

Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique
Eau Terre Environnement

**EFFET DE LA VARIATION DE LA QUANTITÉ D'OXYGÈNE
DISSOUS SUR LA PRODUCTION DES LIPIDES À PARTIR DE
YARROWIA Lipolytica CULTIVÉE SUR UN SUBSTRAT DE
GLYCÉROL BRUT**

Par
Sofia KAJEIOU

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examineur interne	Patrick DROGUI INRS-ETE
Examineur externe	Kokou ADJALLÉ UQTR
Directeur de recherche	Rajeshwar DAYAL TYAGI INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Kamal EL HAJI ISHÉDD

REMERCIEMENTS

En guise de reconnaissance, je tiens à adresser mes sincères remerciements aux personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire.

En premier lieu, je tiens à remercier l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) pour m'avoir ouvert ses portes et surtout pour son support financier durant toute la période de mes études.

Je voudrais adresser toute ma gratitude à mon directeur de recherche, le Professeur Rajeshwar Dayal TYAGI pour sa patience, sa disponibilité et son soutien et à mon co-directeur de recherche, le Professeur Kamal EL HAJI qui m'a offert une formation de qualité, un suivi perpétuel et surtout des conseils judicieux.

Je tiens aussi à remercier mes examinateurs, le Professeur Patrick DROGUI et Kokou ADJALLÉ pour leurs temps et attention.

Je remercie aussi les membres de l'équipe et mes collègues qui m'ont fourni les outils nécessaires à la réussite de mes expériences au laboratoire. Je tiens à remercier spécialement Raja, Lalit et Sravan pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à mes parents pour leurs conseils et leur support financier, moral et intellectuel tout au long de mes études. Je remercie aussi ma sœur et mon frère pour leur support et leur confiance.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes amis et collègues qui m'ont apporté leur support moral. Et dans l'impossibilité de citer tous les noms, mes sincères remerciements vont à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont permis par leurs conseils et leurs compétences la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉ

Dans le cadre d'une maîtrise en Sciences de l'eau à l'Institut National de la Recherche Scientifique - Centre Eau Terre et Environnement (INRS-ETE) en collaboration avec l'Institut Supérieur des Hautes Études en Développement Durable (ISHÉDD) (Rabat, Maroc), j'ai effectué un travail qui porte sur l'évaluation de la production des lipides microbiens précurseurs du biodiesel par une souche de levure oléagineuse nommée *Yarrowia Lipolytica SKY7* cultivée sur un substrat de glycérol brut. L'objectif de cette étude consiste particulièrement à déterminer le taux optimal de saturation du milieu de fermentation en oxygène dissous pour une meilleure production des lipides par *Yarrowia Lipolytica SKY7*.

De ce fait, le processus de la production des lipides s'est déroulé dans un fermenteur de type INFORS AG CH-4103, avec une capacité de 7L, une durée de fermentation de 72h, une température de 28°C et à un pH de 6,5. Quant au taux d'oxygène dissous dans le milieu, variable régissant l'étude, cinq fermentations sont réalisées avec les différentes saturations en oxygène : 20%, 30%, 40%, 50% et 60%.

Les résultats obtenus montrent que la concentration en biomasse augmente progressivement avec le taux de saturation en oxygène de 20% jusqu'à 50% où elle enregistre, respectivement, les valeurs 11,03 g/L ; 12,62 g/L ; 13,09 g/L et 13,8 g/L. Néanmoins, une tendance à la baisse de la concentration en biomasse (12,16 g/L) est marquée à un taux de saturation en oxygène de 60%.

La production maximale de lipides 7,43 g/L est obtenue dans un milieu de culture saturé à 40% en oxygène dissous avec une teneur maximale de la biomasse en lipides de 57,9% w/w. Des teneurs en lipides aussi importantes 56,4% w/w et 55,58% w/w sont enregistrées lors des fermentations réalisées respectivement sous des taux de saturations en oxygène de 30% et 50%.

Mots clés : lipide, *Yarrowia Lipolytica SKY7*, taux de saturation en oxygène.

ABSTRACT

As part of a Master's Degree in Water Sciences at the National Institute for Scientific Research - Center on Water, Earth and Environment (INRS-ETE) and with the collaboration of the Higher Institute for Sustainable Development Studies (ISHÉDD) (Rabat, Morocco), I Have carried out a research work on the evaluation of the microbial lipids, precursors of biodiesel production, by a strain of oleaginous yeast called *Yarrowia Lipolytica* SKY7 grown on a substrate of crude glycerol.

The main objective of this study is to determine the optimal saturation rate of the dissolved oxygen in the fermentation medium in order to obtain maximum lipid production by *Yarrowia Lipolytica* SKY7.

Hence, the lipid production process was carried out in an INFORS AG CH-4103 fermenter with a capacity of 7 L, at the temperature of 28 ° C and pH 6.5 for fermentation time of 72 h. As the dissolved oxygen was varied during the study, five fermentations were carried out with different oxygen saturation rates of 20%, 30%, 40%, 50% and 60%.

The obtained results shows that the biomass concentration increased gradually with the increase in oxygen saturation rate from 20, 30, 40 to 50% and reached to 11.03 g / L; 12.62 g / L; 13.09 g / L and 13.8 g / L respectively. Nevertheless, a downward trend in biomass concentration is marked (12.16 g/L) at an oxygen saturation rate of 60%.

Maximum lipid production of 7.43 g / L was obtained for an oxygen saturation rate of 40% with maximum lipid content of 57.9% w / w, while lipid content of 56.4% w / w and 55.58% w / were recorded on fermentations carried out respectively at 30% and 50% oxygen saturation rate.

Key words: lipid, *Yarrowia Lipolytica* SKY7, oxygen saturation.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
Table des matières	v
Liste des FIGURES	viii
Liste des TABLEAUX	xi
INTRODUCTION	xi
1. Revue de littérature	4
1.1 Limites des énergies fossiles-sources d'énergie alternative	4
1.1.1 Limites des énergies fossiles.....	4
1.1.2 Biocarburants comme principale alternative	5
1.2 Microorganismes oléagineux.....	14
1.2.1 Bactéries oléagineuses.....	15
1.2.2 Algues oléagineuses.....	15
1.2.3 Champignons oléagineux.....	16
1.2.4 Levures oléagineuses	17
1.2.5 <i>Yarrowia lipolytica</i> une levure oléagineuse d'intérêt.....	19
1.3 Synthèse de lipides de réserve	22
1.3.1 Biosynthèse des acides gras.....	22
1.3.2 Biosynthèse des triglycérides	24
1.4 Mécanisme de déclenchement de l'accumulation lipidique chez les microorganismes oléagineux.....	27

1.4.1	Déclenchement de l'accumulation lipidique	27
1.4.2	Étapes du mécanisme d'induction de l'accumulation lipidique	27
1.5	Facteurs influençant l'accumulation lipidique.....	31
1.5.1	Oxygène	31
1.5.2	Température	31
1.5.3	pH.....	32
1.5.4	Nature du substrat.....	32
2.	objectifs et hypothèses	34
3.	Méthodologie	35
3.1	Démarche méthodologique	35
3.2	Matériel et méthodes	35
3.2.1	Conditions de culture.....	35
3.2.2	Méthodes analytiques	38
4.	Résultats et discussion	41
4.1	ANALYSE DES RÉSULTATS.....	41
4.1.1	Analyse des courbes des conditions de fermentations	41
4.1.2	Analyse des résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 20%	47
4.1.3	Analyse des résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 30%	48
4.1.4	Analyse des résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 40%	49
4.1.5	Analyse des résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 50%	50

4.1.6	Analyse des résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 60%	51
4.2	DISCUSSION ET INTERPRÉTATION.....	53
4.2.1	Effet de la saturation du milieu de culture en oxygène sur la biomasse	53
4.2.2	Effet de la saturation du milieu de culture en oxygène sur la production de lipides	59
5.	Conclusion et Recommandations	64
6.	Références.....	66
ANNEXE	76

LISTE DES FIGURES

Figure 1. 1 Classification des biocarburants selon Nigam et Singh, 2011.....	6
Figure 1. 2 Principales voies de la conversion de la biomasse lignocellulosique.....	8
Figure 1. 3 Description des étapes de la production du biocarburant par voie thermochimique (DCE, 2006).....	9
Figure 1. 4 Étapes de la production du biocarburant par voie biochimique	11
Figure 1. 5 Schéma représentant les étapes de la production des biocarburants à partir des microalgues	13
Figure 1. 6 Schéma décrivant la taxonomie de <i>Y. lipolytica</i>	20
Figure 1. 7 Schéma des voies impliquées dans la biosynthèse des lipides.....	23
Figure 1. 8 Synthèse des triacylglycérols	25
Figure 1. 9 Réaction de la formation de l'acide phosphatidique (R1 et R2 représentent des acides gras).....	26
Figure 1. 10 Réaction de la formation du diacylglycérol.....	26
Figure 1. 11 Schéma du Mécanisme d'induction de l'accumulation de lipides chez les levures oléagineuses.....	27
Figure 1. 1 Schéma du Mécanisme d'induction de l'accumulation de lipides chez les levures oléagineuses.....	30
Figure 3. 1 Description du bioréacteur utilisé lors des expériences.....	38
Figure 4. 1 Courbe de la variation des conditions de la fermentation avec une teneur en oxygène de 20%.....	42
Figure 4. 2 Courbe de l'évolution des conditions de la fermentation avec une teneur en oxygène de 30%.....	43

Figure 4. 3 Courbe de l'évolution des conditions de la fermentation avec une teneur en oxygène de 40%.....	44
Figure 4. 4 Courbe de l'évolution des conditions de la fermentation avec une teneur en oxygène de 50%.....	45
Figure 4. 5 Courbe de l'évolution des conditions de la fermentation avec une teneur en oxygène de 60%.....	46
Figure 4. 6 Graphe représentant l'évolution des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon durant les 72 heures de fermentation avec une saturation en oxygène de 20%.....	47
Figure 4. 7 Graphe représentant la variation des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon durant les 72 heures de fermentation avec une saturation en oxygène de 30%.....	48
Figure 4. 8 Graphe représentant la variation des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon durant les 72 heures de fermentation avec une saturation en oxygène de 40%.....	49
Figure 4. 9 Graphe représentant l'évolution des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon durant les 72 heures de fermentation avec une saturation en oxygène de 50%.....	50
Figure 4. 10 Graphe représentant l'évolution des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon durant les 72 heures de fermentation avec une saturation en oxygène de 60%.....	52
Figure 4. 11 Graphe représentant l'évolution de la concentration de la biomasse au cours des différentes fermentations en fonction du temps	53
Figure 4. 12 Comparaison des maxima de concentrations de la biomasse au cours des différentes fermentations.....	54

Figure 4. 13 Taux spécifique de croissance en fonction du temps pour les différentes fermentations.....	55
Figure 4. 14 Concentration de la biomasse sans lipide en fonction du temps pour les différentes fermentations.....	55
Figure 4. 15 Consommation du glycérol au cours des différentes fermentations	57
Figure 4. 16 Consommation du savon et FFA dans au cours des différentes fermentations.....	57
Figure 4. 17 Concentration des lipides des différentes fermentations	59
Figure 4. 18 Comparaison des maxima de concentrations en lipides produits au cours des différentes fermentations	60
Figure 4. 19 Taux spécifique de production de lipides en fonction du temps pour les différentes fermentations avec des taux d'oxygène allant de 20% à 60%.....	61
Figure 4. 20 Les maxima de teneur en lipides dans les différentes fermentations	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. 1 Accumulation lipidique chez certaines bactéries oléagineuses	15
Tableau 1. 2 Accumulation lipidique chez certaines espèces de micro-algues	16
Tableau 1. 3 Accumulation lipidique chez certaines espèces de champignons	17
Tableau 1. 4 Accumulation lipidique chez certaines espèces de levures	18
Tableau 3. 1 Composition du milieu de culture	36
Tableau 3. 2 Caractéristiques du glycérol brut utilisé	36
Tableau 3. 3 Conditions de fermentations	37

INTRODUCTION

L'utilisation accrue du carburant pétrolier dans différents secteurs principalement le transport, conduit à la raréfaction de cette ressource d'origine fossile. Par conséquent, la recherche de nouvelles alternatives aboutissant à une indépendance énergétique est devenue un enjeu majeur. D'autant plus, le réchauffement climatique et l'instabilité des coûts de pétrole ont poussé les chercheurs à explorer de nouvelles voies. Celles-ci doivent être soucieuses de l'environnement et économiquement viables dans le but de trouver de nouvelles sources d'énergie durables dans le temps. Plusieurs travaux de recherches ont été élaborés dans ce sens et le biodiesel s'est avéré une solution plausible.

Le biodiesel est un ester méthylique obtenu par réaction chimique avec un alcool léger et des matières grasses végétales ou animales. Il peut être utilisé dans son état pur comme carburant de remplacement ou en mélange avec du pétrodiesel (*Larousse, 2012*). Le biocarburant est non seulement renouvelable et biodégradable, mais aussi non toxique et présente des caractéristiques de combustion claire parce qu'il est davantage chargé en oxygène (11%) (*Mittelbach et al., 2004*). De plus, il assure une meilleure combustion du carburant auquel il est mélangé.

Les chercheurs et les industriels se sont orientés vers la production du biodiesel à partir des huiles végétales (colza, tournesol, soja, etc.) car de point de vue environnemental, les biocarburants permettent une réduction des émissions de gaz à effet de serre. Cependant, un certain nombre d'inconvénients a été noté, tel que le long cycle de vie des végétaux oléagineux (récolte des végétaux oléagineux deux fois par an au maximum). Les cultures oléagineuses exigent de vastes superficies de terres arables, ce qui crée une concurrence avec la production alimentaire. Par ailleurs, le coût de la production du biodiesel provient en majeure partie (70%) de la matière première (huiles et graisses) (*Haas et al., 2006*). Cette situation désavantageuse au développement de cette ressource a amené les chercheurs à explorer de nouvelles alternatives à cette matière première.

Parmi plusieurs solutions proposées, on retrouve l'utilisation des boues d'épuration, des huiles usées provenant des restaurants et le glycérol brut qui constitue une matière première prometteuse (Avila *et al.*, 2014). Le glycérol $C_3H_8O_3$, est un sous-produit de la production du biodiesel très riche en carbone qui pourrait servir de nutriment pour de nombreux microorganismes capables de produire des huiles microbiennes dans certaines conditions de culture. Le glycérol représente donc une excellente alternative de matière première pour la production du biodiesel avec un coût relativement faible, vu qu'il est considéré comme déchet dans les industries de production de biodiesel (Yazdani *et al.*, 2007). De plus, les huiles microbiennes présentent plusieurs avantages :

- Absence de concurrence avec la production alimentaire ;
- Court cycle de vie et un taux de croissance élevé ;
- Bon potentiel d'accumulation des lipides chez les microorganismes oléagineux.

Les procédés de production de la biomasse dans des bioréacteurs contrôlés permettent l'obtention des cultures de micro-organismes plus performantes en termes de production des lipides grâce à la combinaison d'approches de génie microbiologique et de génie génétique.

Actuellement, les chercheurs visent l'amélioration de la production des lipides par l'optimisation de certains paramètres qui agissent sur la fermentation notamment le choix de la souche et les conditions de culture (température, pH, agitation, oxygène dissous...).

La présente étude s'intéresse particulièrement à la variable saturation en oxygène dissous. Elle vise à déterminer la quantité optimale d'oxygène nécessaire à une production maximale des lipides à partir de la levure *Yarrowia Lipolytica SKY7* en vue de produire du biodiesel. Les prochains chapitres donnent suite aux détails permettant de répondre à cette problématique.

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Limites des énergies fossiles-sources d'énergie alternative

1.1.1 Limites des énergies fossiles

Les énergies fossiles les plus courantes sont le gaz naturel, le charbon et le pétrole. Selon l'Agence Internationale de l'Energie (AIE), le charbon et le pétrole comptent pour 60% de la production mondiale de l'énergie primaire. Néanmoins, le pétrole reste la source d'énergie la plus utilisée et représente 32,9% de la consommation totale d'énergie pour l'année 2015 (Petroleum, 2016). Par ailleurs, La forte croissance démographique et économique que connaît le monde depuis l'ère industrielle va de pair avec une augmentation continue des besoins énergétiques dans différents secteurs (industrie, transport, pétrochimie...). Le secteur du transport occupe la majorité de ces besoins 57,7% (Escobar *et al.*, 2009). La consommation énergétique s'est certes stabilisée chez les pays industrialisés après les chocs pétroliers des années 1970, mais les économies émergentes dont les deux géants démographiques ; l'Inde et la Chine ont, depuis lors, exacerbés. Pour l'année 2015, leurs consommations ont augmenté respectivement de 1.5% et 5.2% (Petroleum, 2016).

L'AIE estime que les sources d'énergie en 2040 reposeront encore à environ 75% sur les énergies fossiles, contre 81,4% en 2013 et prédit une augmentation de plus de 50% de la demande totale mondiale d'ici 2030 (ÉNERGIES, 2011).

Le pétrole est le résultat de la décomposition et de la transformation de matières organiques d'origines animale et végétale au cours des centaines de millions d'années dans des régions éparses de la planète. C'est donc une ressource non renouvelable et une réserve, par nature, limitée. D'une manière ou d'une autre, les sources en pétrole se tariront dans un avenir relativement proche et la demande ne cessera de croître avec le développement économique.

Bien que cette ressource présente un certain nombre de vertus, la combustion du pétrole libère dans l'atmosphère des produits nocifs pour l'écosystème planétaire (essentiellement le dioxyde de carbone CO₂, le méthane CH₄ et le protoxyde d'azote N₂O), qui sont en relation directe avec l'augmentation de la concentration de gaz à effet de serre dans l'atmosphère terrestre (Astrup *et al.*, 2009). Ces gaz absorbent une partie de l'énergie solaire et la redistribuent sous forme de radiations ionisantes dans l'atmosphère, contribuant ainsi au réchauffement planétaire et aux importants changements climatiques qui en découlent.

La prise de conscience de ces problématiques causées par l'utilisation irrationnelle du pétrole par la communauté mondiale, nous incite à limiter rapidement les émissions de gaz à effet de serre. Comme le prévoit le protocole de Kyoto ; entré en vigueur en février 2005 ; et à promouvoir, à plus long terme, la recherche de nouvelles sources d'énergie durables et non toxiques. Ainsi les biocarburants, dont les ressources sont disponibles et renouvelables à l'échelle mondiale sous forme de biomasse et de déchets résiduels, peuvent constituer une alternative appropriée aux combustibles pétroliers.

1.1.2 Biocarburants comme principale alternative

Les biocarburants sont des carburants de substitution produits à partir de la transformation de biomasse d'origine végétale, animale ou de déchets. Ils sont principalement utilisés comme carburant de transport et sont généralement incorporés dans les carburants d'origine fossile (Larousse, 2012). En comparaison avec ces derniers, la combustion des biocarburants émet dans l'atmosphère des quantités plus faibles de soufre et de monoxyde de carbone (Timilsina *et al.*, 2011). La classification des biocarburants établie par Nigam et Singh en 2011 (Nigam *et al.*, 2011) distingue deux grandes familles. La première comporte les biocarburants primaires qui sont utilisés à l'état brut sans transformation comme le bois combustible, les déchets organiques, les déchets forestiers... La deuxième est celle des biocarburants secondaires, qui sont classés à leur tour en trois générations et ce en fonction de la nature du substrat initial et de leur mode de transformation (Fig. 1.1).

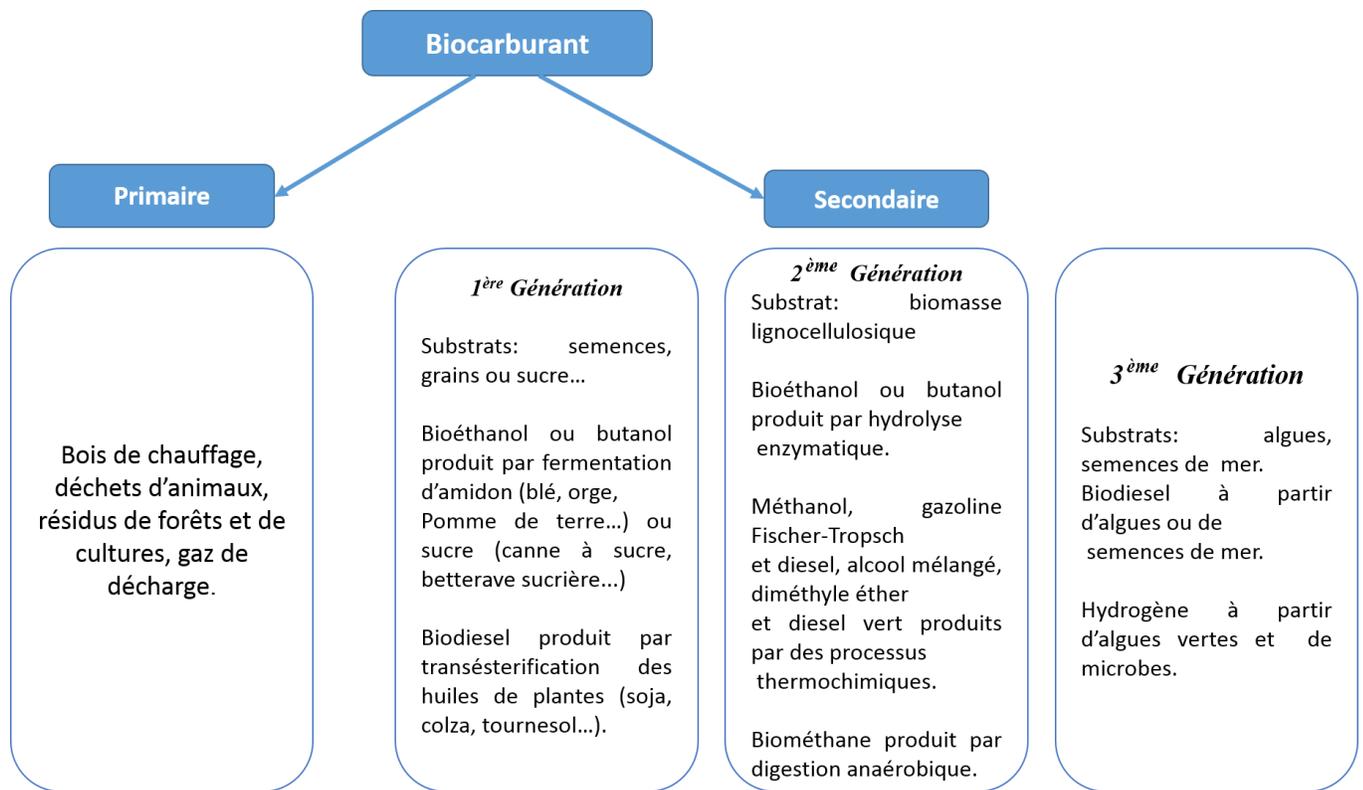


Figure 1. 2 Classification des biocarburants selon Nigam et Singh, 2011

1.1.2.1 Biocarburants de première génération

Ils correspondent aux biocarburants utilisés actuellement, ils sont produits à partir de cultures végétales et plus spécifiquement, ce sont les parties de réserve des plantes riches en sucre ou en amidon (betterave, canne à sucre, maïs, manioc) ou les graines des plantes oléifères (colza, tournesol, soja, noix de coco) qui sont utilisées. Les biocarburants de première génération les plus couramment utilisés sont le bioéthanol et le biodiesel. Leur production se fait par le biais d'une fermentation alcoolique de l'amidon ou du sucre pour produire du bioéthanol ou du butanol, ou par une transestérification d'huiles végétales pour produire du biodiesel (Mittelbach *et al.*, 2004).

Cette génération de biocarburants est donc issue de la conversion de cultures alimentaires en sources d'énergie, ce qui soulève plusieurs inconvénients critiques de la part des chercheurs. En effet, La production de ces biocarburants entre en compétition directe avec les ressources alimentaires et donc avec la disponibilité et le cours des aliments dans le monde (Ajanovic, 2011). Il en résulte également des problèmes environnementaux à savoir la déforestation massive au

profit de l'extension des surfaces de cultures ainsi que l'approvisionnement en eau et le risque de décontamination liée à l'utilisation excessive de fertilisants (Goldemberg *et al.*, 2010). D'autant plus, la production de biocarburants issus de végétaux dépend de la localisation géographique et du climat qui définissent le rendement, et la productivité végétal.

Pour remédier à ces problèmes, des études actuelles tentent de développer des biocarburants dits de deuxième génération à partir de résidus lignocellulosiques non alimentaires (Fig 1.2), comme les déchets agricoles, forestiers et les parties non comestibles des plantes (BROUST *et al.*, 2017).

1.1.2.2 Biocarburants de deuxième génération

Les biocarburants de deuxième génération sont les successeurs des biocarburants de première génération et sont actuellement en cours de développement, une mise à l'échelle industrielle est envisagée pour l'horizon 2020 (Beligon, 2016). La matière première utilisée pour produire ce type de biocarburant correspond à la biomasse lignocellulosique disponible en grande quantité et sous différentes formes : sous-produits des activités agricoles (pailles de céréales, tiges, bagasses de canne à sucre), résidus d'exploitation forestière (branches, rameaux), déchets de l'industrie du bois (sciures, rebuts) et du papier et nouvelles cultures lignocellulosiques dédiées à fort rendement (triticale, luzerne, miscanthus, peuplier, saule, etc.) (Dronne *et al.*, 2011). Des procédés avancés sont utilisés pour transformer cette biomasse en biocarburants, la voie biochimique et la voie thermochimique sont les deux principales voies de production qui sont proches de l'industrialisation. Il existe une troisième voie, hybride, qui combine les deux voies principales (Ballerini, 2006).

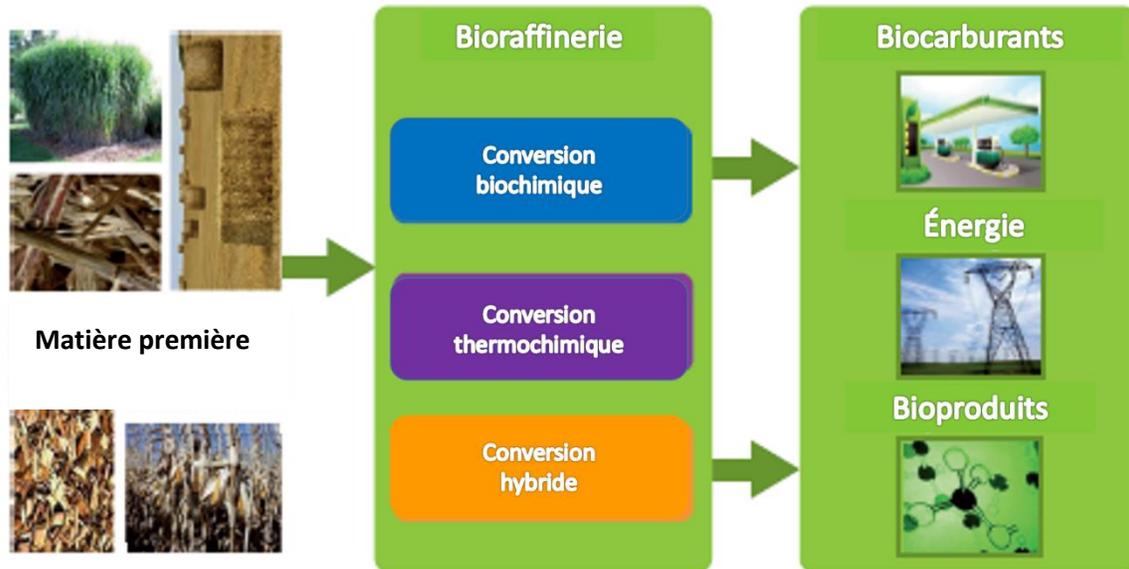


Figure 1. 3 Principales voies de la conversion de la biomasse lignocellulosique

Source : IFP Énergies nouvelles, 2015.

Production par voie thermo-chimique

La voie thermo-chimique est à l'origine de la production de biodiesel de deuxième génération. Elle procède à un traitement thermique permettant de décomposer la matrice lignocellulosique et de transformer la biomasse solide et hétérogène en combustibles gazeux ou liquides (huiles de pyrolyse ou de liquéfaction, gaz de synthèse). Ces derniers sont soit utilisés directement pour la production de vapeur ou d'électricité, soit convertis en biocarburants liquides (DCE, 2006) (Fig. 1.3).

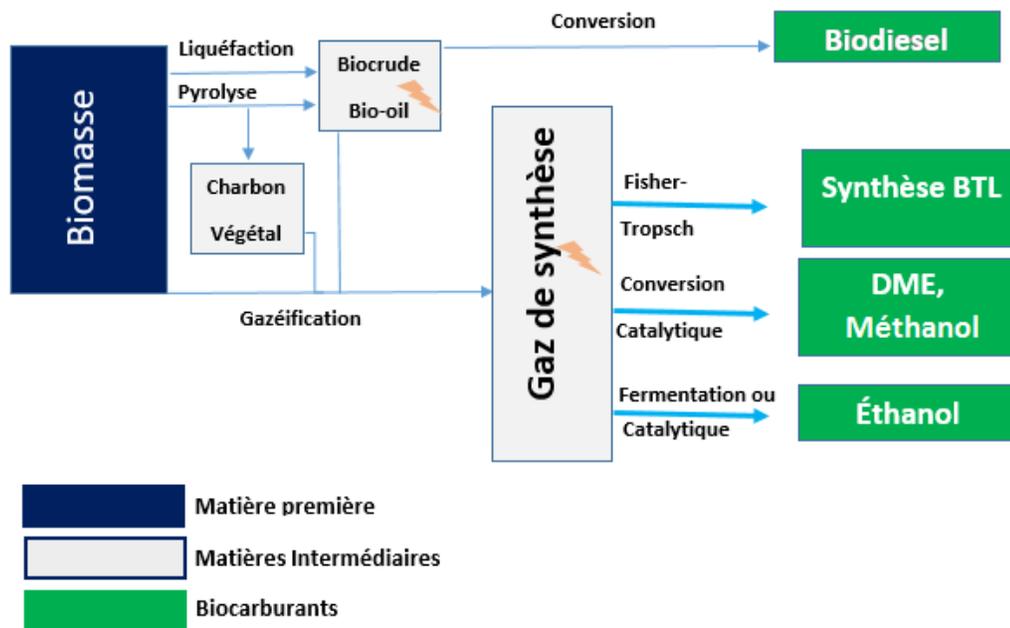


Figure 1. 4 Description des étapes de la production du biocarburant par voie thermo-chimique (DCE, 2006).

Source : INERIS - Direction de la certification, 2006.

Trois procédés font l'objet de travaux pour la production de biocarburants liquides (biodiesel) :

- *Pyrolyse de la biomasse*

La biomasse subit un prétraitement par pyrolyse ou torréfaction. Dans le réacteur de pyrolyse, deux produits sont formés : la vapeur ainsi que des composés solides (suie et charbon de bois). La condensation des vapeurs récupérées permet d'obtenir l'huile de pyrolyse ou bio-huile, qui peut être utilisée directement ou subir une phase de raffinage pour en faire un biocarburant liquide compatible (DCE, 2006).

- *Liquéfaction de la biomasse :*

La liquéfaction directe de la biomasse présente plusieurs avantages ; la biomasse peut être utilisée humide. Le produit final, biocrude présente une haute valeur énergétique, il est plus

stable que le bio-oil et il est convertible en substitut du diesel. Ce procédé est en phase de développement aux Pays-Bas (Panorama, 2015b).

- *Gazéification*

La gazéification est un traitement thermique en présence de vapeur d'eau ou d'oxygène (1000 à 1300°C) qui produit un gaz de synthèse, le syngaz, constitué principalement de monoxyde de carbone et d'hydrogène. Le syngaz, après purification, est converti par la mise en œuvre de procédés de synthèse, en particulier la synthèse catalytique Fischer-Tropsch en syndiesel ou carburant BTL (Biomass to Liquid). D'autres transformations du gaz de synthèse peuvent être envisagées comme la production du méthanol, du diméthyléther (DME) et de l'éthanol (DCE, 2006).

Production par voie biochimique

La lignocellulose est constituée de trois polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Ces trois composantes s'entremêlent et forment une structure tridimensionnelle rigide, complexe et très résistante. Seule la cellulose est aujourd'hui facilement transformable en éthanol dit "cellulosique"; l'hémicellulose fait l'objet de recherches intensives pour la rendre convertible. La voie biochimique fait appel à l'utilisation d'enzymes afin de dégrader la cellulose et de libérer les sucres qui seront ensuite fermentés pour produire de l'éthanol. Ce procédé s'effectue en quatre étapes illustrées sur la figure 1.4.

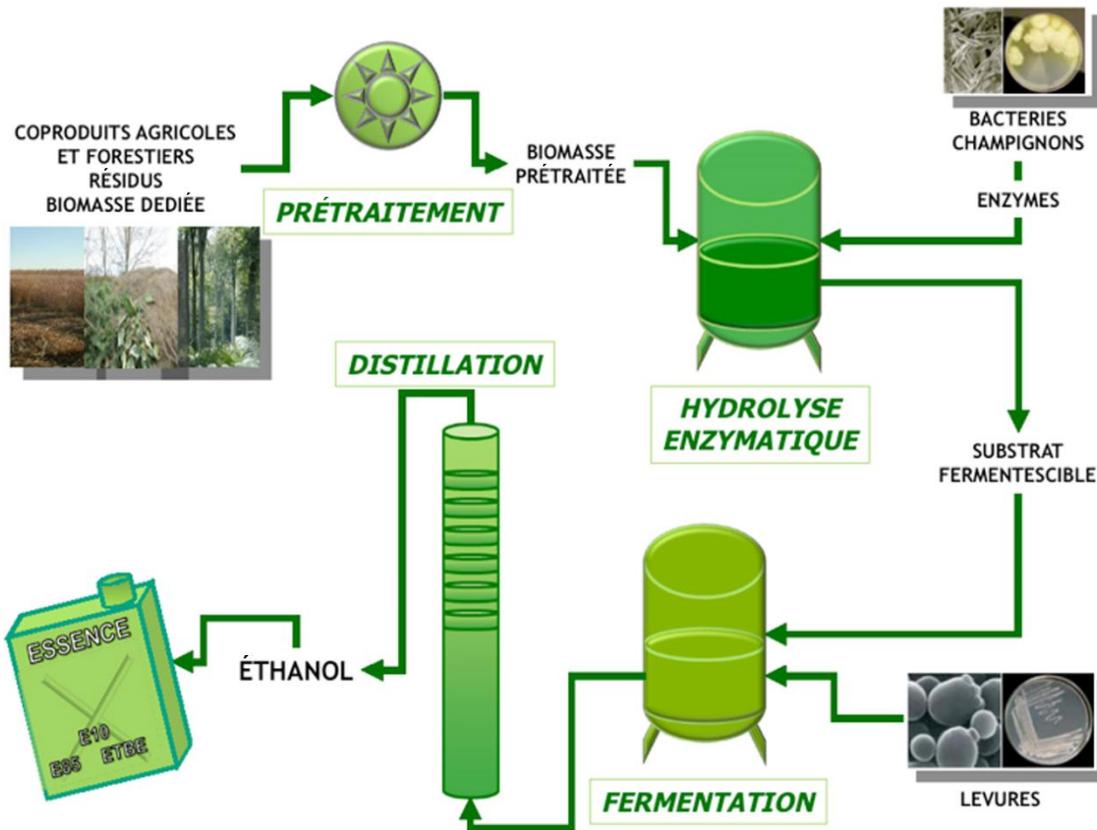


Figure 1. 5 Étapes de la production du biocarburant par voie biochimique

Source : (Panorama, 2015b)

- *Prétraitement*

Avant d'être transformée en carburant, la biomasse lignocellulosique doit être décomposée lors d'une étape de prétraitement, par action thermique et/ou chimique, une étape clé des technologies développées par les industriels. Cette étape permet d'extraire la lignine qui est non fermentescible.

- *Hydrolyse de la cellulose*

Cette étape consiste à fractionner la cellulose et l'hémicellulose en sucres simples et fermentescibles (glucose, pentose, saccharose, etc.) par hydrolyse à l'aide d'un acide ou des micro-organismes (*par exemple le champignon trichoderma reesei*) produisant dans des réacteurs des enzymes spécifiques agissant comme catalyseur (Panorama, 2015a).

- *Fermentation éthanolique et distillation*

Les sucres libérés subissent, par la suite, une fermentation alcoolique par des levures spécifiques et après purification par distillation et déshydratation, le bioéthanol est enfin obtenu (Panorama, 2015a).

Production par voie hybride

La voie hybride combine la voie thermochimique et la voie biochimique. Le gaz de synthèse obtenu par une étape de gazéification de la biomasse, est ensuite utilisé comme substrat de fermentation alcoolique. Cette voie de production de bioéthanol deuxième génération, est encore à l'étude, son développement a récemment démarré en Amérique et en Nouvelle-Zélande (Panorama, 2015a).

La production des biocarburants de deuxième génération nécessite une technologie complexe exigeant de lourds investissements, ce qui met en question le bilan énergétique et la rentabilité économique. Certes, cette génération de biocarburant présente l'avantage de valoriser les différents constituants non comestibles des plantes et d'utiliser une matière première diversifiée et de faibles coûts de production sans entrer en concurrence avec l'alimentation humaine. Cependant pour couvrir l'ensemble des besoins en carburant, cette matière première manque de volumes suffisants et on risque de retrouver les problèmes liés aux biocarburants de première génération : usage des sols par les cultures dédiées, insuffisance de déchets forestiers et agricoles qui sont généralement nécessaires à la régénération des sols et à l'abri de la biodiversité.

Pour s'affranchir des contraintes des sols et des déchets agricoles et forestiers, la recherche actuelle tente de développer des biocarburants dits de troisième génération à partir des lipides accumulés naturellement par des micro-organismes tels que les bactéries, les micro-algues, les champignons et les levures (Panorama, 2015a).

1.1.2.3 Biocarburants de troisième génération

La production de biocarburants à partir de lipides microalgaux et levuriens est encore au stade de recherche en laboratoire et présente une voie prometteuse de production d'énergie à long terme. En effet, certaines espèces ont été identifiées pour leur capacité à synthétiser et stocker des lipides au sein de leurs cellules avec un rendement de production bien supérieur aux plantes oléagineuses utilisées dans la production des précédentes générations de biodiesel.

Les microalgues oléagineuses sont capables de se multiplier et de synthétiser des lipides et des sucres à partir du CO₂, permettant par exemple le recyclage de gaz produits par des usines ou des centrales thermiques (fig 1.5). Les algues peuvent également synthétiser des sucres fermentescibles par des microorganismes en bioéthanol. La biomasse algale totale ou résiduelle peut également être valorisée par une production de biogaz.

LES BIOCARBURANTS ISSUS DE MICRO-ALGUES LIPIDIQUES

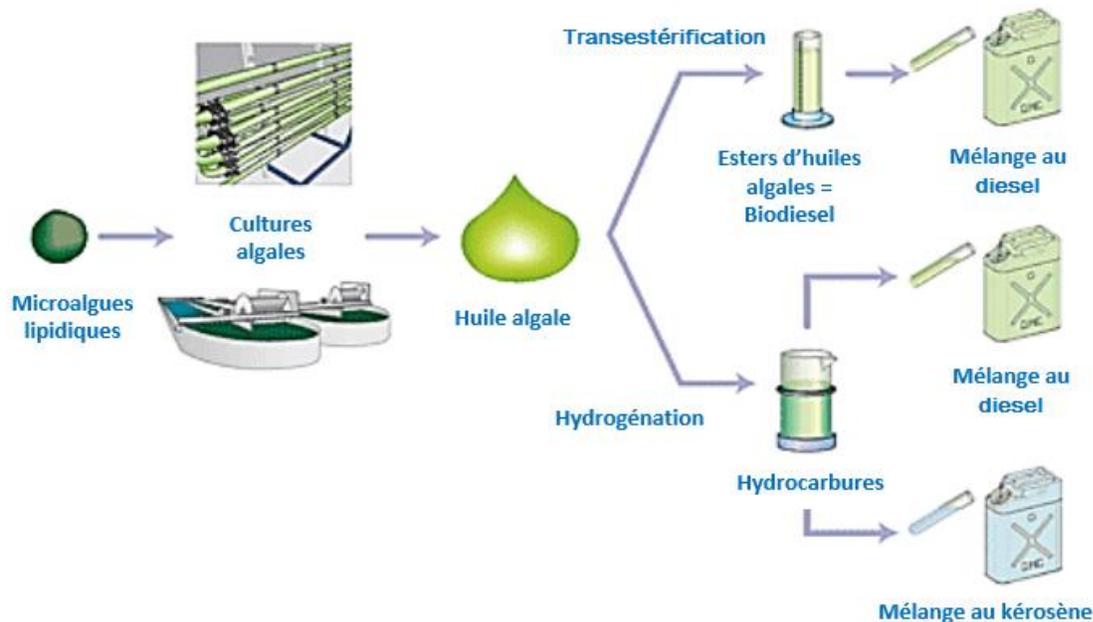


Figure 1. 6 Schéma représentant les étapes de la production des biocarburants à partir des microalgues

Source : IFP Énergies nouvelles, 2015.

Les levures oléagineuses sont capables d'utiliser des substrats divers, allant du substrat simple (glucose) aux plus complexes (déchets) comme source de carbone pour la synthèse des lipides tout en valorisant les déchets industriels.

En général, la production doit passer par quatre étapes:

- Sélection des microorganismes pour leur richesse en huile.
- Culture des algues dans de grands bassins en plein air ou dans des photobioréacteurs, et culture des levures dans des enceintes confinées et contrôlées ou fermenteurs.
- Récolte et extraction d'huile selon différentes méthodes (centrifugation, traitement au solvant, lyse thermique, etc.).

- Conversion de l'huile en biocarburant. Pour ce faire, il existe deux méthodes comme pour les huiles végétales classiques : la transestérification et l'hydrogénation.

À l'heure actuelle, la production des biocarburants de troisième génération n'est pas encore compétitive avec les carburants d'origine fossile sur le plan économique. Les procédés de culture et d'extraction des molécules d'intérêt coûtent trop cher et consomment trop d'énergie pour une production de carburant à l'échelle industrielle. Ces observations amènent alors les chercheurs et les industriels à reconsidérer les choix technologiques sur l'ensemble de la chaîne. Récemment, plusieurs études sont menées sur la maîtrise des paramètres de cultures de micro-organismes plus performants et sur l'optimisation de la production de lipides au laboratoire grâce à la combinaison d'approches de génie microbiologique et de génie génétique (Alaswad *et al.*, 2015, Beligon, 2016, Ochoa Estopier, 2012, Ortigueira *et al.*, 2015).

1.2 Microorganismes oléagineux

Le métabolisme lipidique est présent chez tous les microorganismes pour répondre aux besoins de la cellule en acides gras indispensables à la synthèse des lipides formant la structure cellulaire, et pour mettre en réserve de l'énergie. Un microorganisme est dit oléagineux lorsqu'il est capable d'accumuler 20 % ou plus de la masse sèche de la cellule en réserves lipidiques (Colin Ratledge, 2002, Colin Ratledge *et al.*, 1984). Les acides gras libres sont stockés chez les eucaryotes principalement sous forme de triacylglycérides (TAG) (Murphy, 1990).

Dans des conditions de concentration élevée en carbone, excédant les besoins de l'organisme, et limitée en nutriments, les lipides sont emmagasinés à l'intérieur de la cellule, dans des organites spécifiques, nommés corps lipidiques (Seraphim Papanikolaou *et al.*, 2011, Colin Ratledge *et al.*, 2002).

L'accumulation des lipides chez les microorganismes oléagineux dépend particulièrement du métabolisme convertissant l'atome de carbone en TAG (triacylglycérols) par une série de réactions biochimiques. Ce processus dépend de la présence de l'enzyme ACL (ATP citrate lyase) qui caractérise les microorganismes oléagineux (Beopoulos *et al.*, 2009b). Les microorganismes oléagineux peuvent accumuler jusqu'à 85% de lipides (Wynn *et al.*, 2005). Ce qui peut faire d'eux un marché prometteur pour la production du biodiesel. Ces microorganismes peuvent être aussi bien des bactéries que des champignons ou des algues et levures.

1.2.1 Bactéries oléagineuses

Les bactéries oléagineuses synthétisent généralement des lipides complexes et des polyesters comme les polyhydroxylanoates (Russell *et al.*, 1989, Shi *et al.*, 2011). Très peu sont les bactéries qui peuvent accumuler un taux élevé de lipides en particulier, les triacylglycérols. Des quantités remarquables en TAG ont été notées chez les Actinomycétales (*Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp.) et *Arthrobacter* AK19 (tableau 1.1). L'utilisation des bactéries non filamenteuses pour la production lipidique présente plusieurs avantages du fait que leur culture est facile à manipuler et leur taux de croissance est élevé (Shi *et al.*, 2011). Cependant, les bactéries produisent les lipides sur leur membrane externe, ce qui rend difficile leur extraction. Des impuretés indésirables à propriétés allergéniques sont également extraites (Steinbüchel *et al.*, 1998). La très faible vitesse d'accumulation des lipides rend leur utilisation difficile et incompatible pour une production industrielle (C Ratledge, 1994).

Tableau 1. 1 Accumulation lipidique chez certaines espèces de bactéries oléagineuses

Bactéries oléagineuses	Lipides (% masse sèche)	Références
Arthrobacter AK 19	78	(Wayman <i>et al.</i> , 1984)
Rhodococcus ruber	26	(HM Alvarez <i>et al.</i> , 2000)
Rhodococcus opacus	87	(Héctor M Alvarez <i>et al.</i> , 2002)
Nocardia corallina	23.9	(Hector M Alvarez <i>et al.</i> , 1997)

1.2.2 Algues oléagineuses

Il existe deux types de micro-algues, hétérotrophes et autotrophes. Les hétérotrophes utilisent le carbone organique comme source d'énergie. Les autotrophes utilisent la lumière comme source d'énergie, en plus du carbone organique (généralement le CO₂). Le taux de lipides accumulé chez les micro-algues varie, en général, entre 20 et 60% de la masse sèche de la cellule et peut atteindre 77% (tableau 1.2) comme chez *Schizochytrium* sp (Meng *et al.*, 2009). La composition la plus dominante des lipides accumulés est constituée d'acides gras insaturés comme les acides oléiques, linoléiques et palmitoléiques (Meng *et al.*, 2009).

Étant donné que la culture des microorganismes autotrophes nécessite des conditions climatiques adaptées et une grande surface pour satisfaire leur activité photosynthétique (Shi *et al.*, 2011), l'alternative de l'utilisation de ceux qui sont hétérotrophes demeure très intéressante et applicable dans les milieux nordiques (Cantin, 2010). Les principaux problèmes de la production de lipides d'origine algale résident dans le fait que les cultures restent exposées au risque de contamination bactérienne et que les procédés de production et d'extraction consomment trop d'énergie pour une valorisation industrielle (Feofilova *et al.*, 2010, Samorì *et al.*, 2010).

Tableau 1. 2 Accumulation lipidique chez certaines espèces de micro-algues

Micro-algues oléagineuses	Lipides (% masse sèche)	Références
Schyzochytrium sp.	50–77	(Chisti, 2007, Colin Ratledge, 2002)
Nitschia sp.	45-47	(Cadoret <i>et al.</i> , 2008, Sheehan <i>et al.</i> , 1998)
Chlorella protothecoides	55	(Xu <i>et al.</i> , 2006)
Botryococcus braunii	25-75	(Ruangsomboon, 2012)
Chlorella vulgaris	20-23	(Pruvost <i>et al.</i> , 2011)

1.2.3 Champignons oléagineux

Les champignons font également partie des microorganismes oléagineux, ils sont capables d'accumuler des taux de TAG pouvant atteindre 86 % de leur masse sèche (tableau 1.3) (Meng *et al.*, 2009). Soixante-quatre espèces lipogènes ont été recensées (C Ratledge, 1994) ; les lipides stockés sont riches en acides gras à chaînes longues et polyinsaturés. D'après Bruszewski, Fergus *et al.* 1972, la température joue un rôle important dans le contrôle du profil lipidique chez les champignons oléagineux, les espèces thermophiles synthétisent des acides gras plus saturés

que les espèces mésophiles. Cependant, la faible cinétique de croissance des champignons filamenteux et l'impact des filaments sur les transferts de masse et de chaleur au sein des réacteurs constituent les principaux problèmes pour l'exploitation industrielle de ces microorganismes.

Tableau 1. 3 Accumulation lipidique chez certaines espèces de champignons

Champignons oléagineux	Lipides (% masse sèche)	Références
Mortierella isabellina	86	(Meng <i>et al.</i> , 2009)
Cunninghamella japonica	60	(Colin Ratledge <i>et al.</i> , 2002)
Cunninghamella echinulata	48	(Sergeeva <i>et al.</i> , 2008)
Mortierella isabellina	50	(Seraphim Papanikolaou <i>et al.</i> , 2004)

1.2.4 Levures oléagineuses

Parmi la grande diversité d'espèces qu'offrent les levures, seules trente sur six cents espèces sont identifiées comme oléagineuses et elles appartiennent principalement aux genres *Lipomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Endomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* et *Yarrowia* (Colin Ratledge, 2002). Les levures oléagineuses peuvent accumuler en général entre 30 à 76 % de la masse sèche de la cellule en lipides (Cescut *et al.*, 2014, Chi *et al.*, 2011, Lomakin *et al.*, 2007). Ces lipides sont composés majoritairement de triacylglycérol et ce jusqu'à 90% (Rolph, 1989). Le profil lipidique est semblable à celui des huiles végétales, ce sont les acides palmitique (C16:0) et oléique (C18:1) qui prédominent chez les levures, à l'exception de *Yarrowia lipolytica* qui présente la particularité de synthétiser des triacylglycérols composés de plus que la moitié d'acide linoléique C16:0 = 11 %, C18:1 = 28 % et C18:2 = 51 % (Beopoulos *et al.*, 2009a, C Ratledge, 1994). Le tableau 1.4 illustre quelques taux d'accumulation de lipides en tant qu'une réserve d'énergie chez des espèces de levures ayant un remarquable potentiel de croissance.

Tableau 1. 4 Accumulation lipidique chez certaines espèces de levures

Levures oléagineuses	Lipides (% masse sèche)	Substrats	Références
<i>R. glutinis</i>	47.2	hydrolysats de rafles de maïs	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. curvatus</i>	60	Acétate	(Béligon <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. curvatus</i>	65 à 75,3	Acides gras	(Gong <i>et al.</i> , 2015)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	59	Glucose et xylose	(Hu <i>et al.</i> , 2011)
<i>R. toruloides</i> CBS14	76,1	Glucose	(Zhao X, 2008)
<i>Y. lipolytica</i>	30,1	Glycérol	(Poli <i>et al.</i> , 2014)
<i>Y. lipolytica</i>	43	Glycérol industriel	(S. Papanikolaou <i>et al.</i> , 2002a)
<i>Y. lipolytica</i>	58,5	Les bagasses de canne à sucre	(Tsigie <i>et al.</i> , 2011)
<i>Y. lipolytica</i>	40	Glucose	(Fontanille <i>et al.</i> , 2012)
<i>Y. lipolytica</i>	50	Glycérol brut	(Mathiazhakan <i>et al.</i> , 2016)

La grande vitesse de croissance des levures oléagineuses, leur capacité d'accumulation élevée en lipides ainsi que leur indépendance des conditions saisonnières représentent les principaux avantages de production de lipides levuriens par rapport aux autres microorganismes oléagineux (Dias *et al.*, 2015). Comparées aux micro-algues, les modes de culture des levures sont beaucoup moins compliqués et la technologie de fermentation des levures est bien maîtrisée du fait de son utilisation en industrie depuis des décennies.

La souche *Yarrowia lipolytica* accumule une quantité de lipides inférieure à certaines levures comme *R. toruloides* CBS14 et *C. curvatus* (tableau 1.4), mais son profil lipidique à forte valeur ajoutée en acides carboxyliques tels que l'acide gamma-linoléique (GLA) en fait une levure oléagineuse nettement plus intéressante dans le domaine de production de biocarburants. C'est la raison pour laquelle cette levure fera l'objet de la présente étude. Dans ce qui va suivre nous ferons le point sur les progrès réalisés dans sa taxonomie, sa physiologie, ses intérêts et applications potentiels.

1.2.5 *Yarrowia lipolytica* une levure oléagineuse d'intérêt

La levure *Y. lipolytica* est une des plus importantes levures non-conventionnelles et la plus largement étudiée. Elle peut être isolée de substrats riches en lipides et protéines (Sinigaglia *et al.*, 1994) comme les produits laitiers (Gerold Barth *et al.*, 1997, Guerzoni *et al.*, 1993, Suzzi *et al.*, 2001, Vasdinyei *et al.*, 2003) ou les saucisses (Gardini *et al.*, 2001). Elle peut également être retrouvée dans le sol, les eaux usées et les environnements pollués d'huiles (Gerold Barth *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 1999, Zinjarde *et al.*, 2002). Elle est classée par la Food and Drug Administration (FDA) comme un microorganisme GRAS (generally recognized as safe).

1.2.5.1 Historique

La recherche concernant cette levure a débuté dans les années quarante et s'est intensifiée au cours des dernières années. Diddens et Lodder furent les premiers chercheurs à avoir réalisé des études sur cette souche en 1942 (Poncet *et al.*, 1965) suivis par Peters et Nelson en 1948 et Skinner and Fletcher 1960 dans le but ultime d'étudier la particularité de cette souche à assimiler divers substrats. Par conséquent sa culture dans des fermenteurs à grande échelle a été largement maîtrisée.

Vers les années quatre-vingt dix, plusieurs groupes de chercheurs ont amorcé des études sur le métabolisme de *Y. lipolytica* à produire des métabolites tels que des protéines hétérologues (Dominguez *et al.*, 1998, Poncet *et al.*, 1965, Tanaka *et al.*, 1989) et sur le dimorphisme, puisque ce microorganisme peut se développer sous forme de cellules végétatives isolées ou de mycélium septé (Walt *et al.*, 1980) selon les conditions de milieu de croissance.

Ces dernières années, l'attention des chercheurs s'est tournée vers le séquençage du génome de cette levure et le développement de nouveaux outils génétiques (Casare' gola *et al.*, 1997, Casaregola *et al.*, 2000, Dujon *et al.*, 2004) permettant une optimisation de l'utilisation de ce microorganisme en biocatalyse et bioconversion.

1.2.5.2 Taxonomie

Yarrowia lipolytica est une levure oléagineuse dont la taxonomie est présentée sur la figure 1.6. Il s'agit d'un ascomycète qui était classifié initialement dans le genre *Candida* ensuite *Endomycopsis lipolytica* (Wickerham *et al.*, 1970) puis *Saccaromycopsis lipolytica* (Yarrow, 1972) pour devenir *Yarrowia lipolytica* en 1980 (Walt *et al.*, 1980).

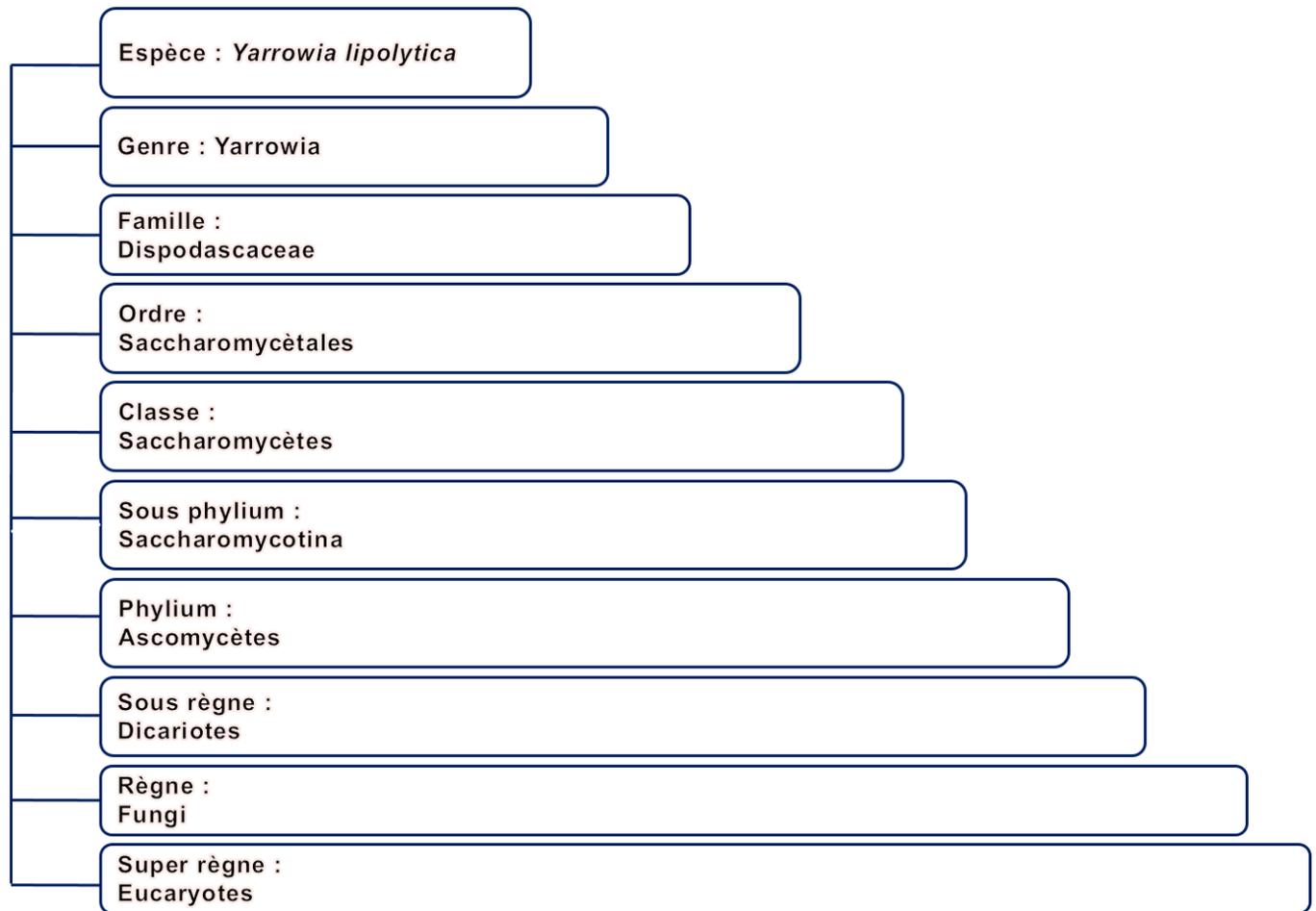


Figure 1. 7 Schéma décrivant la taxonomie de *Y. lipolytica*

1.2.5.3 Caractéristiques physiologiques

Yarrowia lipolytica est un microorganisme mésophile qui croît sous des températures allant de 10 à 30°C (Kreger-van Rij, 1984) et dans des conditions d'aérobic stricte. Elle est capable de se

multiplier sexuellement par formation d'ascospores (Wickerham *et al.*, 1970) ou asexuellement par bourgeonnement bipolaire (Kreger-van Rij, 1984).

Yarrowia lipolytica possède la particularité de produire plusieurs métabolites comme les lipides (Bankar *et al.*, 2009, Beopoulos *et al.*, 2009a, Seraphim Papanikolaou *et al.*, 2003), les protéines hétérologues (Destain *et al.*, 1997, Nicaud, 2012) ou de l'acide citrique (Moeller *et al.*, 2007, S Papanikolaou *et al.*, 2002c, Rymowicz *et al.*, 2007).

Ce microorganisme qui produit moins de lipides comparativement à d'autres levures oléagineuses acquiert une grande importance industrielle grâce aux nombreux avantages qu'il présente. Parmi ces avantages, nous citons sa nature unicellulaire qui facilite la maîtrise du procédé de production des lipides contrairement à d'autres microorganismes oléagineux (Séraphim Papanikolaou, 1998) et se distingue surtout par sa capacité à assimiler une variété de substrats. En plus, des substrats carbonés tels que les sucres sous forme de glucose, galactose ou mannitol (Kreger-van Rij, 1984), *Yarrowia lipolytica* peut assimiler les hydrocarbures (Kosaric *et al.*, 1979, Pareilleux, 1978), les lipides ou les acides gras (Seraphim Papanikolaou *et al.*, 2002b). Elle est également apte à assimiler l'éthanol si sa concentration ne dépasse pas les 30g/L (G Barth *et al.*, 1979). Le glycérol peut aussi être dégradé par *Y. lipolytica* (Levinson *et al.*, 2007, Seraphim Papanikolaou *et al.*, 2002b, Rywińska *et al.*, 2011). Concernant la dihydroxyacétone, le glycérol est d'abord oxydé en dihydroxyacétone par l'enzyme glycérol-déshydrogénase et phosphorylé par la suite en dihydroxyacétone phosphate par la dihydroxyacétone kinase (Wang *et al.*, 2001).

1.2.5.4 Diversité du potentiel de *Yarrowia lipolytica* et utilisation industrielle

Les améliorations génétiques de *Yarrowia lipolytica* et la connaissance approfondie de sa physiologie ont permis d'orienter son métabolisme, avec une grande performance, vers la synthèse de produits à divers applications :

- Production de protéines à grande échelle à partir d'alcanes (Gerold Barth *et al.*, 1997) ;
- Production de lipides (Bankar *et al.*, 2009, Beopoulos *et al.*, 2009a, Seraphim Papanikolaou *et al.*, 2003) ;
- Production de lipases catalysant plusieurs réactions d'intérêt industriel et pharmaceutique (Güvenç *et al.*, 2002, Osório *et al.*, 2001) ;
- Production d'arômes et d'additifs alimentaires (Güvenç *et al.*, 2002) ;
- Production d'acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide isocitrique, l'acide α -cetoglutarique et l'acide pyruvique (Kamzolova *et al.*, 2003, Rymowicz *et al.*, 2008) et

- La capacité de *Yarrowia lipolytica* à dégrader des substrats hydrophobes est utilisée pour la biorémediation des sols contaminés (Ferreira *et al.*, 2009).

1.3 Synthèse de lipides de réserve

Les levures oléagineuses synthétisent les lipides dans des conditions normales pour des raisons fonctionnelles. Tout d'abord, les lipides rentrent dans la structure de la cellule servant comme barrière entre l'intérieur de la cellule et son environnement extérieur. La deuxième fonction est catalytique; les lipides de la levure entourent des protéines qui catalysent les réactions des voies métaboliques ou de régulation (Daum *et al.*, 1998).

Ils représentent également une forme très dense de stockage d'énergie pour la cellule en Triacylglycérol (TAG) (Sorger *et al.*, 2003). Finalement, les lipides levuriens ont un rôle dans la modulation du transport des acides aminés dans la cellule (Calderbank *et al.*, 1984). Les acides gras sont les lipides les plus simples, qui composent de nombreux types de lipides plus complexes.

1.3.1 Biosynthèse des acides gras

La biosynthèse des acides gras chez les levures peut être divisée en deux principales étapes : la génération d'acétyl-CoA et la conversion d'Acetyl-CoA en acide gras. Le processus est schématisé dans la figure 1.7.

1.3.1.2 Phase mitochondriale : génération d'acétyl-CoA

L'acétyl-CoA est formé dans la mitochondrie. La glycolyse conduit à la production d'acide pyruvique dans le cytosol qui passe par la suite dans la mitochondrie, l'enzyme pyruvate déshydrogénase le transforme en acétylCoA (Fig. 1.7, réaction 1). Ce dernier peut soit entrer dans le cycle de Krebs en se condensant à l'oxaloacétate (Fig. 1.7, réaction 2) pour former du citrate (première réaction du cycle de Krebs catalysée par la *citrate synthase*), soit être transporté vers le cytosol pour servir de précurseur à la synthèse d'acide gras, seul le radical acétyle est transporté à travers la membrane interne par le système citrate (Fig. 1.7, réaction 3).

1.3.1.3 Phase cytosolique : conversion d'Acetyl-CoA

Sous l'action de l'ATP citrate lyase le citrate est clivé en acétyl-CoA et en oxaloacétate (Fig. 1.7, réaction 4). La malate déshydrogénase catalyse ensuite la décarboxylation de l'oxaloacétate en malate qui retourne à nouveau vers la mitochondrie (Fig. 1.7, réaction 5). Une fraction du malate est decarboxylée par l'enzyme malique en pyruvate pour régénérer le pyruvate (Fig. 1.7, réaction 6). La régénération du pyruvate permet la formation de NADPH,H⁺ nécessaires à la synthèse des acides gras.

La synthèse des acides gras nécessite la formation du malonyl-Coenzyme A par carboxylation d'Acetyl-CoA sous l'effet de l'Acetyl-CoA carboxylase (Fig. 1.7, réaction 7). La formation d'une chaîne d'acide gras résulte de la condensation d'un malonyl-Coenzyme A, donneur de deux carbones, sur un résidu acyl préexistant (Colin Ratledge, 2002, Colin Ratledge *et al.*, 2002). Cette réaction est catalysée par un complexe multienzymatique (Fig. 1.7, réaction 8), l'acide gras synthétase (ou Fatty acid synthase soit FAS). Chez les eucaryotes comme *Y. lipolytica*, l'élongation de la chaîne carbonée est réalisée dans les mitochondries et aussi dans le réticulum endoplasmique. L'élongation s'arrête en général après 7 ou 8 cycles. Ainsi, la majorité des acides gras synthétisés sont le palmitate (16 atomes de carbone) et le stéarate (18 atomes de carbone). Ces acides gras sont ensuite modifiés par l'action des désaturases. Les levures disposent d'enzymes spécifiques de désaturation permettant la production d'acides gras mono et polyinsaturés.

Chez les levures oléagineuses, les acides gras produits en majeure quantité sont les acides oléique (18:1), linoléique (18:2), palmitique (16:0), ou palmitoléique (16:1) (Colin Ratledge, 2004). L'élongation de la chaîne carbonée au-delà de 18 carbones se déroule dans le réticulum endoplasmique et aussi dans les mitochondries. Ainsi les acides gras sont synthétisés sous forme d'acyl-CoA. En forme libre, les acides gras sont assez rares dans la cellule, car ils peuvent avoir des effets toxiques sur les membranes. Ils sont principalement amassés sous forme de triglycérides (Fig. 1.7, réaction 9).

1.3.2 Biosynthèse des triglycérides

Chez les levures oléagineuses, le stockage des acides gras se fait principalement sous forme de triacylglycerols (TAG), ils représentent 90% des lipides emmagasinés (Rolph et al. 1990). Leur synthèse comporte trois principales étapes : formation de l'acide phosphatidique,

déphosphorylation de ce dernier en diglycérol et estérification de la dernière fonction alcool du glycérol (Fig. 1.8).

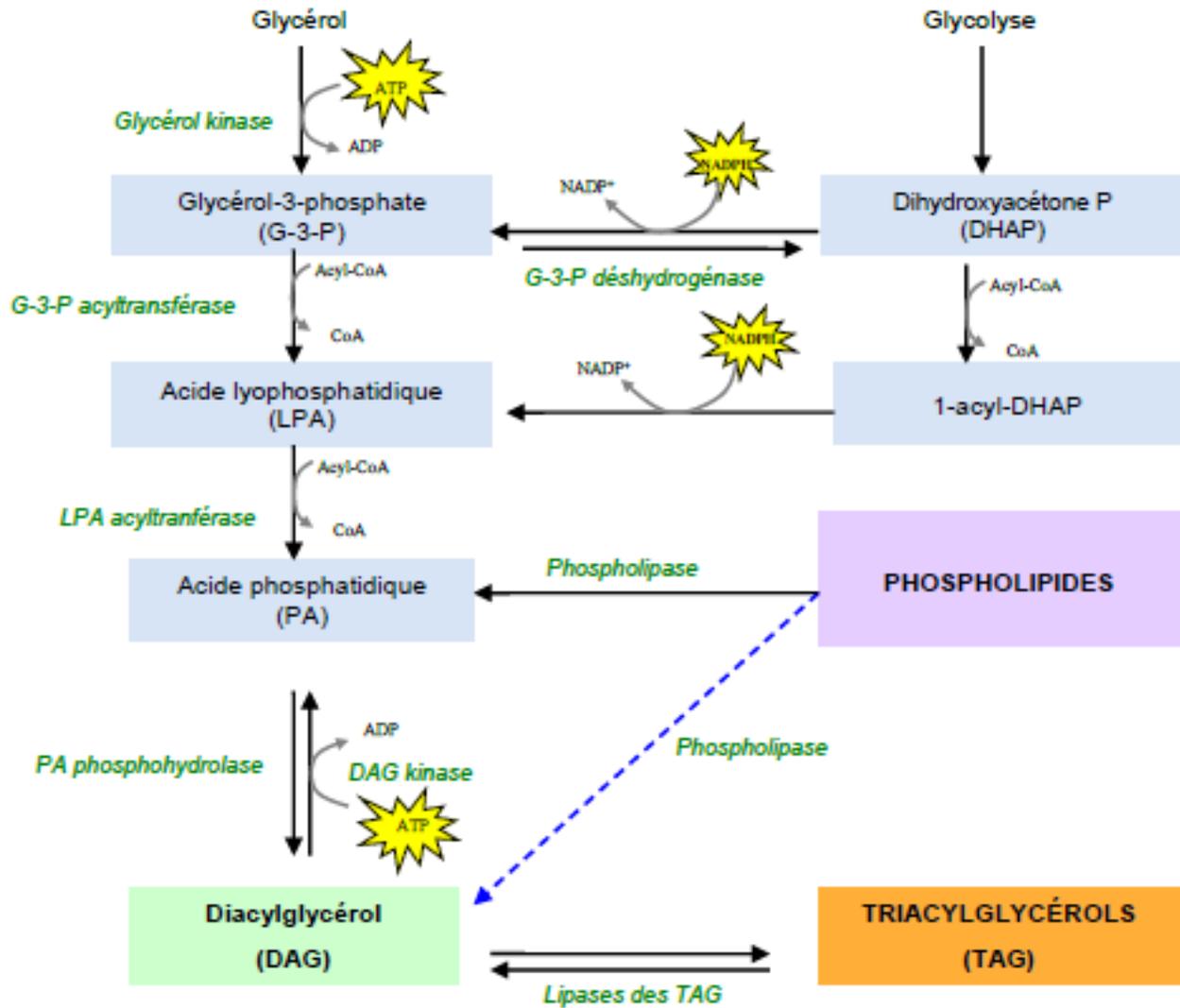


Figure 1. 9 Synthèse des triacylglycérols

Source : d'après (Sorger *et al.*, 2003) depuis (Ochoa Estopier, 2012)

1.3.2.1 Formation de l'acide phosphatidique

La synthèse de l'acide phosphatidique nécessite deux acylCoA qui réagissent sur le glycérol-3-phosphate (Fig. 1.9). Le glycérol-3-phosphate est formé par réduction de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) produite au cours de la glycolyse ou par phosphorylation du glycérol sous

l'effet du glycérol kinase (Fig. 1.8). Les fonctions alcool primaire et secondaire du glycérol-3-phosphate sont estérifiées grâce à l'action d'acyltransférases spécifiques (Colin Ratledge, 1987).

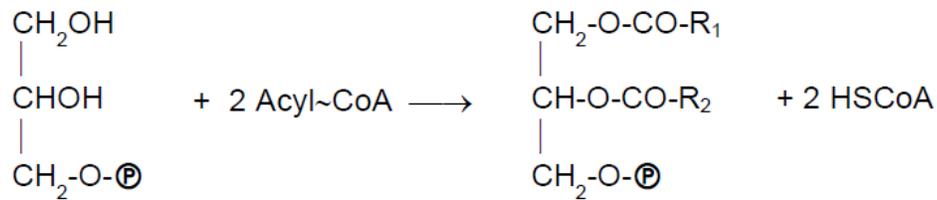


Figure 1. 10 Réaction de la formation de l'acide phosphatidique (R1 et R2 représentent des acides gras)

1.3.2.2 Formation du diacylglycérol ou diglycéride

Le diacylglycérol (DAG) est le résultat du départ du groupement phosphate de l'acide phosphatidique. La réaction est catalysée par une hydrolase appelée acide phosphatidique phosphohydrolase.

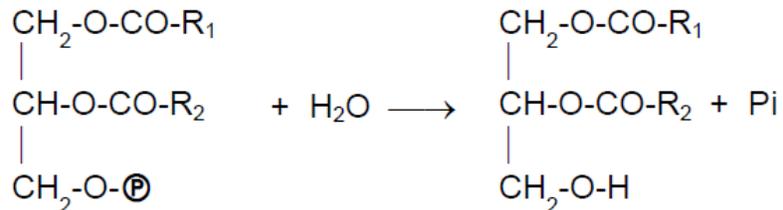


Figure 1. 11 Réaction de la formation du diacylglycérol

Les diacylglycérols peuvent être également formés par la dégradation des phospholipides catalysés par une phospholipase et par la désacylation des triacylglycerols (Fig. 1.8) catalysés par les lipases des triacylgly-cérols (Athenstaedt *et al.*, 2006, Coleman *et al.*, 2004, Sorger *et al.*, 2003).

1.3.2.3 Formation du triacylglycérol ou triglycéride

Le dernier groupement acyl sur le diacylglycérol est estérifié pour former le triacylglycérol par une diglycéride acyltransférase. Les triacylglycérols sont accumulés dans des organelles spécifiques, à l'intérieur de la cellule, appelées corps lipidiques (Lands, 1958).

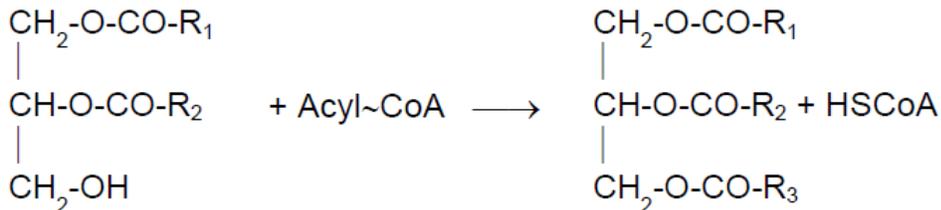


Figure 1.11 Réaction de la formation du triacylglycérol (R1, R2 et R3 représentent des acides gras)

1.4 Mécanisme de déclenchement de l'accumulation lipidique chez les microorganismes oléagineux

1.4.1 Déclenchement de l'accumulation lipidique

Chez les microorganismes oléagineux, une limitation nutritionnelle associée à un apport suffisant en carbone induit le ralentissement de la croissance des cellules (Pan *et al.*, 1986) et le déclenchement de l'accumulation lipidique (Gill *et al.*, 1977). Les nutriments qui stimulent l'accumulation lipidique peuvent être soit l'azote, le phosphore, le magnésium, le zinc ou le fer. L'azote est le plus utilisé pour cette fin en raison des meilleurs rendements obtenus par les chercheurs (Gill *et al.*, 1977, YAMAUCHI *et al.*, 1983). Du fait que l'azote représente un constituant fondamental des protéines et acides nucléiques, sa carence entraîne un arrêt de la multiplication cellulaire (Pan *et al.*, 1986). Plus précisément, pour la production de lipides (SCO), il faut imposer une limitation en azote en jouant sur le rapport C/N avec une forte concentration en carbone (C) et une faible concentration en azote (N) et pour la production d'acide citrique, il faut imposer uniquement une carence en azote.

1.4.2 Étapes du mécanisme d'induction de l'accumulation lipidique

Plusieurs étapes rentrent dans le processus de l'accumulation des lipides chez les microorganismes oléagineux allant de l'assimilation de la source du carbone, glycérol, jusqu'à la formation des triacylglycérols :

1.4.2.1 Assimilation du glycérol :

Le glycérol est transporté à l'intérieur de la cellule par système d'affinité d  à l'équilibre osmotique. Il est par la suite assimilé par soit phosphorylation en Glycérol 3-phosphate en présence de la glycérol kinase ou oxydé en dihydroxyacétone par la glycérol dihydrog nase. Dans les deux cas, le produit final est le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP);

La DHAP est facilement isomérisée en G3P par la triose-phosphate isomérase. Le G3P se transforme en pyruvate afin d'entamer le cycle de Krebs.

1.4.2.2 Augmentation de l'activité de l'AMP désaminase

La limitation en azote provoque une diminution du taux de croissance des cellules. Pour atténuer la déficience d'azote nécessaire à la synthèse des protéines et des acides nucléiques, la cellule le récupère sous forme d'ion ammonium (Fig. 1.12) issu du catabolisme de l'AMP (adénosine monophosphate). L'enzyme catalysant cette réaction est l'AMP désaminase (Christopher Thomas Evans *et al.*, 1985) :



1.4.2.3 Inhibition de l'enzyme isocitrate déshydrogénase (ICDH)

L'AMP intracellulaire étant activateur de l'isocitrate déshydrogénase (ICDH), enzyme de cycle de Krebs qui convertit l'isocitrate en α -cétoglutarate (Colin Ratledge, 1987), une diminution drastique de la concentration d'AMP va bloquer le cycle de Krebs au niveau de l'isocitrate (BOTHAM *et al.*, 1979).

1.4.2.4  quilibre entre l'isocitrate et le citrate

L'isocitrate va donc s'accumuler dans la mitochondrie et créer un équilibre avec le citrate sous l'action de l'enzyme aconitase (Christopher T EVANS *et al.*, 1983) :



1.4.2.5 Efflux du citrate de la mitochondrie vers le cytosol

La concentration du citrate augmente dans le milieu intra-mitochondriale, et le citrate va donc se diriger vers le cytoplasme via le complexe citrate/malate (Christopher T EVANS *et al.*, 1983).

1.4.2.6 Surproduction d'acétyl-CoA

Le citrate est par la suite clivé en oxaloacétate et en *acétylCoA* sous l'effet de l'enzyme ATP citrate lyase (BOULTON *et al.*, 1981). Cette enzyme est activée par la présence d'ions NH_4^+ (Shashi *et al.*, 1990) ; elle est présente chez tous les microorganismes oléagineux :



La conversion d'une partie d'oxaloacétate produit en malate par la malate déshydrogénase assure le maintien du système d'efflux du citrate. Et la décarboxylation d'une autre fraction par l'enzyme malique fournit une ressource suffisante de NADPH, H^+ nécessaires à la synthèse des acides gras.

1.4.2.7 Conversion d'acétyl-CoA

L'acétyl-CoA disponible dans le cytosol sera utilisé comme précurseur pour la biosynthèse des acides gras et la mise en place du métabolisme d'accumulation des lipides selon les étapes décrites au chapitre 1.1.5.2 pour aboutir à la synthèse des triglycérides.

Les triacylglycérols sont libérés sous forme de gouttelettes lipidiques qui fusionnent et s'accumulent dans des organelles spécifiques, à l'intérieur de la cellule, nommées corps lipidiques. Ces structures ne sont pas de simples caissons de stockage, mais elles contribuent à la préservation de l'homéostasie lipidique (Athenstaedt *et al.*, 2006).

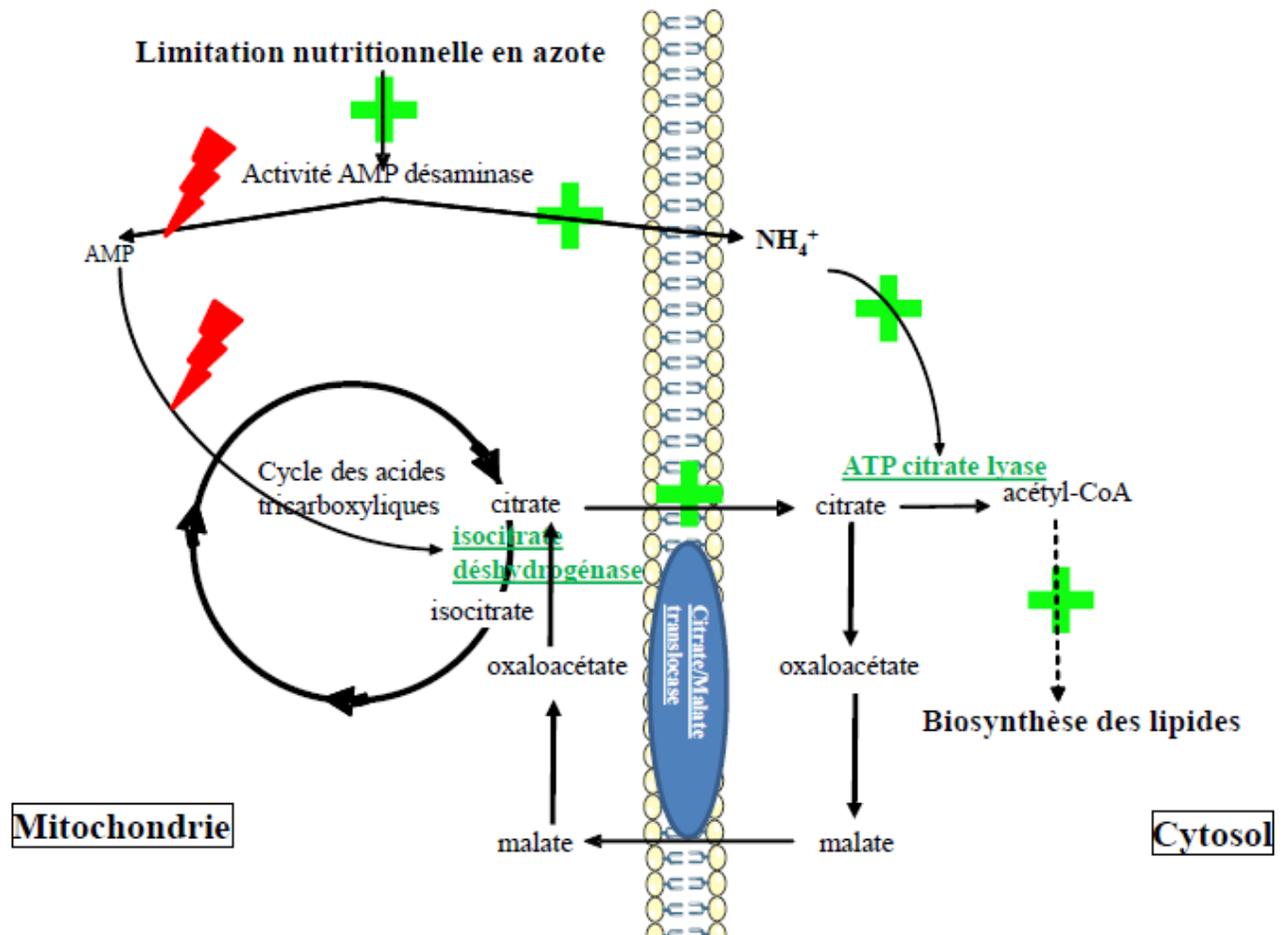


Figure 1. 12 Schéma du Mécanisme d'induction de l'accumulation de lipides chez les levures oléagineuses

Source : (Babau, 2015)

Ce microorganisme possède non seulement la capacité d'assimiler les lipides mais aussi de les synthétiser en triacylglycérol (TAG) dans des conditions de limitation nutritionnelle (Portelli, 2011).

1.5 Facteurs influençant l'accumulation lipidique

1.5.1 Oxygène

Des chercheurs (Choi *et al.*, 1982) ont montré que la quantité d'oxygène dissous a une influence sur les concentrations de biomasse et de lipides produites. Ils ont démontré qu'une augmentation de la concentration d'oxygène entre 45 et 234 μM a marqué une hausse de la teneur en lipides chez *Rhodotorula gracilis* NRRL Y-1091 en culture continue sous l'effet de la limitation d'azote.

Plusieurs recherches ont été également menées sur l'effet de l'oxygène sur la production de l'acide citrique (CA). Des chercheurs (Morgunov *et al.*, 2013) ont rapporté que l'augmentation de la concentration d'oxygène chez *Yarrowia lipolytica* de 20% à 60% augmente le taux spécifique de synthèse de l'acide citrique de 25 à 50 $\text{mg de cellules}^{-1} \text{ h}^{-1}$. De plus, une augmentation supplémentaire de la valeur de la saturation en oxygène jusqu'à 80% entraîne une diminution de 2,8 fois dans la production de l'acide citrique.

Les chercheurs (Rane *et al.*, 1993) ont démontré qu'au cours de la production de l'acide citrique chez *Candida lipolytica*, le taux d'assimilation de l'oxygène spécifique est significativement plus faible en comparaison à la phase de croissance des cellules. Le taux d'assimilation de l'oxygène spécifique augmente au cours des deux premières heures de la phase de production, ceci est dû à la croissance cellulaire et à l'augmentation des activités métaboliques nécessitant de l'oxygène. Quand la teneur en azote devient faible et la croissance cellulaire est ralentie ; le taux de consommation de l'oxygène diminue le long du reste de la phase de production et d'accumulation de l'acide citrique.

D'autres chercheurs (Kamzolova *et al.*, 2003) ont rapporté que l'ajout du fer peut améliorer la production de l'acide citrique dans des conditions de concentration en oxygène dissous relativement faible (<20 % de la saturation) chez *Y. lipolytica* N1.

La synthèse des acides gras, étant liée à celle de l'acide citrique, est aussi affectée par la saturation de l'oxygène dissous dans le milieu de culture. L'appauvrissement en oxygène a alors un effet négatif sur la production en lipides chez les levures oléagineuses.

1.5.2 Température

En cinétique chimique, la loi d'Arrhenius permet de décrire la vitesse d'une réaction chimique en fonction de la température. La température est alors un facteur influençant la vitesse de la réaction et par conséquent sa productivité en lipides.

La loi d'Arrhenius est la suivante : $k = A.e^{-\left(\frac{E_a}{RT}\right)}$

Avec :

- k : coefficient de vitesse (ou constante de vitesse) ;
- A : constante indépendante de la température
- R : constante des gaz parfaits (8,314 J.K⁻¹mol⁻¹)
- T : température (°K)
- E_a : énergie d'activation (J.mol⁻¹)

La température est un facteur qui joue un rôle crucial sur la quantité et la qualité des lipides produits (Hansson *et al.*, 1986). Des chercheurs (Ferrante *et al.*, 1983) ont mené une étude sur l'influence de l'activité mésophile dans la production des lipides chez *Candida lipolytica*. Ils évoquent une augmentation du pourcentage de la production des acides oléique et linoléique de 25% (g/g) de 25°C à 10°C (Ferrante *et al.*, 1983). D'autre part, (Séraphim Papanikolaou, 1998) a réalisé des recherches sur l'effet de la température du milieu de culture chez *Y. lipolytica*. La culture du microorganisme sur différentes températures allant de 19°C à 39°C montre que la température permettant d'obtenir un taux de lipide maximal est de 28°C.

1.5.3 pH

Un changement de la valeur du pH dans le milieu de culture influence les fonctions cellulaires. Le pH optimal de la culture change d'un microorganisme à un autre. Moeller (2007) a prouvé qu'une légère altération de la valeur du pH peut changer le taux de croissance du microorganisme. Chez *Yarrowia lipolytica*, la croissance peut avoir lieu dans un pH=4, elle s'améliore quand le pH atteint 6,5 et s'inhibe à un pH=8 (Moeller *et al.*, 2007).

1.5.4 Nature du substrat

Yarrowia lipolytica a la particularité de croître sur différents substrats. Elle utilise des substrats lipidiques pour la croissance cellulaire et aussi en tant que substance de réserves (Aggelis *et al.*, 1997, Bati *et al.*, 1984). Parmi les substrats lipidiques utilisés, on trouve la stéarine qui permet d'avoir un taux de lipides de 0,44 g/g et où les cellules tendent à adopter une morphologie filamenteuse (Séraphim Papanikolaou, 1998). Les levures ont la capacité de se multiplier dans des substrats osidiques comme le glucose, le lactose, le lactosérum, les mélasses, des jus de fruits (Cescut, 2009, Davies *et al.*, 1990, Hamid *et al.*, 1995, Hassan *et al.*, 1994, Ykema *et al.*,

1989). Le pourcentage de lipides accumulés chez *Yarrowia lipolytica* dans le glucose a atteint 50% en mode fed batch (Cescut, 2009). En plus des milieux lipidiques et osidiques, les levures prolifèrent dans les milieux alcooliques comme le glycérol ou l'éthanol. Granger en 1992, a comparé la conversion du carbone en lipides par *Rhodotorula glutinis* dans le glucose et l'éthanol. Le rendement obtenu sur l'éthanol est de 1,6 Cmole.Cmole⁻¹ alors qu'il est de 0,7 Cmole.Cmole⁻¹ sur le glucose. Ce rendement reste meilleur tant que la concentration de l'éthanol varie entre 2 et 5 g/L (Granger, 1992). Sur le glycérol, le rendement des lipides a atteint 63% en culture continue chez *Yarrowia lipolytica* (Seraphim Papanikolaou *et al.*, 2002b). Finalement, et selon Papanikolaou, (1998), *Y. lipolytica* montre une préférence d'assimilation du glycérol parmi des mélanges de glycérol, glucose, oléate et stéarine.

2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

L'objectif ultime de ce projet d'étude consiste à optimiser le taux d'oxygénation nécessaire à la production des lipides à partir de la levure *Yarrowia lipolytica* cultivée sur le glycérol brut comme substrat pour la production du biodiesel.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Réaliser des fermentations de la levure *Yarrowia Lipolytica* dans 40g/L de glycérol et avec un ratio carbone azote C/N= 75, pH= 6,5 et une température de 28°C pendant 72h tout en variant le taux d'oxygène d'une fermentation à une autre (20, 30, 40, 50 et 60%) ;
- Repérer le taux d'oxygène optimal pour une production maximale des lipides.

Il existe un taux de saturation en oxygène pour lequel la levure *Yarrowia lipolytica* SKY7 atteint un taux de production maximale de lipides, la présente étude permettra de vérifier cette hypothèse.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Démarche méthodologique

Pour parvenir à atteindre mon objectif, la méthodologie suivante a été adoptée :

- Caractériser le glycérol brut utilisé (quantité de méthanol, densité, pH, savon, etc.) ;
- Réaliser la cinétique de croissance de *Yarrowia Lipolytica* dans le but de choisir le temps de son inoculation optimale pour effectuer les fermentations ;
- Réaliser cinq fermentations avec la variation du taux d'oxygène à 20%, 30%, 40%, 50% et 60% ;
- Dresser le bilan des résultats de la variation du taux d'oxygène et
- Déterminer le taux optimal d'oxygène dissous nécessaire à une production maximale des lipides dans les conditions fixées au début de l'étude.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Conditions de culture

3.2.1.1 Souche utilisée

La souche utilisée tout au long de ce travail est une culture pure de *Y. lipolytica* SKY7 isolée à partir des eaux usées de l'industrie de pâtes et papiers du Québec. Elle est cultivée dans des plaques de gélose (Yeast extract, Peptone, Dextrose) avec 10g/L d'extrait de levure, 10g/L de peptone et 20g/L de dextrose et 20g/L d'agar à 28°C pendant 24h. *Y. lipolytica* SKY7 est, par la suite, stockée à 4°C.

3.2.1.2 Préparation du milieu de culture et de l'inoculum

Une boucle complète de colonie pure est transférée de manière aseptique dans une solution de 20 ml de YPD, le tout est incubé à 28°C dans un incubateur agitateur (Infors HT multitron pro, Canada) à 180 tours par minute pendant 18 heures. Après 18h de croissance, l'inoculum est transféré dans 200 ml de milieu de culture pour une seconde pré-culture encore incubé à 28°C dans un incubateur agitateur à 180 tours par minute pendant 18 heures. L'inoculum représente 5% du milieu à fermenter. Le milieu de culture est constitué de glycérol brut (GB) stérilisé et de nutriments cités dans le (tableau 3.1) à 121°C pendant 15 minutes. Le but de la stérilisation consiste d'une part à maîtriser les micro-organismes introduits dans le milieu d'étude et à éviter la contamination du milieu extérieur. D'autre part, elle permet une décomposition de la source

carbonée facilitant son assimilation par le microorganisme. La proportion du milieu synthétique (MS) ajouté est de 90/10 volume par volume GB/MS.

Tableau 3. 1 Composition du milieu de culture

Composant	Concentration (g/L)
Glycérol brut	40
Extrait de levure	1
Phosphate de potassium monobasique KH₂PO₄	2,7
Heptahydrate de sulfate de magnésium MgSO₄ 7H₂O	0,5
Hydrogénophosphate de sodium Na₂HPO₄	1
Sulfate d'ammonium (NH₄)₂ SO₄	0,5

Le glycérol brut utilisé provient d'une industrie de biodiesel dans la région du Québec, Canada. Les résultats de l'analyse de sa composition sont résumés dans le tableau 3.2 :

Tableau 3. 2 Caractéristiques du glycérol brut utilisé

Caractéristique	Valeur
Densité	0,906g/mL
pH	9,98
Glycérol	148,28g/L
Savon et FFA	35g/L
Méthanol	41,86% w/w

Les nutriments (tableau 3.1) ont été ajoutés dans le but de créer de meilleures conditions pour la croissance des cellules de *Yarrowia lipolytica*. L'extrait de levure qui se compose de cellules de levure sèche déshydratées et lysées apporte au milieu une source d'oligoéléments, d'acides aminés, de vitamines et d'azote. Mais la principale source d'azote reste le sulfate d'ammonium. Le ratio C/N a été ajusté en se basant sur le carbone disponible dans le glycérol brut et l'azote provenant du nutriment ajouté, le sulfate d'ammonium.

Les conditions de culture pendant les fermentations réalisées au cours de cette étude sont présentées sur le tableau 3.3:

Tableau 3. 3 Conditions de fermentations

Conditions de fermentations	Valeurs
Température	28°C
Agitation	795 à 815 rpm (tour par minute)
pH	6,5
Saturation en O₂	20%, 30%, 40%, 50% et 60%
Taux d'aération	0,04 à 0,4 volume/volume/minute (vvm)
Temps de fermentation	72h

Une fois le milieu de culture stérilisé refroidi à une température de 28°C, on procède à l'inoculation dans des conditions aseptiques. La fermentation est maintenue jusqu'à 72h. La stabilisation des différentes saturations en oxygène dans le milieu de culture est assurée par la vitesse d'agitation et le taux d'aération.

3.2.1.3 Description du bioréacteur

Le bioréacteur utilisé est le fermenteur INFORS AG (LABFORS 3, INFORS AG, Switzerland) de 7,5L avec un volume de travail de 5L. Il est équipé d'un système de commande logique programmable (PLC) pour l'oxygène dissous (DO), le pH, la température, l'anti-mousse, la vitesse de la turbine et le débit d'aération. Le logiciel (IRIS, Intellution, États-Unis) permet le contrôle automatique de consigne et de l'intégration de tous les paramètres via PLC.

L'électrode du pH est calibrée en utilisant des tampons de pH 4,0 et 7,0. Trompé dans la solution de pH=4 ou pH=7, nous rentrons à chaque fois la valeur sur le pH-mètre afin de l'étalonner. La sonde de l'oxygène est calibrée à zéro en utilisant du sulfite de sodium et à 100% en la trompant dans une solution d'eau saturée d'air. Le fermenteur a été rempli par le milieu de culture du glycérol brut et pré-stérilisé avant l'inoculation pour maintenir la stérilité.

La figure 3.1 montre le dispositif expérimental utilisé pour les fermentations :

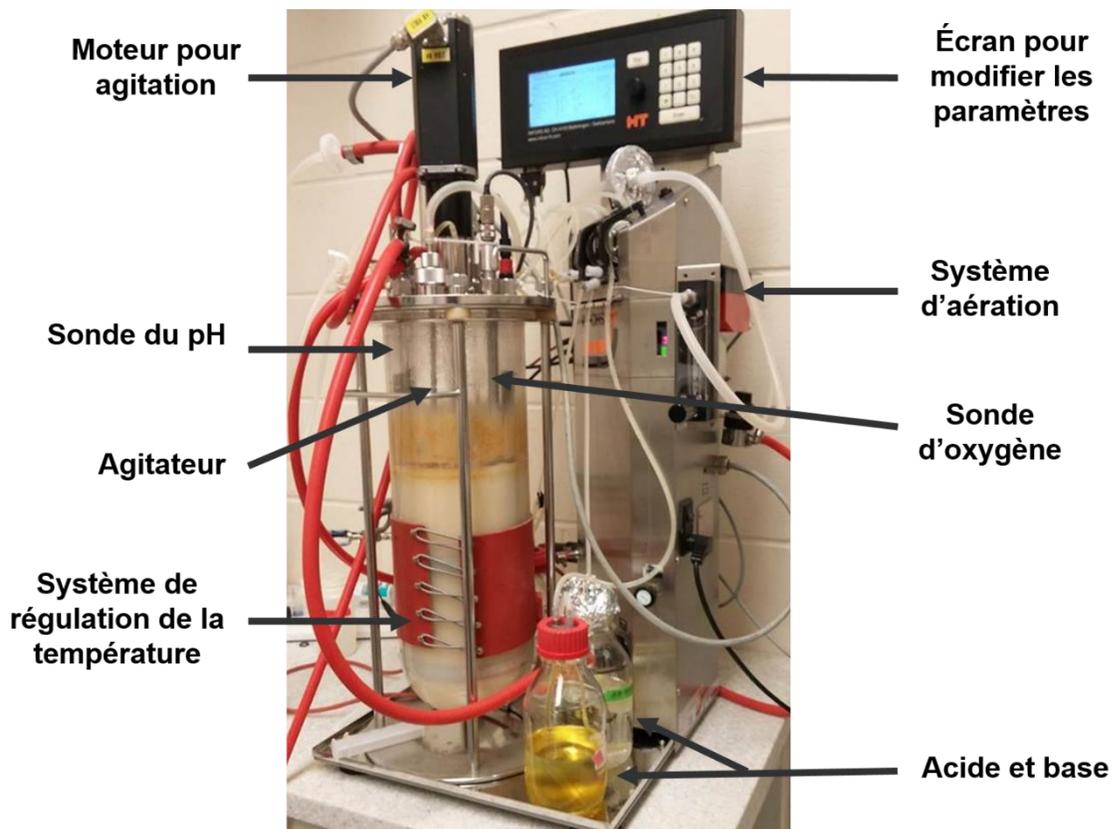


Figure 3. 1 Description du bioréacteur utilisé lors des expériences

3.2.2 Méthodes analytiques

Des échantillons de bouillon fermenté ont été prélevés après chaque intervalle de 6h pendant 72h pour analyser la quantité de la biomasse, la concentration des lipides, le glycérol résiduel et le savon.

3.2.2.1 Quantification de la biomasse

Un échantillon de 25 mL du bouillon de fermentation est utilisé afin de quantifier la biomasse. L'échantillon est centrifugé avec une vitesse de 4000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est récupéré après la centrifugation et transféré dans une coupelle en aluminium ; dont le poids est déterminé au préalable. La coupelle contenant le culot est mise dans le four à une température de 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La concentration de la biomasse est obtenue ainsi :

Concentration de la biomasse :

$$(\text{Poids de la coupelle après séchage} - \text{Poids de la coupelle vide}) \times 40$$

3.2.2.2 Quantification des lipides

Afin de calculer la concentration des lipides présents dans 25 mL du bouillon de fermentation, l'échantillon est centrifugé à 4000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est récupéré après le deuxième lavage avec l'eau déminéralisée et mixé avec 15mL d'une solution de chloroforme méthanol (2 :1) et des billes de broyage en zirconium (0,7mm) selon la méthode d'extraction de Folch (Folch *et al.*, 1957). Une agitation pendant 12h permet de briser les cellules et de libérer ainsi le lipide qui se dissout dans la solution. L'échantillon est par la suite filtré sur un filtre Wattman dont les pores sont de 0,45µm de diamètre. Et afin de récupérer tous les lipides, les cellules sont encore récupérées pour une deuxième agitation avec une solution de 15 mL de chloroforme méthanol (1:1) pendant 3 heures. Le filtrat est ensuite récupéré par centrifugation et transféré dans des tubes en verre préalablement pesés. Les tubes sont mis dans le four à 70°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La concentration des lipides se calcule comme suit :

Concentration des lipides :

$$(\text{Poids du tube après séchage} - \text{Poids du tube vide}) \times 40$$

3.2.2.3 Quantification du glycérol résiduel

Une méthode chimique est utilisée pour l'estimation de la quantité du glycérol se trouvant dans le bouillon de fermentation (Bondioli *et al.*, 2005). L'échantillon du surnageant résultant des centrifugations est d'abord traité avec le periodate de sodium qui réagit avec le glycérol pour générer du formaldéhyde. En ajoutant l'acétylacétone au formaldéhyde, un complexe jaune, 5-diacétyl-1,4-dihydrolutidine se forme. Ce composé jaune présente un pic d'absorption maximal à

410 nm. La concentration est alors mesurée par le spectrophotomètre UV-visible (Cary 100 bio UV-Vis spectrophotometer).

3.2.2.4 Quantification du savon et FFA résiduels

Dix millilitres de bouillon de fermentation est mélangé à l'éther de pétrole et centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. Une séparation de phases permet de distinguer le savon de l'éther de pétrole après centrifugation et le savon est transféré dans des coupelles en aluminium préalablement pesées. Les coupelles sont gardées sous la hotte jusqu'à l'évaporation de l'éther de pétrole et mises par la suite dans le four pendant 6 heures à 60°C. La concentration du savon dans l'échantillon est obtenue ainsi :

(Poids de la coupelle avec l'échantillon après séchage – Poids de la coupelle seule) x 100

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 ANALYSE DES RÉSULTATS

4.1.1 Analyse des courbes des conditions de fermentations

Les figures 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 et 4.5 représentent les graphes de variation des conditions de la fermentation pour des teneurs en oxygène respectivement de 20%, 30%, 40%, 50% et 60% durant les 72h de fermentation.

La teneur en oxygène au début de la fermentation est de 100% en raison de la calibration de la sonde d'oxygène, le milieu est alors saturé en oxygène. Cette concentration commence à diminuer pendant les premières 6h de la fermentation jusqu'à l'obtention de la valeur désirée, cette valeur demeure stable pendant environ 24h et augmente par la suite. L'agitation fluctue selon la valeur de l'oxygène dissous, elle augmente quand la concentration en oxygène diminue.

La température, régulée par le couvert chauffant du bioréacteur reste stable (28°C) pendant les 72h de la fermentation afin de créer un environnement favorable à la prolifération de *Y. lipolytica*. L'injection de l'acide ou la base se fait automatiquement dans le but de garder le pH à 6,5.

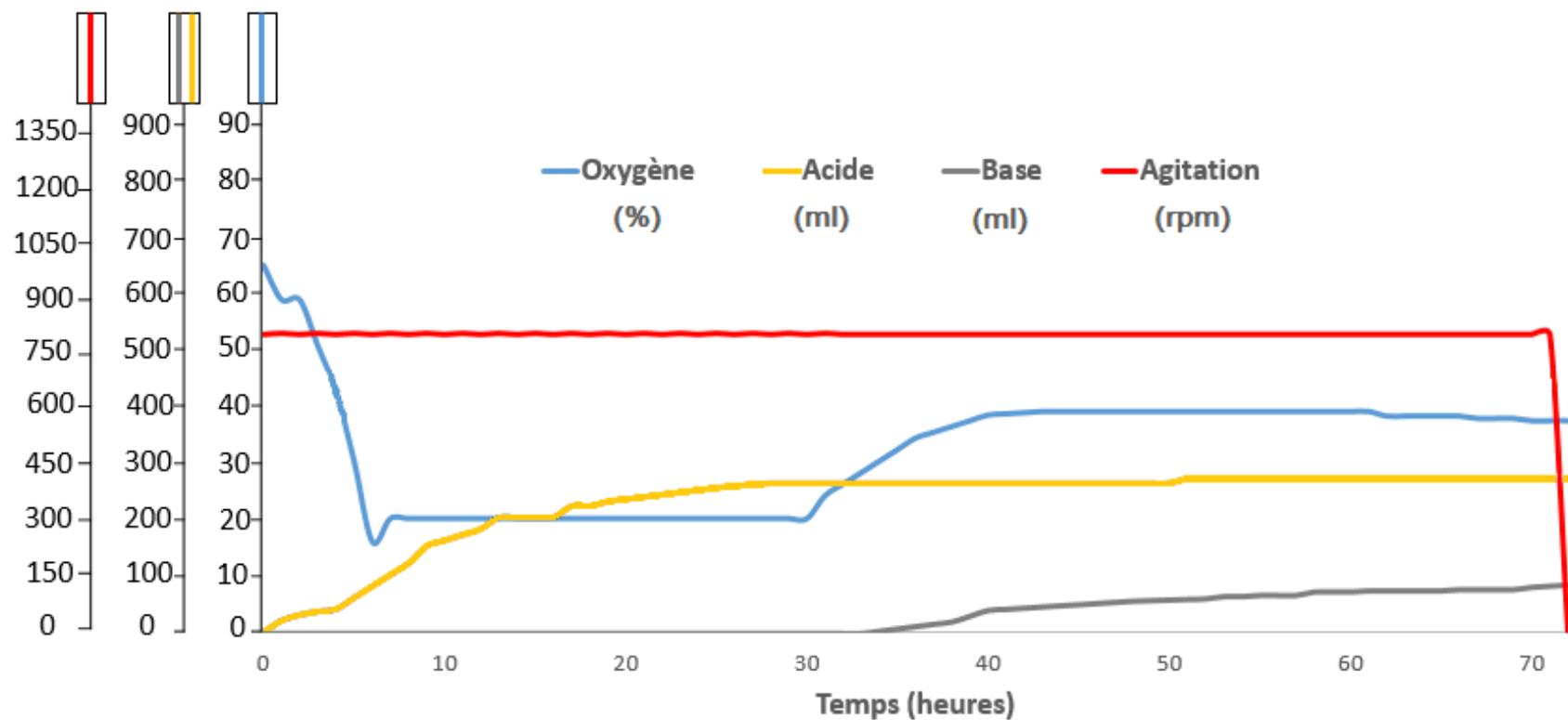


Figure 4. 1 Courbe de la variation des conditions de la fermentation avec une teneur en oxygène de 20%

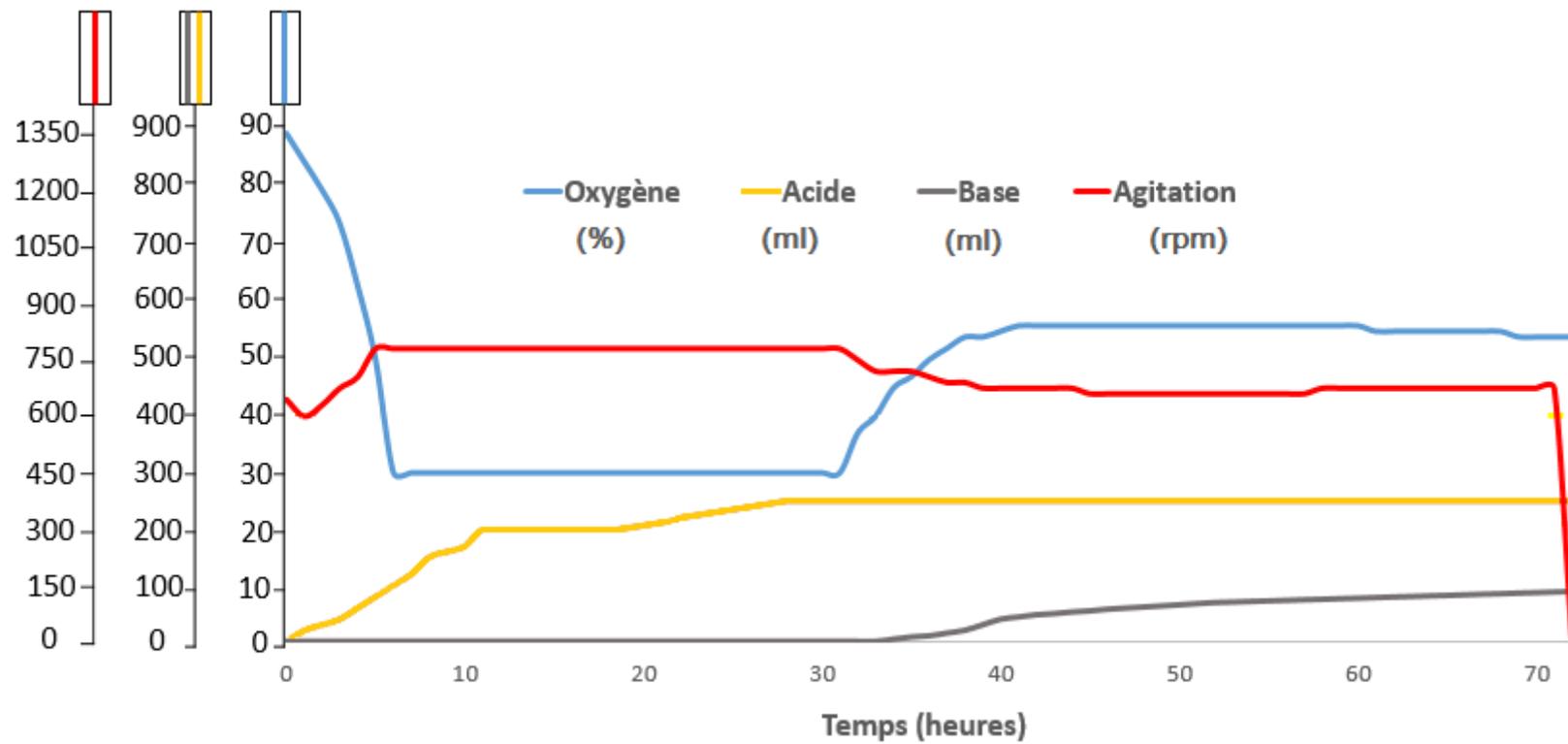


Figure 4. 2 Courbe de l'évolution des conditions de la fermentation avec une teneur en oxygène de 30%

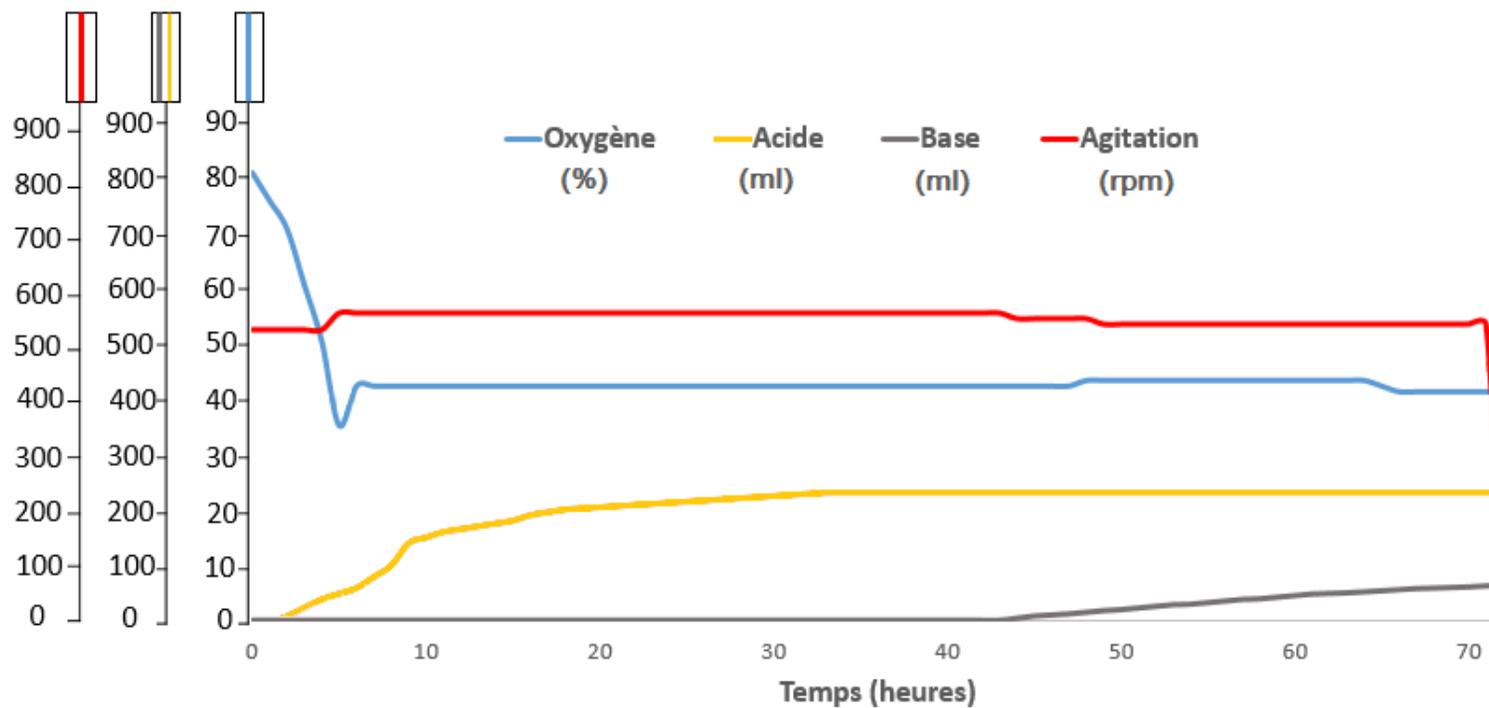


Figure 4. 3 Courbe de l'évolution des conditions de la fermentation avec une teneur en oxygène de 40%

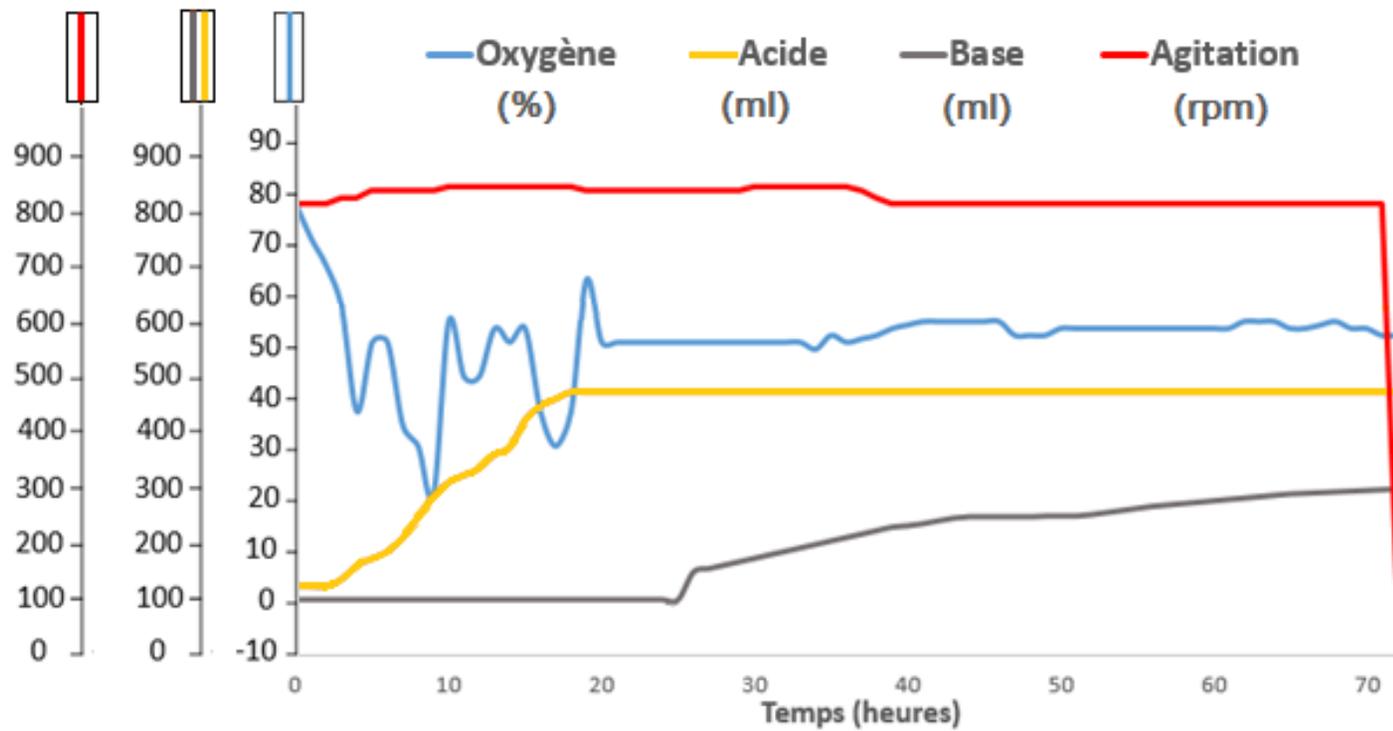


Figure 4. 4 Courbe de l'évolution des conditions de la fermentation avec une teneur en oxygène de 50%

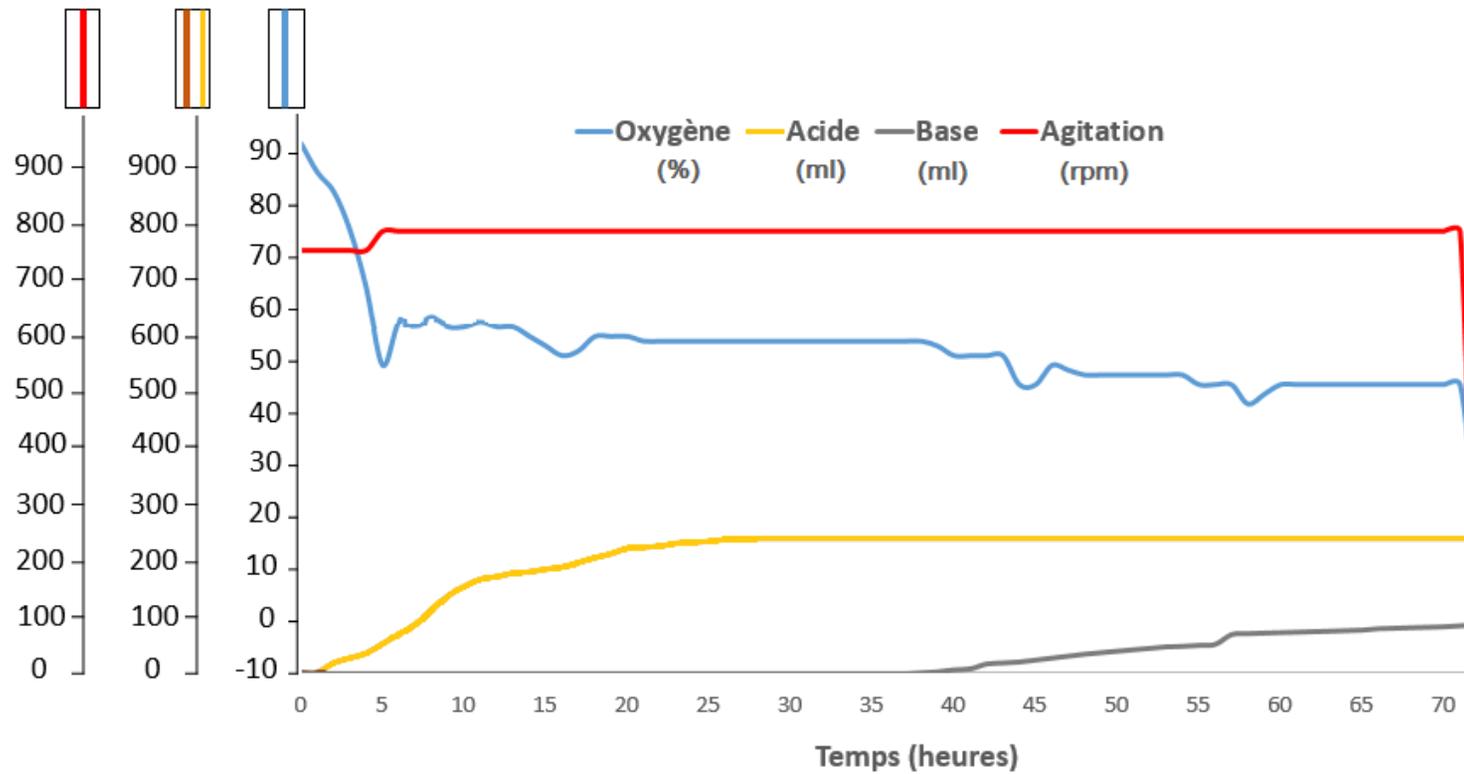


Figure 4. 5 Courbe de l'évolution des conditions de la fermentation avec une teneur en oxygène de 60%

4.1.2 Analyse des résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 20%

Le graphe 4.6 présente l'évolution des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon et FFA durant les 72 heures de fermentation :

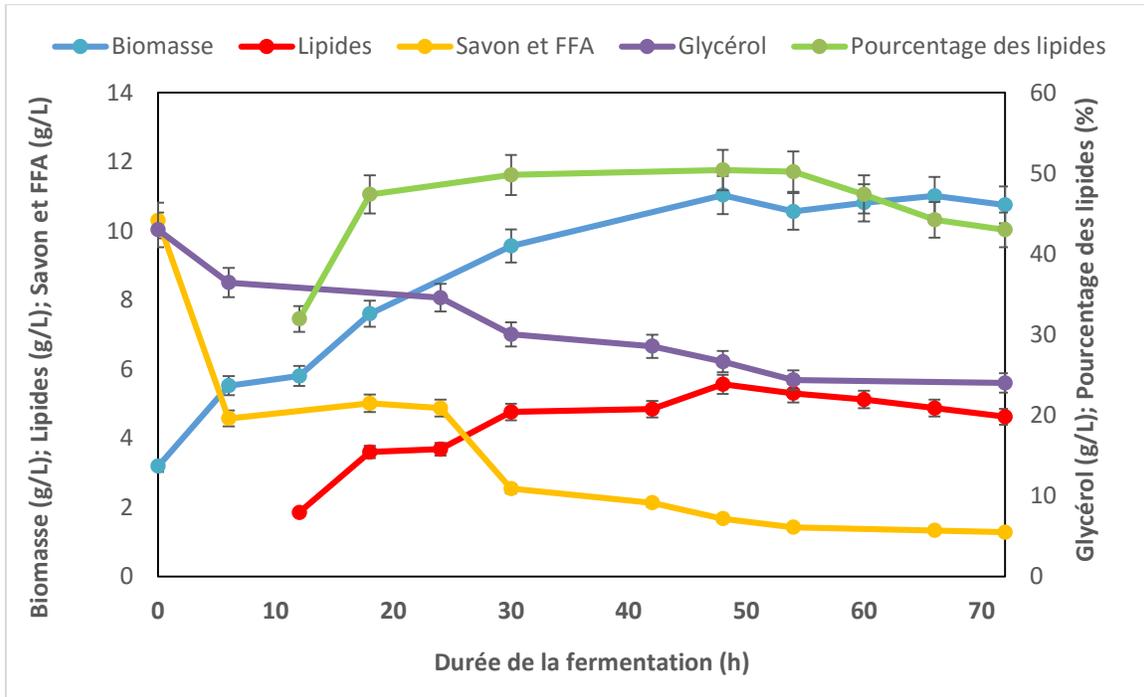


Figure 4. 6 Graphe représentant l'évolution des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon durant les 72 heures de fermentation avec une saturation en oxygène de 20%

La production de la biomasse a augmenté progressivement jusqu'à 30h de fermentation et augmente par la suite lentement jusqu'à 48h de fermentation. Le maximum de biomasse produite est 11,03 g/L obtenu après 48h de fermentation. Concernant l'assimilation du glycérol, à peine la moitié est consommée durant les 72 heures de fermentation. La concentration du glycérol est passée de 42,98 à 23,98 g/L. L'assimilation est devenue ensuite plus lente, à peine 5g sont consommés jusqu'à la fin de la fermentation.

En parallèle, une importante consommation du savon et FFA, qui constituent une source d'énergie pour la levure, est notée passant de 10,3 g/L à 4,57 g/L au bout des six premières heures. Sa concentration continue à baisser d'une façon plus modérée pour aboutir à 1,28 g/L vers 72 heures.

Quant au lipide, une augmentation progressive de la production des lipides est notée jusqu'à 48 heures de fermentation avec un maximum de 5,56 g/L et une teneur en lipide de 50,39%. La production commence ensuite à décliner pour atteindre 4,62 g/L au bout de 72 heures.

4.1.3 Analyse des résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 30%

Les résultats de la fermentation avec 30% de saturation en oxygène sont décrits sur la figure 4.7 :

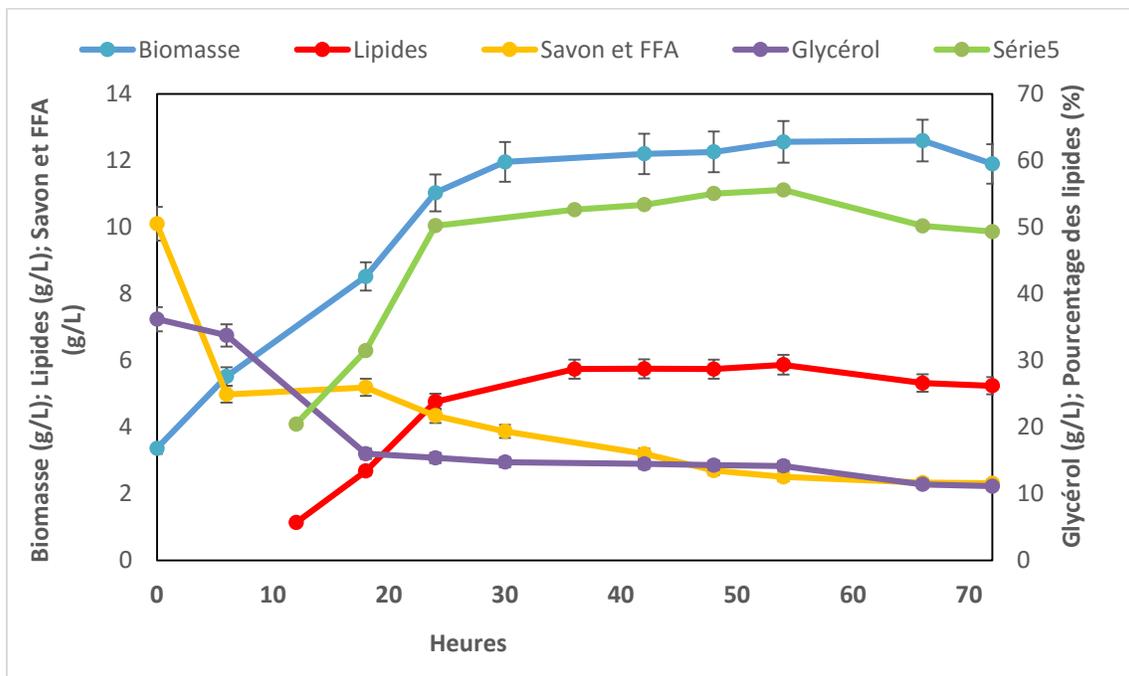


Figure 4. 7 Graphe représentant la variation des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon durant les 72 heures de fermentation avec une saturation en oxygène de 30%

Une importante croissance de la biomasse est notée entre 0 et 30 heures suivie de la phase quasi-stationnaire. Le maximum de biomasse produite est 12,6 g/L vers la fin de la fermentation à 66h.

Concernant le glycérol, plus que la moitié est consommée durant les premières 18 heures. Au cours de cette phase, la concentration a chuté de 36,19 g/L à 15,99 g/L, ce qui fait 23,2 g/L de glycérol consommés.

Entre 0 et 6 heures, la consommation du savon est importante, environ 5 g/L est assimilée juste au début de la fermentation, mais, par la suite, elle devient plus lente, et 2g/L, seulement, sont consommés jusqu'à la fin de la fermentation.

En ce qui concerne la production des lipides, elle augmente progressivement pour se stabiliser au bout de 36 heures et atteindre un maximum de 5,87 g/L après 54 heures et une teneur en lipides de l'ordre de 55,58%.

4.1.4 Analyse des résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 40%

La figure 4.8 illustre la consommation des substrats et la production de biomasse et des lipides pendant les 72 heures de fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 40%.

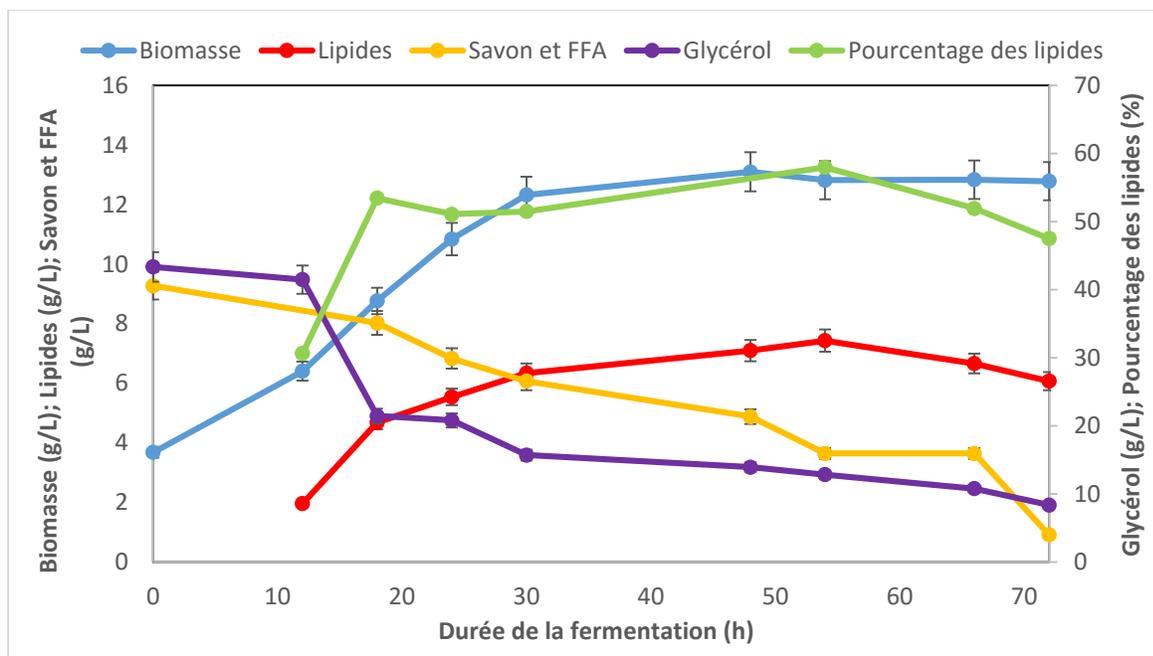


Figure 4. 8 Graphe représentant la variation des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon durant les 72 heures de fermentation avec une saturation en oxygène de 40%

En ce qui a trait à la production de la biomasse, la phase stationnaire est toujours atteinte après 30 heures de fermentation. La concentration maximale (13,09 g/L) est atteinte vers 48 heures de fermentation.

Quant au glycérol, presque 35 g/L sont consommés pendant la fermentation complète dans les conditions de 40% de saturation en oxygène. Une concentration 27,65 g/L de glycérol est consommée durant les 30 premières heures. L'assimilation est devenue plus lente par la suite. Une concentration de 8,36 g/L de savon a été consommée pendant la durée complète de la fermentation.

La teneur en lipide est nettement améliorée, elle atteint un maximum de 7,43 g/L (57,97%) après 54 heures de fermentation.

4.1.5 Analyse des résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 50%

Les résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 50% sont présentés par le graphe 4.9 :

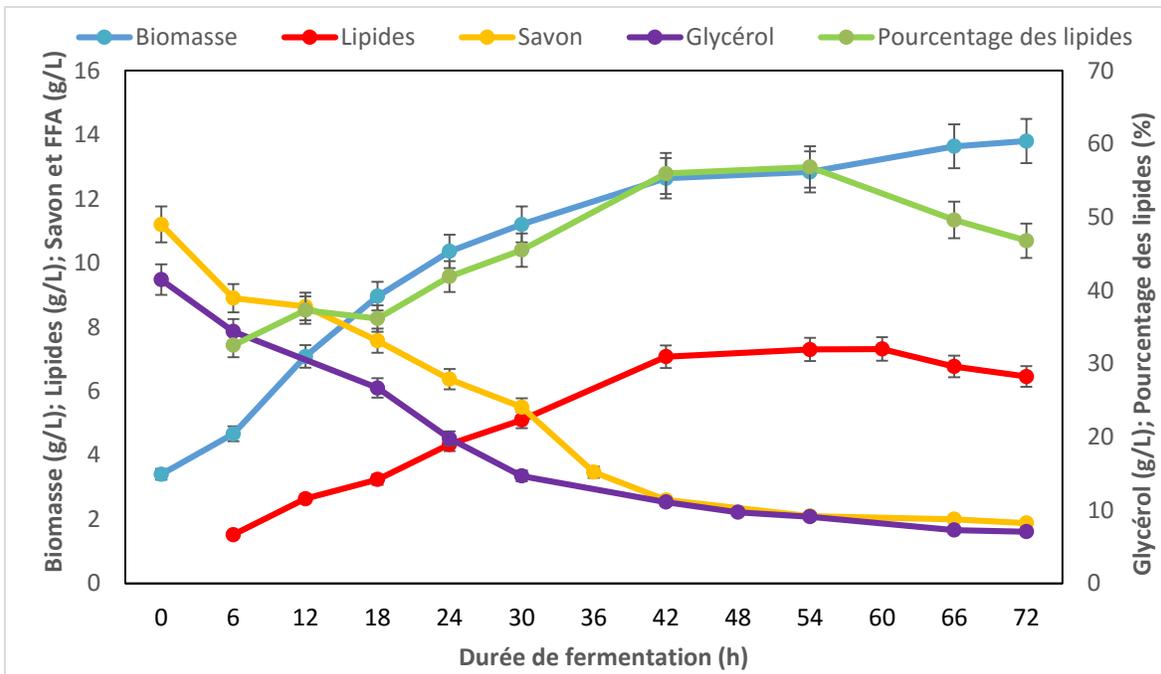


Figure 4. 9 Graphe représentant l'évolution des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon durant les 72 heures de fermentation avec une saturation en oxygène de 50%

Les microorganismes se multiplient activement au cours de la phase (0-42h) heures de fermentation pour produire 12,64 g/L de biomasse. Au-delà de 42h, la biomasse fluctue légèrement pour atteindre un maximum de 13,8 g/L vers 72 heures de fermentation.

Une concentration de 26,8 g/L de glycérol est consommé entre 0 et 30 heures, alors que seuls 7g sont consommés durant les dernières 42 heures de la fermentation.

Le savon est bien assimilé par les cellules. Sa concentration est passée de 11,2 g/L au début de la fermentation à 1,88 g/L à 72 heures.

Le maximum de lipides variant entre 7,3 et 7,312 est atteint après 54h de fermentation. De plus, une légère diminution de la concentration des lipides dans le milieu est notée après 60 heures de fermentation.

4.1.6 Analyse des résultats de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 60%

La figure 4.10 décrit la variation des concentrations de la biomasse, lipide, glycérol et savon et FFA durant le temps tout au long de la fermentation avec un taux de saturation en oxygène de 60% :

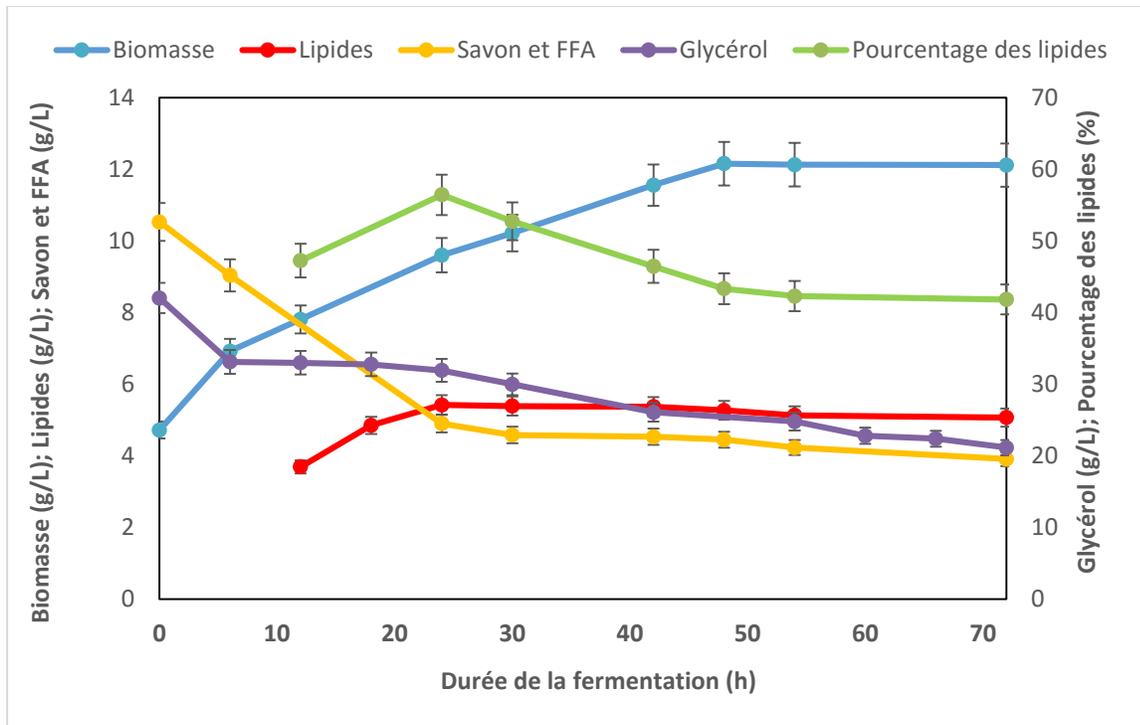


Figure 4. 10 Graphe représentant l'évolution des concentrations de la biomasse, des lipides, du glycérol et du savon durant les 72 heures de fermentation avec une saturation en oxygène de 60%

La prolifération des microorganismes continue à augmenter graduellement et la phase stationnaire n'est atteinte qu'après 48 heures de fermentation où le maximum est de l'ordre de 12,16 g/L.

En général une faible consommation du substrat de glycérol est observée. Seule la moitié du glycérol fourni aux cellules est consommée durant les 72 heures de fermentation.

La concentration maximale en lipides varie entre 5,37 g/L et 5,42 g/L entre 24h et 48h et décline légèrement par la suite.

4.2 DISCUSSION ET INTERPRÉTATION

4.2.1 Effet de la saturation du milieu de culture en oxygène sur la biomasse

La phase exponentielle de la croissance de *Yarrowia lipolytica* SKY7 dure trente heures pour les fermentations réalisées avec les trois premières saturations du milieu de culture en oxygène : 20%, 30%, et 40%. Au-delà de 40%, elle devient plus longue et tend respectivement vers quarante-deux heures et quarante-huit heures pour les teneurs en O₂ de 50% et 60% (Fig. 4.11). En effet *Y. lipolytica* SKY 7 étant une levure aérobic stricte, sa croissance cellulaire sera d'autant activée que le milieu de culture est suffisamment approvisionné en oxygène. La concentration en biomasse la plus importante est enregistrée au bout de soixante-douze heures, dans un milieu saturé à 50% en oxygène, elle est de 13,8 g/l (Fig. 4.11).

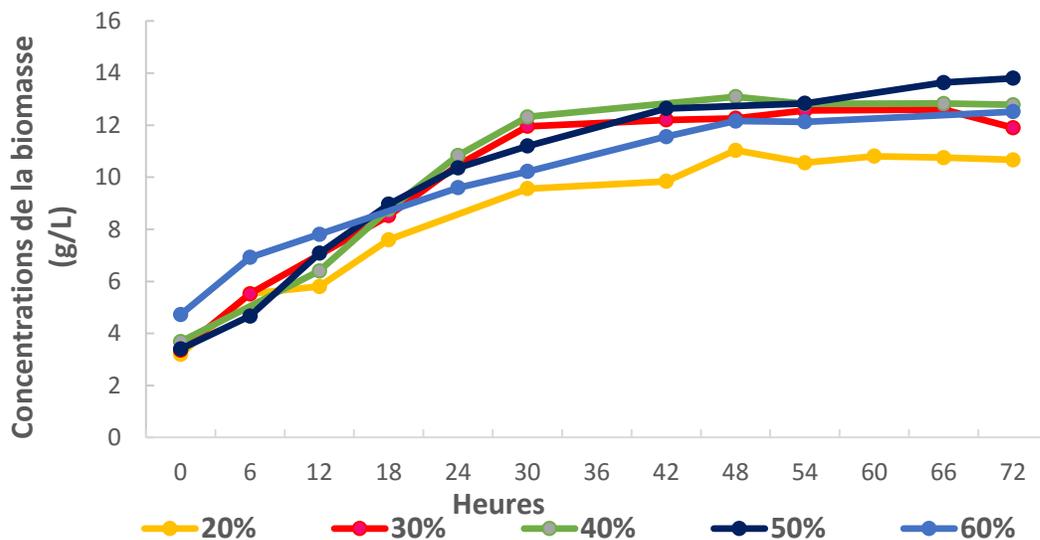


Figure 4. 11 Graphe représentant l'évolution de la concentration de la biomasse au cours des différentes fermentations en fonction du temps

La figure 4.12 illustre une comparaison entre les concentrations maximales en biomasse obtenues en fonction des différentes saturations du milieu de culture en oxygène dissous.

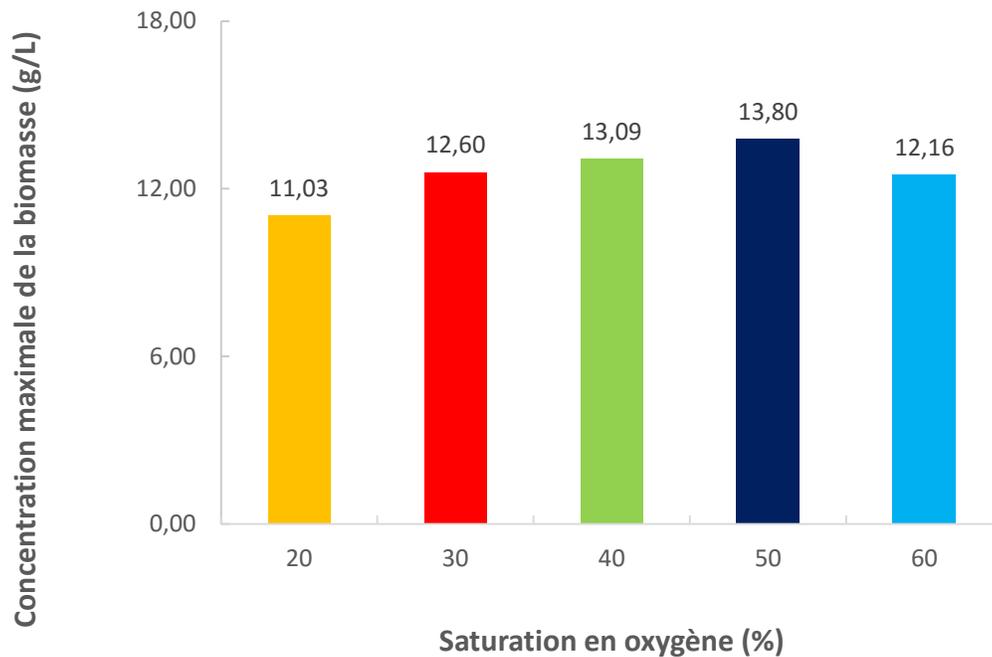


Figure 4. 12 Comparaison des maxima de concentrations de la biomasse au cours des différentes fermentations

Le temps nécessaire pour atteindre ces maxima varie entre quarante-huit heures et soixante-douze heures de fermentation. La concentration maximale en biomasse augmente progressivement avec l'augmentation de la saturation en oxygène dissous jusqu'à une saturation en O_2 de 50% où elle enregistre les valeurs 11,03 g/l; 12,6 g/l et 13,09 g/l et 13,8 g/L respectivement pour les saturations en oxygène dissous de 20%; 30%, 40% et 50%. Quand le milieu de culture est saturé à 60% en oxygène dissous, une tendance à la baisse de la concentration maximale en biomasse est notée : 12,16 g/l au bout de quarante-huit heures de fermentation.

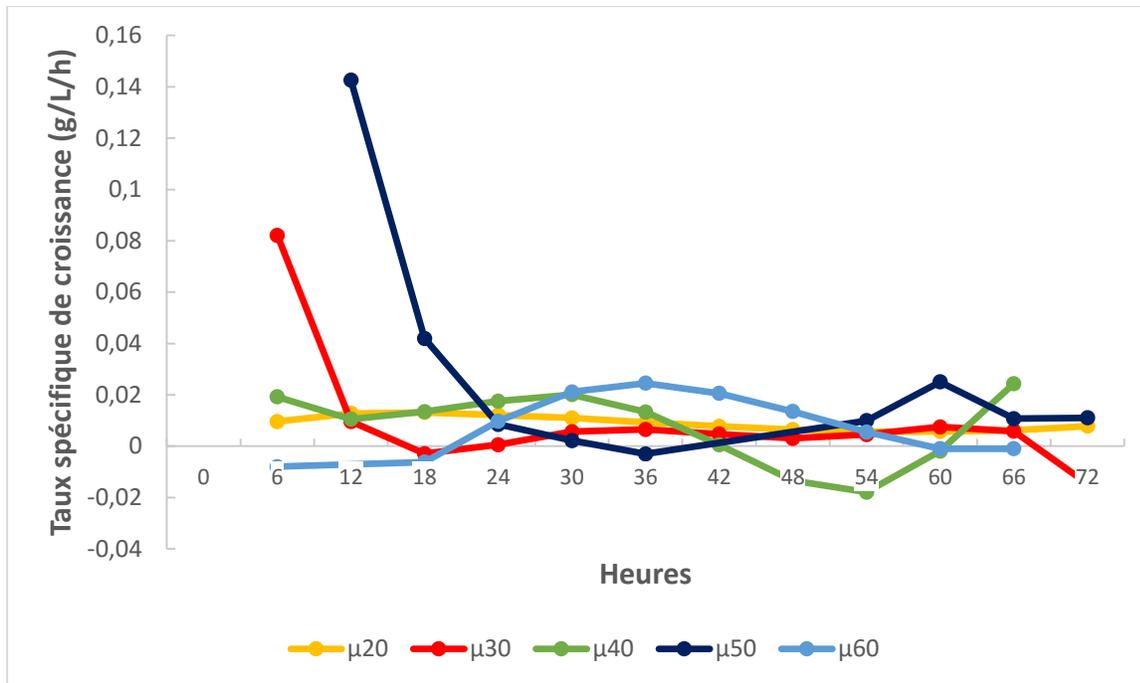


Figure 4. 13 Taux spécifique de croissance en fonction du temps pour les différentes fermentations

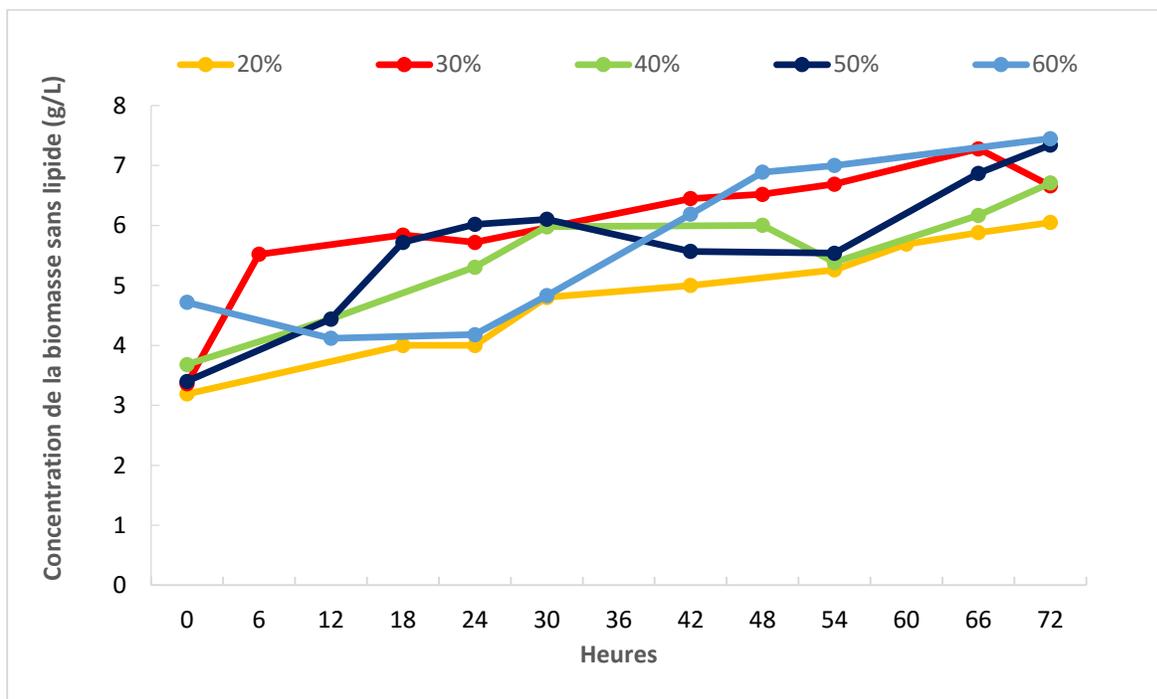


Figure 4. 14 Concentration de la biomasse sans lipide en fonction du temps pour les différentes fermentations

Les taux spécifiques de croissance pour les différentes fermentations sont calculés par la formule suivante :

$$\mu = \frac{1}{x} * \frac{dx}{dt}$$

Avec :

x : Concentration de la biomasse sans lipide (g/L) (Fig 4.14)

dt : Intervalle de temps (h)

Les résultats sont présentés sur la figure 4.13 ; la tendance générale du taux spécifique de croissance montre qu'il est plus élevé durant les premières heures suivies d'un déclin jusqu'à la fin de la fermentation. Ce taux élevé concorde avec l'activité de croissance de *Y. lipolytica* SKY7 lors de la phase exponentielle. Les valeurs du taux spécifique de croissance restent par la suite stables ou diminuent vers la fin de la fermentation, ce qui correspond à la phase stationnaire et celle de mortalité.

Les consommations totales du glycérol et du savon et FFA au cours des fermentations sous différentes saturations du milieu en oxygène dissous sont données par les figures 4.15 et Fig.4.16:

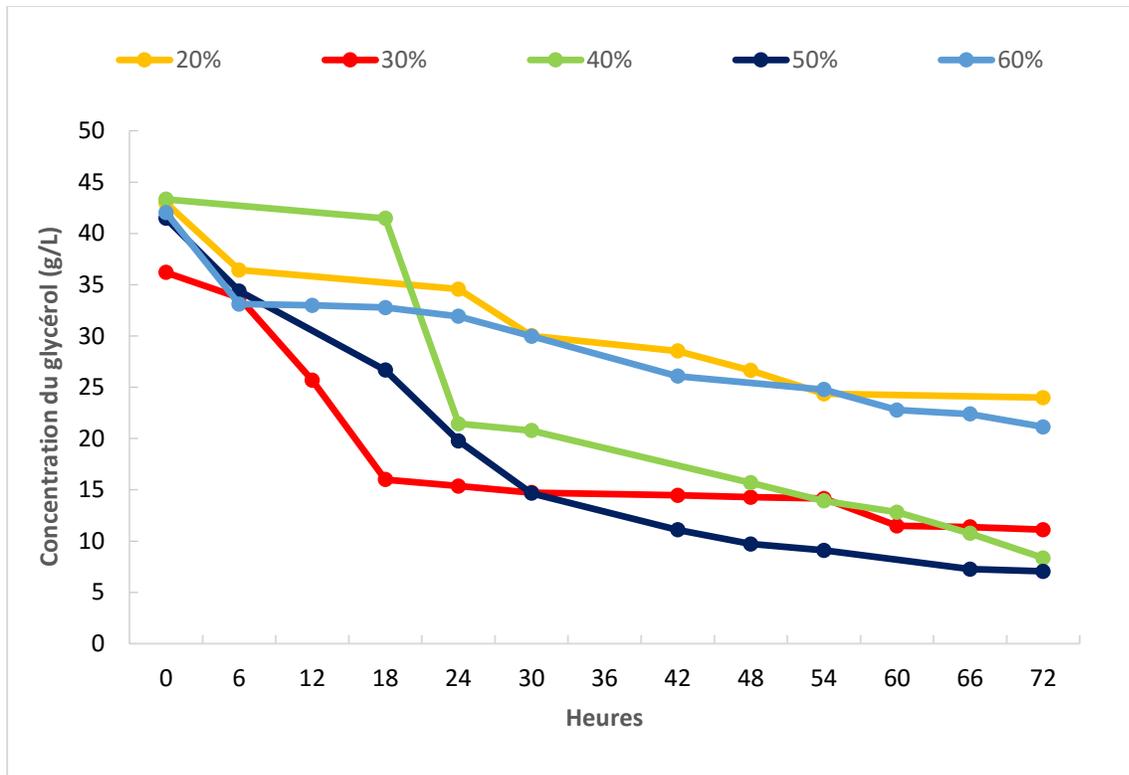


Figure 4. 15 Consommation du glycérol au cours des différentes fermentations

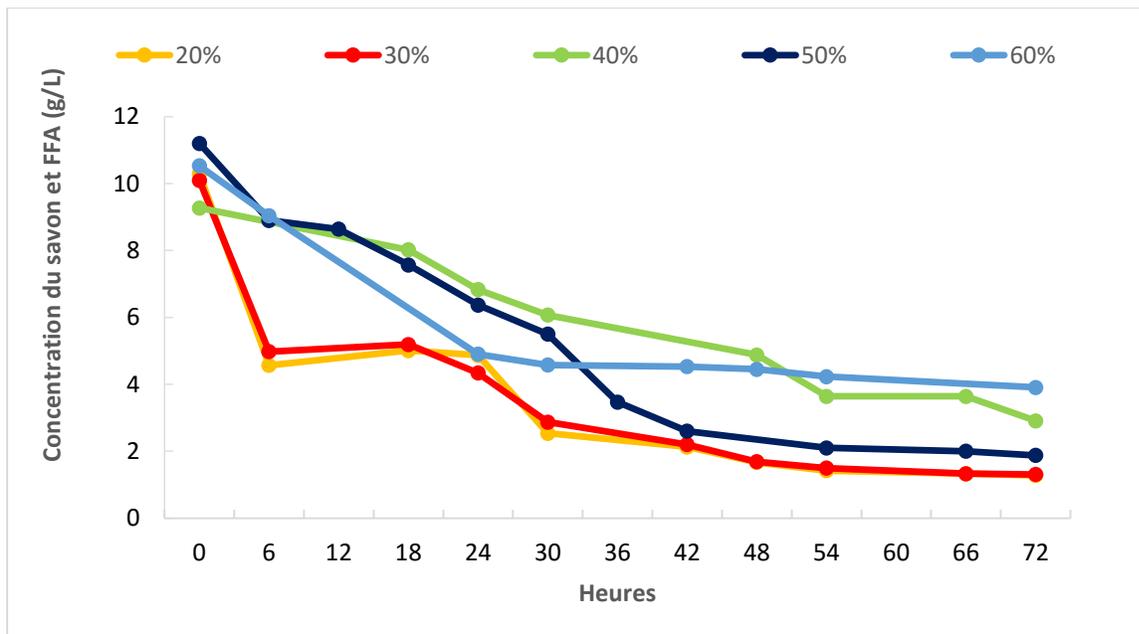


Figure 4. 16 Consommation du savon et FFA dans au cours des différentes fermentations

Pendant les six premières heures de fermentation la vitesse de consommation du savon est relativement plus élevée par rapport à celle du glycérol pour les différentes saturations du milieu en oxygène (Fig 4.15 et 4.16). Durant cette période 14% à 56% du savon sont consommés alors que l'assimilation du glycérol varie entre 4% et 21%. Entre six et trente-six heures la consommation des deux composantes devient régulière parallèlement à l'augmentation de la masse cellulaire. Au-delà de trente heures, la vitesse de consommation du glycérol ainsi que celle du savon ont tendance à ralentir jusqu'à la fin de la fermentation ; ce qui se traduit par un plafonnement de la production de la biomasse.

Les microorganismes assimilent d'avantage du glycérol quand la saturation en oxygène dissout dans le milieu passe de 30% à 50%, la consommation plafonne entre 34,5 g/l à 35 g/l respectivement pour les teneurs 50% et 40% et elle décline quand la saturation en oxygène dépasse 50%.

Les valeurs maximales de concentrations en biomasse de *Y. lipolytica* SKY7 obtenues (Fig 4.11 et 4.12) sont approximativement similaires à celles citées par des études récentes menées sur la fermentation de *Y. lipolytica* SKY7 en particulier celle qui a été menée par Kuttiraja (Mathiazhakan Kuttiraja *et al.*, 2016). Au bout de soixante-douze heures de fermentation, ces chercheurs ont observé des concentrations maximales de 11,76 g/l et 16,08 g/l des microorganismes cultivés sur des milieux contenant respectivement 34,40 g/l et 52,30 g/l de glycérol brut et avec un apport en oxygène dissous variable selon les exigences des microorganismes. Dans l'étude de Machado (Machado Junior *et al.*, 2015), la production de biomasse de *Y. lipolytica* NRRLYB-423, cultivée dans un milieu contenant 83g/L de glycérol et 0,28% p/v de savon, et sous une vitesse d'aération de 1 vvm et une agitation de 200 tours/mn atteint 19,14 g/l après soixante heures de fermentation. Alors que Juszczuk et Tomaszewska (Juszczuk *et al.*, 2013) ont observé un maximum de concentration de 11,60 g/l de *Y. lipolytica* S10 sur du glycérol brut contenant 78 p/p de glycérol, 0,45%p/v de savon, moins de 0,1% de méthanol et avec une vitesse d'aération de 1 vvm et une agitation de 550 tours/mn.

La faible croissance des microorganismes dans les milieux sous saturés en oxygène dissous est expliquée par une déficience en oxygène nécessaire à la prolifération des microorganismes. Alors que la baisse de concentration en biomasse sous forte saturation en oxygène pourrait être liée au stress excessif induit par les grandes vitesses d'agitation (Machado Junior *et al.*, 2015) ainsi qu'à

l'effet nocif provenant du radical libre $O_2^{\cdot-}$, qui par accumulation entraîne une altération des membranes cellulaires.

4.2.2 Effet de la saturation du milieu de culture en oxygène sur la production de lipides

La figure 4.17 illustre une comparaison de l'évolution de la production des lipides par *Y. lipolytica* SKY7 durant soixante-douze heures de fermentation pour les différentes saturations du milieu de culture en oxygène dissous.

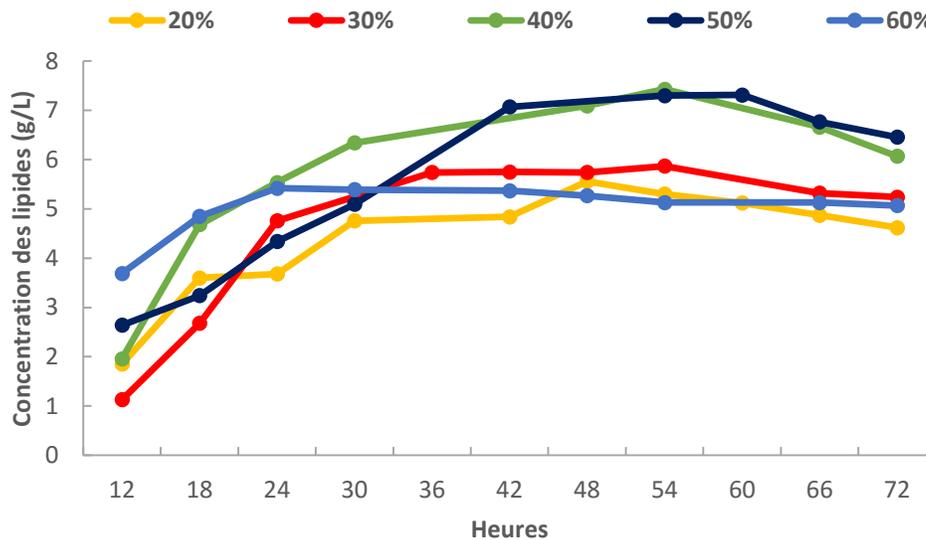


Figure 4. 17 Concentration des lipides des différentes fermentations

Une première phase de production active de lipides est notée pour les différentes fermentations. Elle apparaît entre 12 et 18 heures de fermentation pour la saturation en oxygène 20% et entre 12 et 24 heures pour les saturations en oxygène de 30% et 60%, cette phase devient plus longue pour les saturations en oxygène 40% et 50%; et elle est observée respectivement entre 12 et 30 heures et entre 12h et 42h. Les concentrations en lipides obtenues en fin de cette première phase pour les saturations en oxygène 40% et 50%, sont respectivement de 6,34 g/l et 7,07 g/l. Au-delà de cette phase et généralement jusqu'à 54 heures de fermentation, la production des lipides continue à augmenter mais d'une façon plus lente. Les maxima de productions sont enregistrés pendant cette phase pour les différentes saturations en oxygène dissous. En allant de 20% à 60% de saturations en oxygène, les plus fortes concentrations obtenues sont respectivement de 5,56

g/l au bout de 48 h de fermentation, 5,87 g/l à 54 h, 7,43 g/l à 54 h, 7,31 g/l à 60 h et 5,42 g/l à 24 h (Figure 4.18). Pendant les dernières dix-huit heures de fermentation une tendance à la baisse de production de lipides est observée pour les différentes pressions d'oxygène. La phase de production active des lipides observée au début des cinq fermentations réalisées, serait à lier essentiellement aux lipides rentrant dans la structure des membranes cellulaires. En effet cette période coïncide avec la phase exponentielle de production de biomasse pour les différentes fermentations.

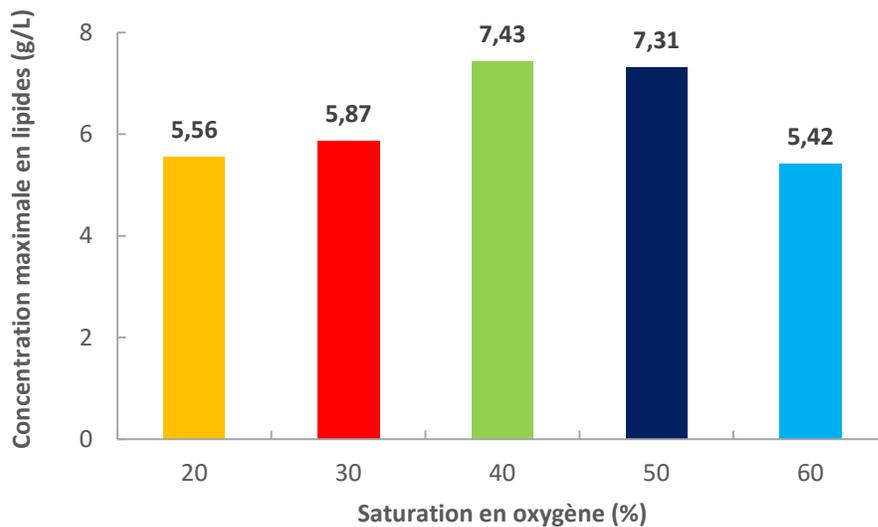


Figure 4. 18 Comparaison des maxima de concentrations en lipides produits au cours des différentes fermentations

La phase de stabilisation de production de lipides, au cours de laquelle les microorganismes produisent les plus fortes concentrations observées, est parallèle à la phase stationnaire de production de biomasse. Ce qui permet de conclure que la majeure partie du carbone assimilé pendant cette période est détournée vers la synthèse des lipides au dépend de la production de la biomasse.

La baisse de la production des lipides pendant les dernières dix-huit heures de fermentation est observée en même temps qu'une déclinaison de la production de biomasse. Ceci pourrait s'expliquer par un début de perte de viabilité cellulaire.

La production maximale de lipides 7,43 g/l par *Y. lipolytica* SKY7 est obtenue dans un milieu de culture saturé à 40% en oxygène dissous et la teneur maximale de la biomasse en lipide est 57,9% w/w. Il faut signaler que des teneurs en lipides aussi importantes que 55,58% w/w et 56,85% w/w sont enregistrées lors des fermentations réalisées respectivement avec des saturations en oxygène de 30% et 50% (Fig. 4.20).

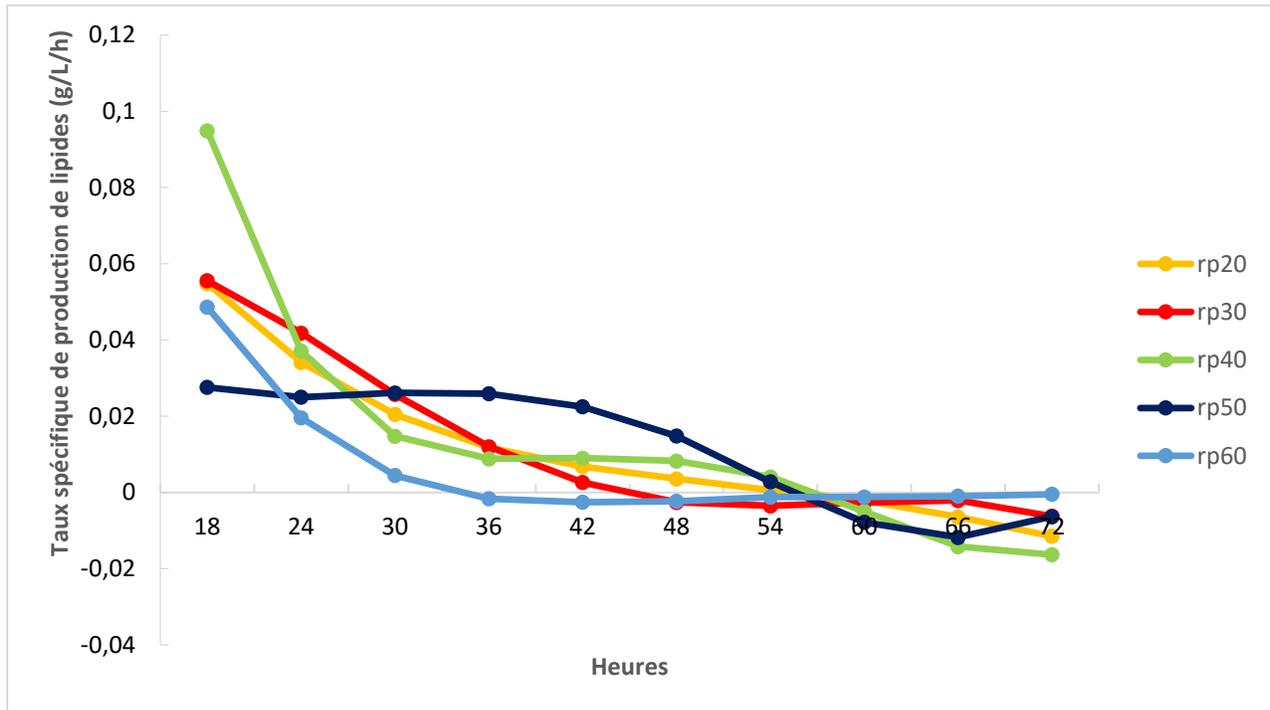


Figure 4. 19 Taux spécifique de production de lipides en fonction du temps pour les différentes fermentations avec des taux d'oxygène allant de 20% à 60%

Les résultats du calcul du taux spécifique de production pour les différentes fermentations sont obtenus suivant la formule :

$$rp = \frac{1}{x} * \frac{dL}{dt}$$

Avec :

x : Concentration de la biomasse sans lipides (g/L)

L : Concentration des lipides produits (g/L)

dt : Intervalle de temps (h)

Les valeurs maximales des taux spécifiques de production ont été enregistrées entre 18 et 36h (Fig 4.19). Ce qui équivaut à la fin de la phase de croissance de *Y. lipolytica* et au début de la phase stationnaire où *Y. lipolytica* est très active dans le milieu.

Le taux spécifique de production diminue ensuite avec le temps. Cette diminution peut être liée à plusieurs facteurs. D'abord l'épuisement de l'azote dans le milieu de fermentation, ce qui va arrêter le processus du déclenchement de l'accumulation lipidique. Car comme indiqué auparavant le mécanisme de l'accumulation des lipides est déclenché dans des conditions de carences nutritionnelles notamment d'azote associées à un apport suffisant de carbone (Gill *et al.*, 1977). L'épuisement des micronutriments comme le phosphore pourrait aussi être un facteur défavorable à la croissance cellulaire. Et finalement, l'âge des microorganismes affecte négativement l'accumulation lipidique vers la fin des fermentations.

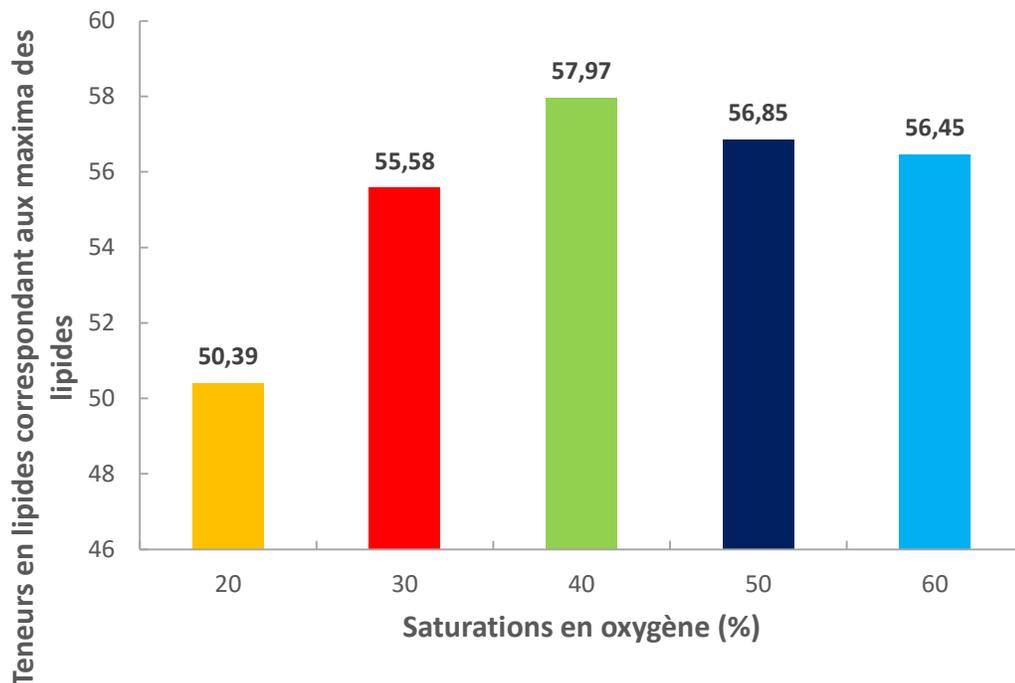


Figure 4. 20 Les maxima de teneur en lipides dans les différentes fermentations

Les valeurs des concentrations en lipides obtenues sont significatives comparées à celles citées dans la littérature. L'étude de Kuttiraja (M Kuttiraja *et al.*, 2015) sur la production des lipides par différentes souches de levures hétérotrophes révèle la meilleure production par *Y. lipolytica* SKY7 cultivée sur un milieu à 100 g/l de glycérol et un rapport C/N = 100, une teneur de 42,04% w/w en lipide est enregistrée au bout de 72 h de fermentation. La même souche cultivée sur un milieu à 82,5 g/l de glycérol brut, avec un rapport C/N = 75 et un volume d'inoculum de 6,25%v/v et sous une saturation en oxygène dissous de 30%, voit sa production en lipides nettement améliorée, elle atteint 54,10% w/w après 72 h de fermentation (Mathiazhakan *et al.*, 2016). Papanikolaou et Gortzi (Seraphim Papanikolaou *et al.*, 2008) obtiennent 6-14% de lipides durant la phase stationnaire de *Y. Lipolytica* ACA-DC50109 dans un milieu contenant 45,9 g/l de glycérol brut. L'effet stimulateur des hautes aérations sur la synthèse de l'acide citrique, élément précurseur de la synthèse des lipides chez les microorganismes, par *Y. lipolytica* cultivée sur du glycérol a fait l'objet de plusieurs études. Dans l'étude de Machado (Machado Junior *et al.*, 2015), les meilleures conditions d'aération et d'agitation pour l'accumulation des lipides par *Y. lipolytica* NRRLYB-423 sont identiques à celles trouvées pour la production de la biomasse (200 tours/mn et 1,0 vvm), les auteurs observent un maximum de teneur de la biomasse en lipides de 7,87% entre 36 h et 60 h de fermentation. Morgunov et Kamzolova (Morgunov *et al.*, 2013) obtiennent le maximum de production d'acide citrique par *Y. lipolytica* NG40/UV7 avec une agitation de 800 tours/mn et sous les hautes saturations en oxygène 50% à 60%, quand le taux d'oxygène atteint 80% la production de l'acide citrique chute de 2,8 fois.

Un effet semblable de la saturation en oxygène dissous sur la synthèse de l'acide citrique chez *Candida lipolytica* cultivée sur un substrat n-alkane, est signalé par (Stottmeister *et al.*, 1981), les auteurs montrent que la valeur de la saturation en oxygène dissous devrait être maintenue à 60% pendant la phase exponentielle de croissance des microorganismes et à 40-60% pendant la phase de synthèse intense d'acide citrique. Kalmoza et Shishkanova (Kamzolova *et al.*, 2003) attribuent la diminution de synthèse d'acide citrique chez *Yarrowia lipolytica* N1 sous faibles aérations à une forte baisse dans les activités d'un certain nombre d'enzyme impliqués dans le cycle tricarboxylique et dans le cycle glyoxylate (IL : isocitrate lyase et MS : Malate synthase).

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

La présente étude n'a fait que confirmer l'intérêt que présentent le glycérol brut et la souche *Yarrowia lipolytica* SKY7 pour la production des lipides destinés pour l'industrie de fabrication du biodiesel.

Les fermentations de la levure *Yarrowia Lipolytica* SKY7 dans 40g/L de glycérol, 26,58% w/v de savon et FFA, avec un ratio carbone azote C/N de 75, un pH de 6,5 et sous une température de 28°C pendant 72h tout en variant la teneur en oxygène d'une fermentation à une autre (20%, 30%, 40%, 50% et 60%) ont été réalisées. Les résultats obtenus montrent que la saturation optimale du milieu en oxygène dissout pour une production maximale de lipides est de 40%. Une concentration en lipides de 7,43 g/l et un pourcentage de 57,9% w/w sont enregistrés avec cette saturation tandis que la concentration en biomasse marque un maximum de 13,8 g/l quand la teneur en oxygène est de 50%. La faible croissance des microorganismes, et par conséquent, la baisse de la concentration de lipides produits dans les milieux sous saturés en oxygène dissous, est expliquée par une déficience en oxygène nécessaire à la prolifération des microorganismes induisant une perturbation des mécanismes de synthèse des différentes composantes des cellules. La baisse de concentration en biomasse sous la plus forte saturation en oxygène (60%) pourrait être liée à l'effet nocif provenant du radical libre $O_2^{\cdot-}$, qui par accumulation entraîne une altération des membranes cellulaires.

Ce travail a permis de déterminer la teneur en oxygène optimale pour la production des lipides par *Yarrowia lipolytica* SKY7, ce qui va permettre d'économiser de l'énergie et par conséquent, optimiser le coût de production. La présente étude a également permis de souligner le potentiel du glycérol brut comme substrat pour la production des lipides destinés à l'industrie du biodiesel. Enfin et comme perspectives de cette étude, quelques recommandations sont à suggérer :

Il serait plus intéressant d'utiliser de plus grandes concentrations de glycérol brut et d'ajouter une quantité d'azote dès que la production en lipide commence à stagner afin d'obtenir des rendements en lipides plus intéressants que 7,43 g/l ;

Il est suggéré de reprendre les mêmes expériences à grande échelle afin de pouvoir confirmer le taux d'oxygène optimale pour la production des lipides et

Pour une meilleure économie d'énergie, il serait souhaitable de diminuer le taux d'oxygène dissous après 35h de fermentation car le microorganisme consomme moins d'oxygène après la phase de croissance.

6. RÉFÉRENCES

- Aggelis G & Sourdis J (1997) Prediction of lipid accumulation-degradation in oleaginous microorganisms growing on vegetable oils. *Antonie van Leeuwenhoek* 72(2):159-165.
- Ajanovic A (2011) Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? *Energy* 36(4):2070-2076.
- Alaswad A, Dassisti M, Prescott T & Olabi AG (2015) Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 51:1446-1460.
- Alvarez H, Kalscheuer R & Steinbüchel A (2000) Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126. *Applied microbiology and biotechnology* 54(2):218-223.
- Alvarez HM, Kalscheuer R & Steinbüchel A (1997) Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effect of inhibitors and polyethylene glycol. *European Journal of Lipid Science and Technology* 99(7):239-246.
- Alvarez HM, Luftmann H, Silva RA, Cesari AC, Viale A, Wältermann M & Steinbüchel A (2002) Identification of phenyldecanoic acid as a constituent of triacylglycerols and wax ester produced by *Rhodococcus opacus* PD630. *Microbiology* 148(5):1407-1412.
- Astrup T, Møller J & Fruergaard T (2009) Incineration and co-combustion of waste: accounting of greenhouse gases and global warming contributions. *Waste Management & Research* 27(8):789-799.
- Athenstaedt K & Daum G (2006) The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(12):1355-1369.
- Avila N, da Silva G, Lima C, De Paula F & Contiero J (2014) Evaluation and optimization of growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 using glycerol as carbon source as an alternative to use biodiesel byproduct. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 2(1):25-31.
- Babau M (2015) *Croissance et accumulation lipidique de Rhodotorula glutinis (rhodosporidium toruloides) sur glucose, xylose et glyc  rol: vers la valorisation des coproduits agricoles et industriels pour la production de lipides    usages   nerg  tiques*. (INSA de Toulouse).
- Ballerini D (2006) *Biocarburants (Les)*. Editions OPHRYS,
- Bankar AV, Kumar AR & Zinjarde SS (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied microbiology and biotechnology* 84(5):847.
- Barth G & Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica. Nonconventional yeasts in biotechnology*, Springer. p 313-388.
- Barth G & Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS microbiology reviews* 19(4):219-237.

- Barth G & Künkel W (1979) Alcohol dehydrogenase (ADH) in yeasts II. NAD⁺-and NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenases in *Saccharomyces lipolytica*. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 19(6):381-390.
- Bati N, Hammond E & Glatz B (1984) Biomodification of fats and oils: Trials with *Candida lipolytica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61(11):1743-1746.
- Beligon V (2016) *Valorization of volatile fatty acids to microbial lipids by oleaginous yeasts for biodiesel production*. (Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01342501> (Consulté le 2016-04-05)
- Béligon V, Poughon L, Christophe G, Lebert A, Larroche C & Fontanille P (2015) Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate. *Bioresource technology* 192:582-591.
- Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribebarrea J-L, Molina-Jouve C & Nicaud J-M (2009a) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in lipid research* 48(6):375-387.
- Beopoulos A, Chardot T & Nicaud J-M (2009b) *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie* 91(6):692-696.
- Bondioli P & Della Bella L (2005) An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology* 107(3):153-157.
- BOTHAM PA & RATLEDGE C (1979) A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. *Microbiology* 114(2):361-375.
- BOULTON CA & RATLEDGE C (1981) Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: citrate lyase. *Microbiology* 127(1):169-176.
- BROUST F, GIRARD P & VAN DE STEENE L (2017) Biocarburants de seconde génération. *Innovations*.
- Cadoret J-P & Bernard O (2008) La production de biocarburant lipidique avec des microalgues: promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie* 202(3):201-211.
- Calderbank J, Keenan MH, Rose AH & Holman GD (1984) Accumulation of amino acids by *Saccharomyces cerevisiae* Y185 with phospholipids enriched in different fatty-acyl residues: a statistical analysis of data. *Microbiology* 130(11):2817-2824.
- Cantin I (2010) *La production de biodiesel à partir des microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe*. (Université de Sherbrooke).
- Casaregola S, Feynerol C, Diez M, Fournier P & Gaillardin C (1997) Genomic organization of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Chromosoma* 106(6):380-390.
- Casaregola S, Neuvéglise C, Lépingle A, Bon E, Feynerol C, Artiguenave F, Wincker P & Gaillardin C (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS letters* 487(1):95-100.

- Cescut J (2009) *Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique: physiologie et performances de procédés*. (Toulouse, INSA).
- Cescut J, Fillaudeau L, Molina-Jouve C & Uribelarrea J-L (2014) Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation. *Biotechnology for biofuels* 7(1):164.
- Chi Z, Zheng Y, Ma J & Chen S (2011) Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. *international journal of hydrogen energy* 36(16):9542-9550.
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances* 25(3):294-306.
- Choi S, Ryu DD & Rhee J (1982) Production of microbial lipid: effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnology and bioengineering* 24(5):1165-1172.
- Coleman RA & Lee DP (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in lipid research* 43(2):134-176.
- Daum G, Lees ND, Bard M & Dickson R (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(16):1471-1510.
- Davies RJ, Holdsworth JE & Reader SL (1990) The effect of low oxygen uptake rate on the fatty acid profile of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Applied microbiology and biotechnology* 33(5):569-573.
- DCE VGd (2006) Les biocarburants à partir de ressources lignocellulosiques : Présentation des filières et identification des risques. (INERIS).
- Destain J, Roblain D & Thonart P (1997) Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology letters* 19(2):105-108.
- Dias C, Sousa S, Caldeira J, Reis A & da Silva TL (2015) New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource technology* 189:309-318.
- Dominguez A, Fermiñán E, Sánchez M, Gonzalez FM, Pérez-Campo FM, García S, Herrero AB, San Vicente A, Cabello J & Prado M (1998) Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *International Microbiology* (Jun; 1 (2):):131-142.
- Dronne Y, Forslund A & Guyomard H (2011) Les biocarburants de deuxième génération et la compétition pour l'usage des terres. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 18(1):1-9.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G & Durrrens P (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430(6995):35.
- ÉNERGIES FDEAPLCD (2011) Le monde de l'énergie selon l'AIE : quelles évolutions d'ici 2040.
- Escobar JC, Lora ES, Venturini OJ, Yáñez EE, Castillo EF & Almazan O (2009) Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13(6-7):1275-1287.

- Evans CT & Ratledge C (1985) The role of the mitochondrial NAD⁺: isocitrate dehydrogenase in lipid accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Canadian journal of microbiology* 31(9):845-850.
- EVANS CT, SCRAGG AH & RATLEDGE C (1983) A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts. *European journal of biochemistry* 130(1):195-204.
- Feofilova E, Sergeeva YE & Ivashchkin A (2010) Biodiesel-fuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 46(4):369-378.
- Ferrante G & Kates M (1983) Pathways for desaturation of oleoyl chains in *Candida lipolytica*. *Canadian journal of biochemistry and cell biology* 61(11):1191-1196.
- Ferreira T, Azevedo D, Coelho M & Rocha-Leão M (2009) The crude oil degrading potential of *Yarrowia lipolytica*. *New Biotechnology* 25:S80-S81.
- Folch J, Lees M & Sloane-Stanley G (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):497-509.
- Fontanille P, Kumar V, Christophe G, Nouaille R & Larroche C (2012) Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol* 114:443-449.
- Gardini F, Suzzi G, Lombardi A, Galgano F, Crudele MA, Andrighetto C, Schirone M & Tofalo R (2001) A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS yeast research* 1(2):161-167.
- Gill C, Hall M & Ratledge C (1977) Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Applied and environmental microbiology* 33(2):231-239.
- Goldemberg J & Guardabassi P (2010) The potential for first-generation ethanol production from sugarcane. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 4(1):17-24.
- Gong Z, Shen H, Zhou W, Wang Y, Yang X & Zhao ZK (2015) Efficient conversion of acetate into lipids by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnology for biofuels* 8(1):189.
- Granger L-M (1992) *Caractérisation cinétique et stoechiométrique de la synthèse d'acides gras chez Rhodotorula glutinis.*
- Guerzoni ME, Lanciotti R & Marchetti R (1993) Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods. *International Journal of Food Microbiology* 17(4):329-341.
- Güvenç A, Kapucu N & Mehmetoğlu Ü (2002) The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochemistry* 38(3):379-386.
- Haas MJ, McAloon AJ, Yee WC & Foglia TA (2006) A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresour Technol* 97(4):671-678.

- Hamid S, Khan S, Saeed M & Iqbal M (1995) Lipid production by *Candida curvata*. *Fett* 97:545-548.
- Hansson L & Dostálek M (1986) Effect of culture conditions on fatty acid composition in lipids produced by the yeast *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 63(9):1179-1184.
- Hassan M, Blanc P, Pareilleux A & Goma G (1994) Production of single-cell oil from prickly-pear juice fermentation by *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10(5):534-537.
- Hu C, Wu S, Wang Q, Jin G, Shen H & Zhao ZK (2011) Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnology for biofuels* 4(1):25.
- Juszczak P, Tomaszewska L, Kita A & Rymowicz W (2013) Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 137:124-131.
- Kamzolova SV, Shishkanova NV, Morgunov IG & Finogenova TV (2003) Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 3(2):217-222.
- Kim TH, Lee J-H, Oh Y-S, Bae KS & Kim S-J (1999) Identification and characterization of an oil-degrading yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. *J Microbiol* 37(3):128-135.
- Kosaric N, Zajic J, Aboue G, Jack T & Gerson D (1979) Lipase synthesis in hydrocarbon fermentation. *Biotechnology and bioengineering* 21(7):1133-1149.
- Kreger-van Rij N (1984) Genus 7. *Debaryomyces* Lodder et Kreger-van Rij nom. cons. *The yeasts, a taxonomic study*:130-145.
- Kuttiraja M, Douha A, Valéro JR & Tyagi RD (2016) Elucidating the Effect of Glycerol Concentration and C/N Ratio on Lipid Production Using *Yarrowia lipolytica* SKY7. *Applied biochemistry and biotechnology* 180(8):1586-1600.
- Kuttiraja M, Krishna S, Dhouha A & Tyagi RD (2015) A substrate-based approach for the selection of oil-bearing heterotrophs from nitrogen-deficient soil for lipid production. *Applied biochemistry and biotechnology* 175(4):1926-1937.
- Lands WE (1958) Metabolism of glycerolipides: A comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 231(2):883-888.
- Larousse (2012) Biocarburant. in *Larousse*).
- Levinson WE, Kurtzman CP & Kuo TM (2007) Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enzyme and Microbial Technology* 41(3):292-295.
- Liu Y, Wang Y, Liu H & Zhang Ja (2015) Enhanced lipid production with undetoxified corncob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresour. Technol.* 180:32-39.

- Lomakin IB, Xiong Y & Steitz TA (2007) The crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together. *Cell* 129(2):319-332.
- Machado Junior F, Michelon M, Dalcanton F, Furlong E, Burkert J & Burkert C (2015) Biomass production by *Yarrowia lipolytica* as a source of lipids: bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. *International Food Research Journal* 22(3).
- Mathiazhakan K, Ayed D & Tyagi RD (2016) Kinetics of lipid production at lab scale fermenters by a new isolate of *Yarrowia lipolytica* SKY7. *Bioresource Technology* 221:234-240.
- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q & Xian M (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable energy* 34(1):1-5.
- Mittelbach M & Remschmidt C (2004) *Biodiesel: the comprehensive handbook*. Martin Mittelbach. <https://books.google.ca/books?id=OrhTAAAAMAAJ>
- Moeller L, Strehlitz B, Aurich A, Zehnsdorf A & Bley T (2007) Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences* 7(5):504-511.
- Morgunov IG, Kamzolova SV & Lunina JN (2013) The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation. *Applied microbiology and biotechnology* 97(16):7387-7397.
- Murphy D (1990) Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Progress in lipid research* 29(4):299-324.
- Nicaud JM (2012) *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29(10):409-418.
- Nigam PS & Singh A (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science* 37(1):52-68.
- Ochoa Estopier A (2012) *Analyse systématique des bascules métaboliques chez les levures d'intérêt industriel: application aux bascules du métabolisme lipidique chez Yarrowia lipolytica*. (Toulouse, INSA).
- Ortigueira J, Alves L, Gouveia L & Moura P (2015) Third generation biohydrogen production by *Clostridium butyricum* and adapted mixed cultures from *Scenedesmus obliquus* microalga biomass. *Fuel* 153:128-134.
- Osório N, Ferreira-Dias S, Gusmão J & Da Fonseca M (2001) Response surface modelling of the production of ω -3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11(4):677-686.
- Pan JG, Kwak MY & Rhee JS (1986) High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen-enriched air. *Biotechnology letters* 8(10):715-718.
- Panorama IÉN (2015a) Biocarburants de deuxième génération : une nouvelle étape est franchie.).
- Panorama IÉN (2015b) Les émissions de gaz à effet de serre du secteur du transport routier : en route

pour une inclusion dans le système européen des quotas de CO₂).

Papanikolaou S (1998) *Étude du comportement physiologique d'une souche de Yarrowia lipolytica en croissance sur des co-produits industriels: production orientée de lipides cellulaires.*

Papanikolaou S & Aggelis G (2002a) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource technology* 82(1):43-49.

Papanikolaou S & Aggelis G (2002b) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource technology* 82(1):43-49.

Papanikolaou S & Aggelis G (2003) Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Current microbiology* 46(6):0398-0402.

Papanikolaou S & Aggelis G (2011) Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8):1031-1051.

Papanikolaou S, Gortzi O, Margeli E, Chinou I, Galiotou-Panayotou M & Lalas S (2008) Effect of Citrus essential oil addition upon growth and cellular lipids of *Yarrowia lipolytica* yeast. *European journal of lipid science and technology* 110(11):997-1006.

Papanikolaou S, Komaitis M & Aggelis G (2004) Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology* 95(3):287-291.

Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G & Marc I (2002c) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of applied microbiology* 92(4):737-744.

Pareilleux A (1978) Croissance de microorganismes sur hydrocarbures: contribution à l'étude du mécanisme de transfert. *Université Paul Sabatier, Toulouse, France.*

Petroleum B (2016) BP Statistical Review of World Energy June 2016.).

Poli JS, da Silva MA, Siqueira EP, Pasa VM, Rosa CA & Valente P (2014) Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource technology* 161:320-326.

Poncet S & Arpin M (1965) Les *Candida* sans pouvoir fermentaire (Cryptococcacées). *Antonie van Leeuwenhoek* 31(1):433-464.

Portelli B (2011) *Biologie systémique et intégrative pour l'amélioration de l'accumulation et de la sélectivité des acides gras accumulés dans les espèces levuriennes.* (Toulouse, INSA).

Pruvost J, Van Vooren G, Le Gouic B, Couzinet-Mossion A & Legrand J (2011) Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresource technology* 102(1):150-158.

Rane KD & Sims KA (1993) Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095: Effect of glucose concentration on yield and productivity. *Enzyme and Microbial Technology* 15(8):646-651.

Ratlidge C (1987) Lipid biotechnology: a wonderland for the microbial physiologist. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 64(12):1647-1656.

- Ratledge C (1994) Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. *Technological advances in improved and alternative sources of lipids*, Springer. p 235-291.
- Ratledge C (2002) Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. (Portland Press Limited).
- Ratledge C (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86(11):807-815.
- Ratledge C & Dawson PSS (1984) *Biotechnology for the oils and fats industry*. The American Oil Chemists Society,
- Ratledge C & Wynn JP (2002) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology* 51:1-52.
- Rolph CE, R. S. Moreton and J. L. Harwood (1989) Acyl lipid-metabolism in the oleaginous yeast *Rhodotorula gracilis*. *Lipids* 24 (8):715-720.
- Ruangsomboon S (2012) Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. *Bioresource Technology* 109:261-265.
- Russell N, Ratledge C & Wilkinson S (1989) Microbial lipids.
- Rymowicz W, Rywińska A & Gładkowski W (2008) Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratlavia K1. *Chemical Papers* 62(3):239-246.
- Rymowicz W, Rywinska A & Zarowska B (2007) Biosynthesis of citric acid from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* in repeated-batch cultivations. *Journal of Biotechnology* 131(2):S149-S150.
- Rywińska A, Juszczak P, Wojtatowicz M & Rymowicz W (2011) Chemostat study of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of biotechnology* 152(1):54-57.
- Samorì C, Torri C, Samorì G, Fabbri D, Galletti P, Guerrini F, Pistocchi R & Tagliavini E (2010) Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. *Bioresource technology* 101(9):3274-3279.
- Sergeeva YE, Galanina L, Andrianova D & Feofilova E (2008) Lipids of filamentous fungi as a material for producing biodiesel fuel. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44(5):523-527.
- Shashi K, Bachhawat AK & Joseph R (1990) ATP: citrate lyase of *Rhodotorula gracilis*: purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1033(1):23-30.
- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J & Roessler P (1998) A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory* 328.
- Shi S, Valle-Rodríguez JO, Siewers V & Nielsen J (2011) Prospects for microbial biodiesel production. *Biotechnology Journal* 6(3):277-285.

- Sinigaglia M, Lanciotti R & Guerzoni ME (1994) Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. *Canadian journal of microbiology* 40(1):54-59.
- Sorger D & Daum G (2003) Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Applied microbiology and biotechnology* 61(4):289-299.
- Steinbüchel A & Fuchtenbusch B (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in biotechnology* 16(10):419-427.
- Stottmeister U, Behrens U, Weissbrodt E, Barth G, Franke-Rinker D & Schulze E (1981) Utilization of paraffins and other noncarbohydrate carbon sources for microbial citric acid synthesis. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 22(6):399-424.
- Suzzi G, Lanorte M, Galgano F, Andrighetto C, Lombardi A, Lanciotti R & Guerzoni M (2001) Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International journal of food microbiology* 69(1):69-77.
- Tanaka A & Fukui S (1989) Metabolism of n-alkanes. *The yeasts* 3(2).
- Timilsina GR & Shrestha A (2011) How much hope should we have for biofuels? *Energy* 36(4):2055-2069.
- Tsigie YA, Wang C-Y, Truong C-T & Ju Y-H (2011) Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology* 102(19):9216-9222.
- Vasdinyei R & Deak T (2003) Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International journal of food microbiology* 86(1):123-130.
- Walt J & Arx J (1980) The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 46(6):517-521.
- Wang Z, Zhuge J, Fang H & Prior BA (2001) Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnology advances* 19(3):201-223.
- Wayman M, Jenkins AD & Kormendy AG (1984) Bacterial production of fats and oils. *Biotechnology for the oils and fats industry. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL*:129-143.
- Wickerham LJ, Kurtzman CP & Herman AI (1970) Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science* 167(3921):1141-1141.
- Wynn JP & Ratledge C (2005) Oils from microorganisms. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*.
- Xu H, Miao X & Wu Q (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of biotechnology* 126(4):499-507.
- YAMAUCHI H, MORI H, KOBAYASHI T & SHIMIZU S (1983) Mass production of lipids by *Lipomyces starkeyi* in microcomputer-aided fed-batch culture. *Journal of fermentation technology* 61(3):275-280.

- Yarrow D (1972) Four new combinations in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 38(1):357-360.
- Yazdani SS & Gonzalez R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current opinion in biotechnology* 18(3):213-219.
- Ykema A, Kater MM & Smit H (1989) Lipid production in wheypermeate by an unsaturated fatty acid mutant of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Biotechnology letters* 11(7):477-482.
- Zhao X KX, Hua Y, Feng B, Zhao ZK (2008) Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Eur J Lipid Sci Technol* 110:405-412.
- Zinjarde SS & Pant A (2002) Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of basic microbiology* 42(1):67-73.

ANNEXE

DONNÉES BRUTES DE LA VARIATION DES CONCENTRATIONS DE LA BIOMASSE, LIPIDES, GLYCÉROL, SAVON ET FFA DURANT LES 72H DE CHAQUE FERMENTATION

	Sat. en O ₂	Biomasse (g/L)					Lipides (g/L)					Glycérol (g/L)					Savon et FFA (g/L)				
		20%	30%	40%	50%	60%	20%	30%	40%	50%	60%	20%	30%	40%	50%	60%	20%	30%	40%	50%	60%
Heures	0	3,19	3,36	3,68	3,40	4,72	ND	ND	ND	ND	ND	43,0	36,2	43,3	41,5	42,0	10,3	10,1	9,27	11,20	10,53
	6	5,52	5,52		4,66	6,92	ND	ND	ND	1,52	ND	36,4	33,8	ND	34,4	33,1	4,57	4,98	ND	8,90	9,04
	12	5,80	ND	6,40	7,08	7,81	1,85	1,13	1,96	2,64	3,69	ND	25,7	ND	ND	33,0	ND	ND	ND	8,64	ND
	18	7,60	8,52	8,76	8,96	ND	3,60	2,68	4,68	3,24	4,85	ND	16,0	41,5	26,7	32,8	5,01	5,19	8,02	7,57	ND
	24	7,68	10,5	10,8	10,4	9,60	3,68	4,76	5,54	4,34	5,42	34,6	15,4	21,5	19,8	31,9	4,87	4,34	6,83	6,37	4,90
	30	9,56	12,0	12,3	11,2	10,2	4,76	ND	6,34	5,10	5,39	30,0	14,7	20,8	14,7	30,0	2,54	2,87	6,07	5,50	4,58
	42	9,84	12,2	ND	12,6	11,6	4,84	5,75	ND	7,07	5,37	28,5	14,5	ND	11,1	26,1	2,13	2,20	ND	2,60	4,53
	48	11,0	12,3	13,1	ND	12,2	5,56	5,74	7,09	ND	5,27	26,6	14,3	15,7	9,71	ND	1,67	1,69	4,88	ND	4,45
	54	10,6	12,6	12,8	12,8	12,1	5,30	5,87	7,43	7,30	5,13	24,4	14,2	13,9	9,10	24,8	1,42	1,50	3,64	2,10	4,23
	60	10,8	ND	ND	ND	ND	5,12	ND	ND	7,31	ND	ND	11,5	12,8	ND	22,8	ND	ND	ND	ND	ND
	66	10,8	12,6	12,8	13,6	ND	4,87	5,32	6,66	6,77	5,13	ND	11,4	10,8	7,27	22,4	1,33	1,33	3,64	2,00	ND
	72	10,7	11,9	12,8	13,8	12,5	4,62	5,24	6,07	6,46	5,07	24,0	11,1	8,35	7,05	21,1	1,28	1,31	2,91	1,88	3,91

ND : Non déterminé