. *Biotechnol. Bioenerg.* 35 : 907-920.
- Beech, F. W., Thomas, S.** (1985). Action antimicrobienne de l'anydride sulfureux. Bulletin de l'O.I.V. 564-581,652-653.
- Beer, T., T. Grant, G. Morgan, J. Lapszewicz and Anyon, P.** (2006). Comparison of transport fuels. Final Report (EV45A/2/F3C) to the Australian Greenhouse Office on the Stage 2 study of Life-cycle Emissions Analysis of Alternative Fuels for Heavy Vehicles. <http://www.environment.gov.au/settlements/transport/comparison/index.html>.
- Ben-Chaabane, M. F.** (2006). Intensification de la production d'ethanol biocarburant dans un bioréacteur bi-étage avec recyclage cellulaire : modélisation et stratégie de conduite. Thèse INSA Toulouse. 291p.
- Bengaly, M. D.** (2001). Etude microbiologique et valeur nutritionnelle d'un condiment traditionnel riche en protéines, obtenu par fermentation naturelle des graines d'*Hibiscus sabdarifa*. Thèse. Université de Ouagadougou (Burkina Faso). 116p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** (1984). 1: 9th edition.510p.
- Blackwell, K. J., Singleton, I., Tobin, J. M.** (1995). Metal cation uptake by yeast. *A review. Ap. Microbiol. Biotechnol.* 43 (4) : 579-584.

- Boudjelal, A., N. Nancib** (2001). Production d'Acide Lactique par *Lactobacillus Rhamnosus* sur Milieu à Base de Jus de Dattes. Production et Valorisation. *Biomasse. Rev. Energ. Ren.* 41-46.
- Bouix, M., Leveau, J. Y.** (1993). Les levures. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Tec. doc. *Lavoisier*. pp.1-10.
- Brock, T. D.** (1970). Biology of microorganisms. By Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, *New Jersey*.
- Buchaman, R. E., Gibbons, N. E.** (1975). Bergey's manual Determinative Bacteriology. 8th ed. *The William and Wilkins company*, Baltimore. pp. 529-576.
- Buchholz, S. E., Dooley, M. M., Eveleigh, D. E.** (1987). *Trends biotechnol.* 5 : 199-204.
- Bruinenberg, P. M., Jonker, R., Dijken, P. J., Sheffers, W. A.** (1985). Utilisation of formate as an additional energy source by glucose-limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS 621 and *Saccharomyces cerevisiae* CDS 8066. Evidence for the absence of transhydrogenase activity in yeasts. *Arch. Microbiol.* 142 : 302-306.
- Cardona, C. A., Sanchez, O. J.** (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour. Technol.* 98 : 2415-2457.
- Casey, G. P., Ingledew, W. M.** (1986). Ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Microbiol.* 13 : 219-280.
- Castro-Martinez, C.** (2007). *Brettanomyces bruxellensis* : Etude Métabolique, Cinétique et Modélisation. Influence des facteurs environnementaux. Institut National Polytechnique de Toulouse. Thèse. 207p.
- Chatanta, D. K., Attri, C., Gopal, K., Devi, M., Gupta, G., Bhalla, T. C.** (2008). Bioethanol production from apple pomace left after juice extraction. *Inter. J. Microbiol.* 5 : 60-80.
- Charpentier, C.** (1993). Les arrêts de fermentation: rôle de l'éthanol, résistance de la levure. *R.F. d'OEnologie.* 140 : 49-52.
- Combet-Blanc, Y.** (1995). Caractérisation physiologique d'une nouvelle bactérie lactique de Provence, Aix-Marseille. Thèse de doctorat. 150p.

- Colin, M. N., Dalnic, R.** (1981). Comparaison de mangues en provenance de Cote d'Ivoire, in : J. agrumes/mangues. Irfa. Inra. Montpellier. France. 50p.
- Concawe, E.** (2007). Joint Research Centre (JRC) Ispra. Well-to-Wheels Analysis of Future Automotive Fuels and Powertrains in the European Context. Well-to-Wheels Report. Version 2c. <http://ies.jrc.cec.eu.int/WTW>.
- Converti, A., Bargagliotti, C., Cavanna, C., Nicoletta, C., Del Borghi, M.** (1996). Evaluation of kinetic parameters and thermodynamic quantities of starch hydrolyse fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioproc. Engineer.* 15 : 63-69.
- Dabire, A. R.** (2001). Rapport d'activité campagne agricole 2000-2001, INERA, Programme CMFPT, Burkina Faso. 70p.
- DE LAROUSSILHE, F.** (1980). Le Manguier. Techniques agricoles et productions tropicales. Ed *Maisonneuve et Larose*. Paris. 312 p.
- Du-Toit, W. J., Pretorius, I. S. G., Loavaud-Funel, A.** (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurians* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Ap. Microbiol.* 98 : 862-871.
- Dodd, J. C., Prusky, D., Jeffris, P.** (1998). Fruits diseases. In: Litz RE, editor. The Mango-Botany, Production and Uses. Wallingford Oxon / CAB International. pp. 257-280.
- Dorange, J. L., Dupuy, P.** (1972). Mise en évidence d'une action mutagène du sulfite de sodium sur la levure. *C. R. Académie de Science*. Paris, série D. 274 : 2798-2800.
- Edgardo, A., Carolina, P., Manuel, R., Juanita, F., Jaime, B.** (2008). Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzy. Microb. Technol.* 43 : 120-123.
- Farrell, A. E., Plevin, R. J., Turner, B. T., Jones, A. D., O'Hare, M., Kammen, D. M.** (2006). Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science* 311: 506-508.
- Fargione, J., Hill, J., Tilman, D., Polasky, S., Hawthorne, P.** (2008). Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science* 319 : 1235-1238.
- F.A.O.** (1999). Cahier de production et protection intégrée appliquée à la culture du manguier en Afrique soudano-sahélienne. Projet G.C.P./RAF/244/BEL. 70p.

- FAO** (2008). La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture. Rome. 85p.
- Fiechter, A., Furhmann, G. F., Kapelli, O.** (1981). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microbiol. Physiol.* 22 : 123-183.
- Fleet, G. H., Heard, G. M.** (1993). Yeast: growth during fermentation. Harwood Academic Publishers, ChurSwitzerland. In: Fleet GM. Ed. *Wine Microbiology and Biotechnology*. pp. 27-54.
- Fogue, K.** (1998). Technologie de séchage des fruits et légumes. Service d'appui aux PME (SAPE); CEAS Ouagadougou. Burkina Faso. pp. 51.
- Fox, J.D., Robyt, J.F.** (1991). Miniaturization of three carbohydrates analysis using a microsample plate reader. *Anal. Bioch.* 195 : 93-96.
- Gancedo, C., Serrano, R.** (1989). Energy-yielding metabolism. The yeasts metabolism and physiology. 2nd ed. *Rose A. H. and Harrison J. S.* Academic Press Limited. London. 3 : 205-251.
- Gaunt, D. M., Degn, H., Lloyd, D.** (1988). The influence of oxygen and organic hydrogen acceptors on glycolytic carbon dioxide production in *Brettanomyces anomalus*. *Yeast.* 4 : 249-255.
- Geros, H., Cassio, F., Leao, C.** (1997). Glucose transport mechanism in the yeast *Dekkera anomala*. 18th ISSY. *Yeast Nutri. Natur. Habit.* 24-29. Bled, Slovenia.
- Geros, H., Azevedo, M. M., Cassio, F.** (2000). Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. *Food Technol. Biotechnol.* 38 : 59-62.
- Gopalan, C., Ramasastri, B. V., Balasubramanian, S. C.** (1999). Nutritive value of Indian foods. India: National Institute of Nutrition, ICMR. *Internat. Food Microbiol.* 80: 47-53.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C., Pang, C. H. N.** (1973). The genus *Bacillus*. *Handbook* No. 427. U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C.
- Gosse, G.** (2008) Impacts environnementaux des biocarburants. Ecole d'été de Sauvons le climat, Cabourg. www.sauvonsleclimat.org/new/spip/IMG/pdf/gosse.
- Guillou, V.** (1996). Etude du comportement dynamique de *Saccharomyces cerevisiae* en culture continue dans la région oxydative des taux de croissance. Thèse INSA Toulouse. 160p.
- Guiraud, J. P., Crelzy, P., Gli, T.** (1984). Analyse microbiologique dans l'industrie agro-alimentaire. Collection *Génie alimentaire*. pp. 53-61.

- Guiraud, J. P.** (1998). Microbiologie alimentaire. *Dunod*, Paris. pp.79-168.
- Guira, M.** (2003). Rapport d'activité campagne agricole 2002-2003, INERA, Programme CMFPT, Burkina Faso. 55p.
- Gunasekaran, P., Chandra K. R.** (2007). Ethanol fermentation Technology: *Z. mobilis*. Madurai Kamary University, Madurai, *Indi*. 1-22.
- Gunisson, A. F.** (1981). Sulphite toxicity: a critical review of in vitro and in vivo data. *F. Cosmetol. Toxicol.* 19: 667-682.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B.** (2003). Microbial amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38 : 1599-1611.
- Hayashida, S., Ohta, K.** (1981). Formation of high concentration of alcohol by various yeasts. *J. Inst. Brew.* 87 : 42-44.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D.** (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; 103 : 11206-112110.
- Hossain, M., Haque, M., Rahim, M. A., Rahman, M. A.** (2001). Physio-morphological and compositional variation in ripe fruit of three mango varieties. *J. Biol. Sci.* 1 (11) : 1101-1102.
- Humphrey, C.N., Okafogau U. C.** (2007). Optimization of ethanol production from garcinia kola (bitter kola) pulp Agro Waste. *Afr. J. Biotechnol.* 6 (17) : 2033-2037.
- Ibeto, C.N., Okpara, C. G.** (2010). Nigeria's potentials of renewable energy sources for water desalination with emphasis on biomass. *J. Sci. Technol. Res.* 9 : 66-73.
- Ingram, L. O., Buttke, T. M.** (1984). Effects of alcohols on microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 25 : 253-300.
- Jarvis, C. E., Walker, J. R. L.** (1993). Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin. *J. Sci. Food Agric.* 63 : 53-57.
- Jay, J.** (1996). Modern Food Microbiology, 5th ed. London: Chapman and Hall. 661p.

- Jideani, I. A. O., Okere, C. R.** (1991). Comparative study of microorganisms and sensory attributes of condiments from the fermentation of different seeds. *Plt. Food Human. Nutrit.*, 41 : 27-34.
- Johnson, G. I., Mead, A. J., Cooke, A. W., Dean, J. R.** (1991). Mango stem end pathogens infection levels between flowering and harvest. *Ann. Appl. Biol.* 119 : 465-473.
- Jones, R. P., Pamment, N., Greenfield, P. F.** (1981). Alcohol fermentation by yeasts. the effect on environmental and other variables. *Process Biochem.* 16 : 42-49.
- JUDICOME** (2004). Etude pour l'élaboration d'un plan de développement de la filière fruit et légumes. Rapport intermédiaire pour l'atelier national. Ministère de l'Agriculture de l'Hydraulique et des Ressources Halieutiques (MAHRH) Ouagadougou. 125p.
- Kalmar, Z., Lonvaud, A.** (2001). Recherche sur la tolérance à l'éthanol des bactéries lactiques d'altération des vins. Relation avec la constitution lipidique membranaire. Thèse. Université de Bordeaux 2, Bordeaux, France. 115p.
- Kapelli, O.** (1986). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeast. *Adv. Microbiol. Physiol.* 28 : 181-209.
- Kim, S., Dale, B. E.** (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biom. Bioener.* 26 : 361-375.
- Konlani, S., Degenes, J. P., Moletta R., Traoré A. S., Doh A. J.** (1996). Isolation and characterization of yeasts involved in sorghum beer production. *Food. Biotech.* 10 (1): 29-40.
- Konlani, S., Degenes, J. P., Moletta R., Traoré A. S., Doh A. J.** (1998). Optimization of cell yield of *Candida krusei* S01 and *Saccharomyces sp.* LK3G cultured in sorghum hydrolysate. *Bioress.Technol.* 57 : 275-281.
- Kreger Van Rij, N. J. S.** (1984). The yeast: a taxonomic study, 3rd ed. *Elsevier*, Amsterdam.
- Kruckeberg, A. L.** (1997). The hexose transporter of the family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 163: 283-292.
- Kumar J.** (1983). Studies on symptomatology, etiology and control of mango malformation. Ph.D. thesis, G.B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar. 118p.

- Lagzouli, M., Charouf, R., Yachioui, E. M., Ouhssine, M., Berny, E. H., Djadal, M.** (2007). Optimization of the growth and the glucoamylase extracellular production by *Candida guilliermondii*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 146 : 251-270.
- Larpent, G., Larpent, M.** (1990). Mémento, Technique de microbiologie. 2^e ed. Technique et documentation. *Lavoisier*. 417 p.
- Larpent, G. M., Sanglier, J. J.** (1991). Biotechnologies, Principes et méthodes, Doin. Ed. *Collection Biosciences et Techniques*, Paris. 668p.
- Latifa, J., Khalil, E., Jamal, E.Y., Mohamed, E.** (2007). Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylases. *Science Direct. Bior. Tech.* 98 : 2765-2770.
- Leao, C. and Van Uden, N.** (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioengineer.* 24 : 2601-2604.
- Leclerc, H., Izard, D., Husson, M., Wattre, P., Jakubczake, P.** (1995). Microbiologie générale. Ed. *Doin*. Paris. 363p.
- Lee, C. G., Kim, C. H. Rhee, S. K.** (1992). A kinetic model and simulation of starch saccharification and simultaneous ethanol fermentation by amyloglucosidase and *Zymomonas mobilis*. *Bioprocess Eng.* 7 : 335-344.
- Lekneth, V., Christopoulos, P., Marris, B.** (1994). Bioethanol technology review. *J. Biotechnol.* 16: 983-988.
- Lei, F., Rotboll, M., Jorgensen, S.B.** (2001). A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 88 : 205-221.
- Licht, F.O.** (2005). World ethanol and biofuels report. pp. 3-15.
- Liu, S., Lin, C., Xie, L., Cao, Z.** (2003). Intracellular pH and Metabolic Activity of long-chain dicarboxylic acid-producing yeast *Candida tropicalis*. *J. Biosci. Bioengineer.* 96 (4): 349-353.
- Lodder, J.** (1971). The yeast taxonomic study. 2nd ed. *Amsterdam*, London, Holland. 275p.

- Macris, B. J., Markakis, P.** (1974). Transport and toxicity of sulfur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*. *J. Sci. F. Agricult.* 25 : 21-29.
- Mager, W. H. and Varela, J. C. S.** (1993). Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Molecul. Microbiol.* 10 : 253-258.
- Maiorella, B., Blanch, H., Wilke, C. R.** (1983). By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioengineer.* 25 : 103-121.
- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S.** (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 428-434.
- Mann, P., Siewert S., Totter, J.** (2002). Fermenting potato peels and chips into ethanol. Biocycle. Millet husk. *Afric. J. Microbiol. Resear.* 3 (4) : 147-152.
- Manry, L.** (2005). Analyse automatique d'images de populations microbiennes. Thèse, N° 808, Toulouse. 152p.
- Montesinos, T., Navarro, J-M.** (2000). Role of maltose in the simultaneous-saccharification-fermentation process from raw wheat starch and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Eng.* 23 : 319-322.
- Martinez, E. A., Silva, S. S., Almeida, E., Silva, J. B., Solenzal, A. I. N., Felipe, M. G. A.** (2003). The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guillermondi*. *Process Biochem.* 38 : 1677-1683.
- Milar, D. G., Griffiths-Smith, K., Algar, E., Scopes, R. K.** (1982). Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol. Lett.* 4 : 601-606.
- Miller, G. L.** (1958). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Bioch.* 195 : 93-96.
- Moulin, G., Boze, H., Galzy, P.** (1984). Inhibition of alcoholic fermentation. *Biotechnol. Gen. Eng.* 2 : 365-382.
- Mustafa, B., Havva, B., Cahide, O.** (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress Energy Combustion Sci.* 34 : 551-573.

- Nagodawithana, T. W., Steinkraus, H. K.** (1976). Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *S. cerevisiae* in rapid fermentation. *Ap. Environment. Microbiol.* 31 : 158-162.
- Nagodawithana, T. W., Whitt, J. T., Cutaia, A. J.** (1977). Study of the feedback effect of ethanol on selected enzymes of the glycolytic pathway. *J. Americ. Soci. Brew. Chem.* 35 : 179- 173.
- Naim, K., Andrzej W., Gregory, P. C., Robert, J. M., Jiri E. P.** (1983). Biomass, Microorganisms for Special Applications, Microbial Products , Energy from Fenewable Resources. *Biotechnol.* Chap 3a. 3 : 257-386.
- Nakamura, Y., Sawada, T., Komatsu, A.** (2002). Ethanol production from raw starch by recombinant yeast having saccharification and fermentation activities. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77 : 1101-1106.
- Nana, C. P., Brouwer, I. D., Zagré, N. M., Kok, F. J., Traoré, A. S.** (2006). Impact of promotion of mango and liver as sources of vitamin A for young children : a pilot study in Burkina Faso. *Pub. Health Nutri.* 9 (6) : 808-813.
- Neves, M. A., Kimura, T., Shimizu, N., Shiiba, K.** (2005). Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. *J. Zaffius Biotechnol.* 1 (2) : 1-10.
- Nedwell, D. B.** (1999). Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30 (2) : 101-111.
- Nigam, J. N.** (2001). Ethanol production from wheat straw hemicelluloses hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Biotechnol.* 87: 17-27.
- Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., Havelarr, A.** (1989). Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 351-361.
- Novak, M., Strehaiano, P., Moreno, M., Goma, G.** (1981). Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioengineer.* 23 : 201-211.

- Obire, O.** (2005). Activity of *Zymomonas mobilis* species in palm sap obtained from three areas in Edo State. Department of Applied and environmental biology. Rivers State University of Science and technology, Nkpoh-oroworukwo.P.M.B. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* 9 (1) : 25-30
- Obisanya, M. O., Aina, J. O., Oguntimen, G. B.** (1987). Production of wine from mango (*Mangifera indica* L.) using *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces* species isolated from palm Wine . *J. App. Bact.* 63 : 191-196.
- Olsen, H. S. and Andersen, E.** (2001). Utilization of enzymes in agricultural product processing. Novozymes A/S. Catalogue A-6901.35p.
- Oestling, A.** (2001). Carburant additionné de bioéthanol Stoa. Evaluation des choix scientifiques et technologiques. Note d'information n° 07/2001. <http://www.europa.eu.int/stoa/publi/pdf>.
- O'Toole, D. K.** (1999). Characteristics and use of Okara, the soybean residue from milk production: A review. *J. Agric. Food Chem.* 47 : 363-371.
- Ouédraogo, S. N.** (2002). Etude diagnostique des problèmes phytosanitaires du manguier (*Mangifera indica* L.), de l'oranger (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) et du mandarinier (*Citrus reticulata* Blanco) dans la province du Kéné Dougou. Mémoire d'ingénieur du développement rural option agronomie. Université polytechnique de Bobo-Dioulasso/Institut du développement rural. 94 p.
- Ough, C. S., Crowell, E. A.** (1987). Use of sulfur dioxide in winemaking. *J. F. Sci.* 52 (2) : 386-393.
- Oyeleke, S. B., Jibrin, N. M.** (2009). Production of bioethanol from guinea cornhusk and millet husk. *Afric. J. Microbiol. Researc.* 3 (4) : 147-152.
- Palmarola-Adrados, B., Choteborska, P., Galbe M., Zacchi, G.** (2005). Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Biores. Technol.* 96 : 843-850.
- Pampulha, E., Loureiro-Diaz, M. C.** (1989). Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Ap. Microbiol. Biotechnol.* 31 : 547-550.
- Pampulha, E., Loureiro-Diaz, M. C.** (1990). Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Ap. Microbiol. Biotechnol.* 34 : 375-380.

- Pasty, J.C.** (2004). Les débouchés non alimentaires des produits agricoles : un enjeu pour la France et l'Union Européenne. Avis et rapports du Conseil Economique et Social. N° 2004. 1-201.
- Perréon-Delamette** (2004). De l'or noir à l'or vert, l'avenir industriel des bioproduits. Dossier de presse de l'ADEME. <http://www.chanvre-infoch./info/en/article2479html>.
- Peterson, R. A.** (1986). Mango diseases. Proceedings of the CSIRO First Australian Mango Research Workshop. pp. 233–247.
- Phowchinda, O., Delia-Dupuy, M. L., Strehaiano, P.** (1995). Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 17 : 237-242.
- Ploetz, R. C.** (1994). Distribution and prevalence of *Fusarium subglutinans* in mango tree affected by malformation. *Can. J. Bot.* 72:7-9.
- Poilpré, E.** (2002). Mécanisme d'adaptation rapide de *Saccharomyces cerevisiae* en métabolisme oxydatif : implication des sucres de réserve et de la capacité respiratoire. Thèse INSA Toulouse. 132p.
- Prescott, M., Harley, J. P., Klein, D.** (1995). *Microbiologie*, De Boeck Université (ed), Bruxelles. p. 1014.
- Prusky, D., Fuchs, Y., Yanko, U.** (1983). Assessment of latent infections as a basis for control of post harvest disease of mango. *Plant Dis.* 67 : 816–818.
- Romano, P., Suzzi, G.** (1992). Sulfur dioxide and wine microorganismes. In: *Wine Technology and Biotechnology*. G. H. Fleet. Ed. Harwood, Academic Publishers, Chur. Suisse. pp. 373-393.
- Ramos, M. T., Medeira-Lopes, A.** (1990). Effects of acetic acid on the temperature profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 12 : 229-234.
- Rey, J. Y., Diallo, T. M., Vanniere, H., Didier, C.** (2004). The mango in french-speaking West Africa: varieties and varietal composition of the orchards. *Fruits.* 59 (3) : 191-206.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Doneche, B., Lonvaud, A.** (1998). Traité d'oenologie - tome 1 - *Microbiologie du vin, vinification*, Dunod (ed), Paris. 617p.
- Rikhvanov, E., Varakina, N., Rusaleva, T., Rachenko, E., Kiseleva, V., Voinikov, V.** (2001). Heat shock-induced changes in the respiration of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 70 : 462-465.

- Rowan, F. S., Heather, A. C., Danielle, A. W., Runion, G. B., Stephen, A. P., H. Allen, T., Richard, S., Lewis, Z.** (2009). Kudzu [*Puerariamontana* (Lour.)Merr.Variety lobata]: A new source of carbohydrate for bioethanol production. *Biom. Bioenerg.* 33 : 57-61.
- Sablayrolles, J. M.** (1992). Importance de l'azote assimilable et de l'oxygène sur le déroulement de la fermentation alcoolique. *Biolog. Og. VI (1-2)*. 155-160.
- Sanaa, M.** (2002). Microbiologie prévisionnelle : principaux modèles de croissance utilisés en appréciation quantitative des risques. *Epidémiol. Sant. anim.* 41 : 169-177.
- Scheffers, W. A.** (1992). Contaminants in Baker's yeast, proceeding of the COMMET course on Microbial Contaminants. Helsinki 1991 and 1992. Ed. *By M. Korhola and V. Bacstrom. Research.* 7 : 19-36.
- Schulze, U.** (1995). Anaerobic physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Thesis. Department of Biotechnology. Technical University Denmark. 140p.
- Sévastianos, R.** (1977). Taxonomie et écologie des bactéries sphériques hétérotrophes isolées du milieu marin. Thèse. Université de Provence. 132p.
- SICAREX** (2000). Analyse institutionnelle de la filière mangue dans les départements de Orodara et Koloko : Rapport provisoire, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, Organisation Neerlandaise des Volontaires (S.N.V.). 52p.
- Sree, N. K., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I. M., Rao, L. V.** (2000). High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *S. cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.* 24 : 22-226.
- Strehaiano, P.** (1984). Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique. Thèse de doctorat de l'institut National Polytechnique de Toulouse, France. 148p.
- Suresh, K., Kiransree, N., Rao, L. V.** (1999). Production of ethanol by raw starch hydrolysis and fermentation of damaged grains of wheat and sorghum. *Bioprocess Eng.* 21 : 165-168.
- Teusink, B., Diderich, J. A., Westerhoff, H. V., Van Dam, K., Walch, M. C.** (1999). Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *J. Bacteriol.* 180 (3): 556-562.

- Torija, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J. M., MAS, A.** (2002). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Internat. Food Microbiol.* 80 : 47-53.
- Traoré, A. S., Konlani, S.** (1989). Etude physiologique d'une levure utilisée dans l'alimentation humaine au Burkina Faso comme source de proteines. *Abn-Symp. Biol/Food Prod. Afr.* 741-747.
- Vayssieres, J-F., Sanogo, F., Noussourou, M.** (2004). Inventaire des espèces de mouches de fruits (*Diptera teppritidae*) inféodées au manguier au Mali et essai de lutte raisonnée. *Fruits.* 59 : 1-14.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H., Lee, T. H.** (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Americ. J. Enol. Viticult.* 36: 302-313.
- Yamaji, K., Matsumura, Y., Ishitani, H., Yamada, K., Wyman, C. E., Tolan, J. S.** (2006). Production of low-cost bioethanol to be a rival to fossil fuel.
http://www.nedo.go.jp/itd/teian/ann-mtg/fy18/project/h-03y_e.pdf
- Yang, H. Y.** (1973). Deacidification of grape musts with *Schizosaccharomyces pombe*. *Americ. J. Enolog. Viticult.* 24: 132-140.
- Yeboua, A. F.** (1989). Production d'éthanol par *S. cerevisiae* Y847NNRL, à partir d'hydrolysats d'amidon de manioc. *Abn-Sym. Biol. Food. Afri.* 789-793.

Liens électroniques

1. http://www.actuenvironnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/biomasse.php4.
(05/01/2011).
2. http://www.biomassenergycentre.org.uk/portal/page?_pageid=76,15049&_dad=portal&_schema=portal.
(05/01/2011).
3. <http://www.biologie.univ-mrs.fr/upload/P251/Photosynthesis.pdf> (05/01/2011).

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Milieu de gélose de conservation

Agar-agar (Difco)	20 g
Glucose (Difco)	20 g
Extrait de levure (Difco)	10 g
NaCl (Prolabo)	10 g
Glycérol	10%
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	7 ± 0,2

Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 2 : Milieu de Sabouraud solide

Peptone (Difco)	10 g
Glucose (Difco)	20 g
Agar (Difco)	10 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	6 ± 0,2

A ce milieu on ajoute après autoclavage et refroidissement dans des conditions stériles ; la gentamicine ou le chloramphénicol à raison de 0,40 g/l pour la gentamicine et de 0,5 g/l chloramphénicol. Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 3 : Milieu YEPD

Yeast extract (Extrait de levure)	10 g
Peptone (Difco)	10 g
Dextrose (Difco)	20 g
Agar (Difco)	10 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	6 ± 0,2

Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 4 : Milieu gelose farine de Maïs

Infusion de farine de Maïs	10 g
Agar (Difco)	5 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	6 ± 0,2

Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 5 : Milieu alcoolique pour l'étude de la tolérance à l'alcool

Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Ethanol	X ml
Eau distillée qsp	Y ml
pH	6 ± 0,2

Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 6 : Milieu de Clark et Lubs

Peptone (Difco)	6 g
Glucose (Difco)	20 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	7 ± 0,2

Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 7 : Milieu pour la détermination du caractère amylolytique des souches

Extrait de levure	5 g
Agar	20 g
Amidon	10 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	7 ± 0,2

Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 8 : Milieu pour le test de sporulation

Extrait de levure	3 g
Peptone	5 g
Glucose	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	7 ± 0,2

Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe 9 : Milieu de base pour l'étude de la fermentescibilité des sucres

Extrait de levure	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgCl ₂ (6H ₂ O)	0,4 g
NH ₄ Cl	1 g
FeSO ₄ (7H ₂ O)	5 mg
Solution d'oligoéléments	1 ml
Tween 80	1 ml
Sucre	3 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	7 ± 0,2

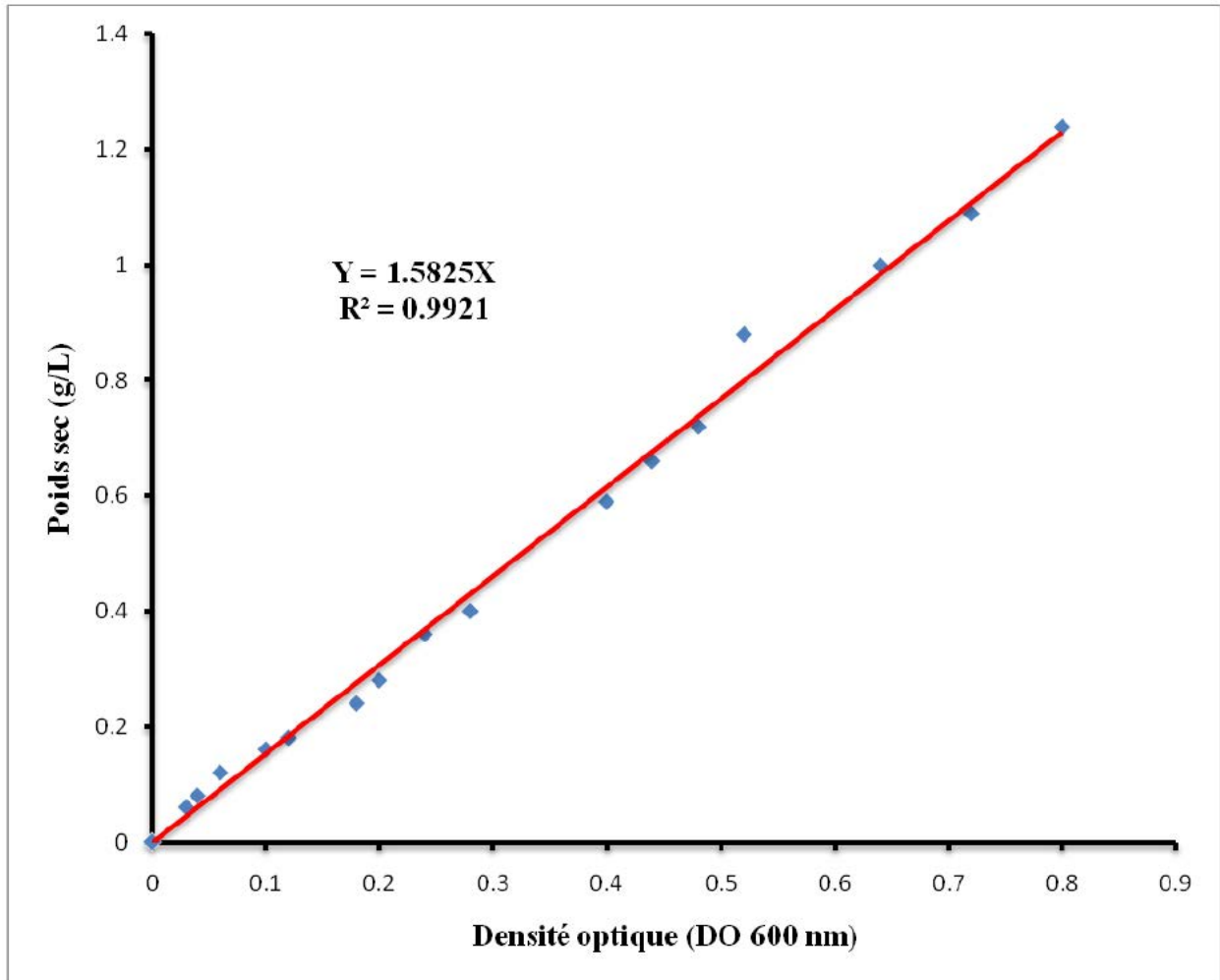
Le milieu est stérilisé à 121° C pendant 45 minutes.

Annexe 10 : Milieu synthétique pour la fermentation des sucres (KONLANI, 1996)

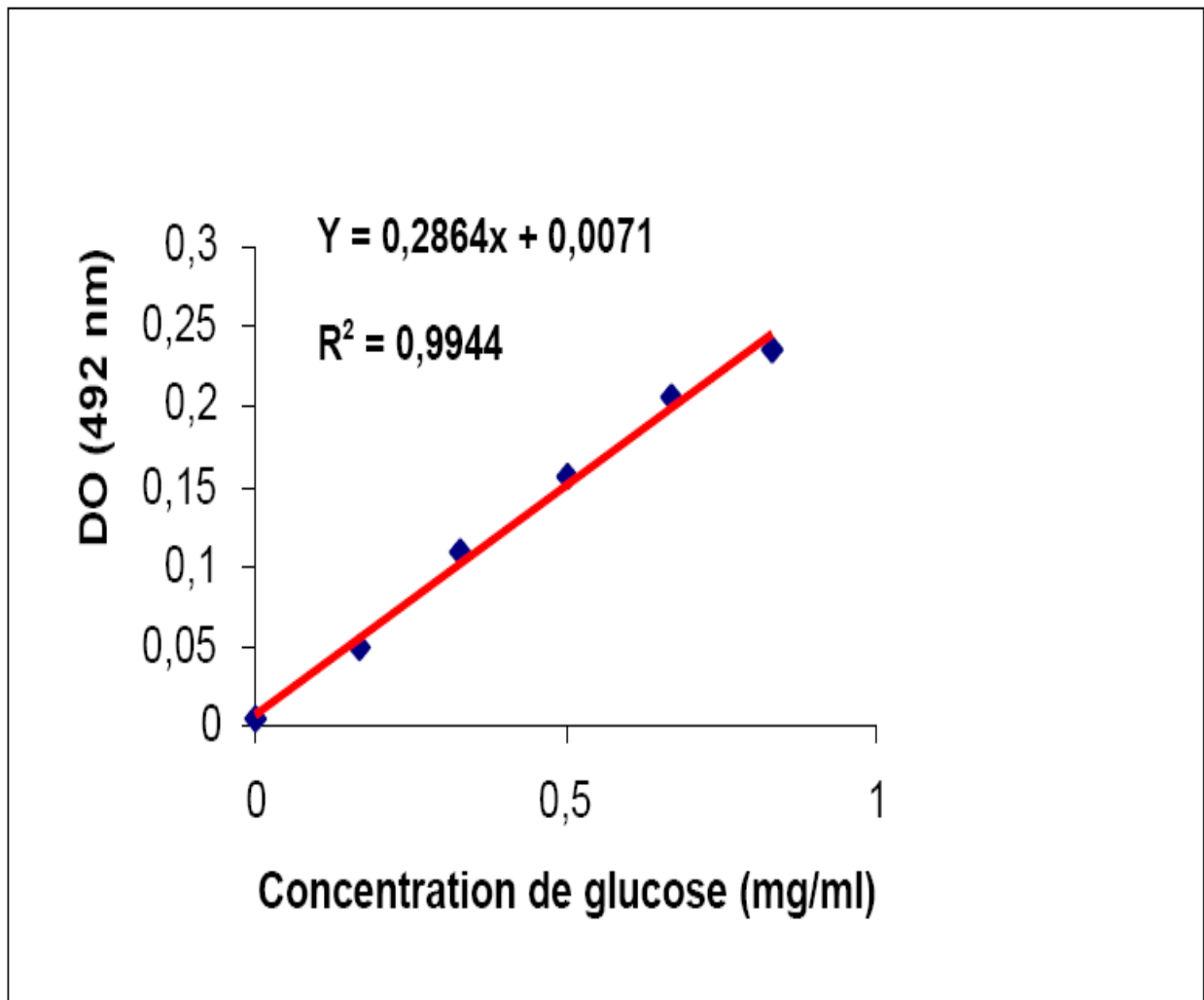
Extrait de levure	3 g
Peptone	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 g
MgSO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	5 mg
Solution d'oligoéléments	1 ml
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	7 ± 0,2

Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

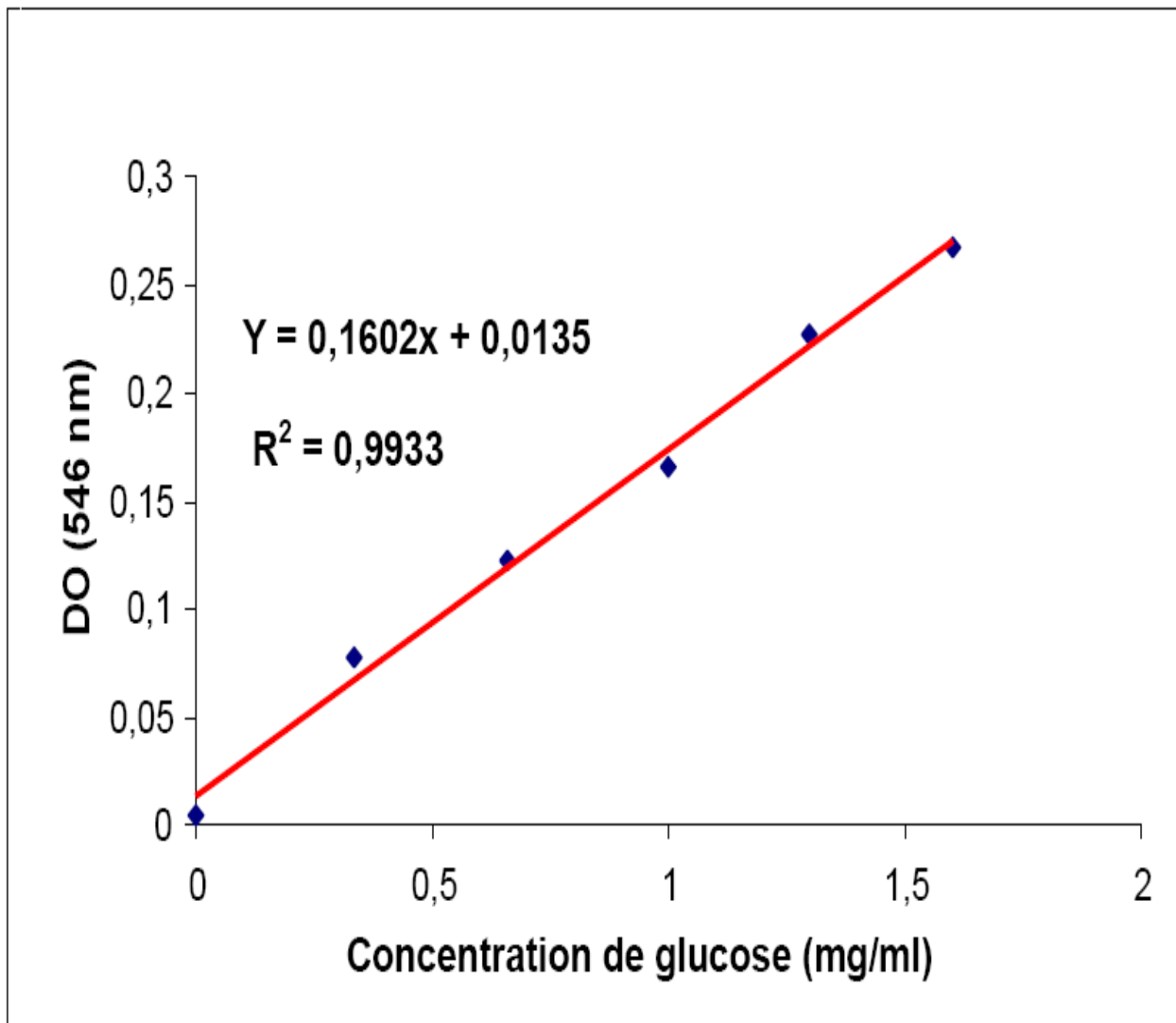
Annexe 11 : Courbe étalon montrant corrélation entre le poids-sec et la densité optique à 600 nm pour *Saccharomyces* sp isolée du ferment de dolo (bière locale).



Annexe 12 : Courbe étalon des sucres totaux



Annexe 13 : Courbe étalon des sucres réducteurs



Annexe 14 : Courbe étalon de l'amidon total

