

# INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN METHANOL SUR LA CROISSANCE AEROBIE DE LA LEVURE HANSENULA POLYMORPHA. (\*)

par A. AMMOUCHE et G. SELSELET ATTOU

Institut Nationale Agronomique - El Harrach - Alger.

## RESUME.

Dans les conditions de culture adoptées, la concentration optimale de méthanol pour la croissance de la levure *Hansenula polymorpha* est comprise entre 0,7 à 0,9 % (v/v).

A ces concentrations le taux de division cellulaire en cours de phase exponentielle est en moyenne égal à 0,23 H-1. En ce qui concerne les rendements en biomasse obtenus, on constate que ceux ci sont d'autant plus faibles que la concentration en méthanol est élevée.

La possibilité d'utiliser les composés ne possédant qu'un seul atôme de carbone comme unique source d'énergie, a été constatée pour la première fois chez certains microorganismes en 1906. Il a fallu attendre une cinquantaine d'années plus tard, pour que paraissent les premiers travaux effectués sur la fermentation du méthanol par des bactéries.

Les premières expériences effectuées sur les levures ont été publiées par OGATA et coll. en 1969. Actuellement de nombreux chercheurs s'intéressent à ce domaine (5, 6, 7, 10, 11). De toutes les matières premières susceptibles d'être utilisées comme source de carbone pour la production de levure aliment, le pétrole et ses dérivés sont celles dont les disponibilités sont les plus grandes. Parmi ces substrats pétroliers, le méthanol présente certains avantages par rapport aux hydrocarbures (2). Cependant le méthanol présente également certains inconvénients, notamment ses effets inhibiteurs à de forte concentration et son évaporation en cours de fermentation.

L'Algérie est un grand producteur de méthanol (Unité de production d'Arzew) susceptible d'être employé comme substrat de fermentation. Actuellement 99% de la production nationale est exporté. Le Ministère de l'Industrie

---

(\*) Extrait des Comptes rendus des journées du CERAG (23-30 Mars 1978).

en liaison avec les organismes du Ministère de l'Agriculture s'intéresse aux possibilités d'utilisation locale du méthanol pour la production de protéines non conventionnelles.

Dans ce travail, on se propose l'analyse de la pureté du méthanol produit à l'Unité d'Arzew, la détermination de la concentration optimale dans le milieu de culture pour la souche de levure *Hansenula polymorpha*. A l'occasion de cette étude nous évaluons les pertes de méthanol en cours de fermentation et les rendements en biomasse obtenus dans nos conditions expérimentales.

#### MATERIEL ET METHODE.

1) *Milieu d'entretien gélosé*: la souche *Hansenula polymorpha* est entretenue sur gélose inclinée et repiquée une fois par mois. La composition du milieu d'entretien est la suivante.

##### *Composition du milieu d'entretien en g/l (8).*

Milieu sec de Sabouraud . . . . .	45
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	2
KCl . . . . .	0,08
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0,08
MgSO <sub>4</sub> . . . . .	0,4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,42
CaCl <sub>2</sub> . . . . .	0,03
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0,4
Mn Cl <sub>2</sub> . . . . .	0,10
Fe Cl <sub>2</sub> . . . . .	0,01
CH <sub>3</sub> OH . . . . .	1,26
Eau du robinet . . . . .	Q.S.P. 1 litre

Le milieu est ajusté à pH 5,5 et stérilisé à 115°C pendant 30 mn. Le méthanol stérilisé à part est additionné stérilement après le refroidissement du milieu.

2) *Milieu de culture*: La composition du milieu de culture que nous avons adopté est celle utilisée pour des pseudomonas speci sur méthanol (8). Cette composition en g/l est la suivante:

Méthanol . . .	Concentration variable entre 0 et 2 % V/V
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	. 5 g
KCl . . . . .	. 0,08
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	. 0,08
Mg SO <sub>4</sub> . . . . .	. 0,4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	. 0,42
Ca Cl <sub>2</sub> . . . . .	. 0,03
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	. 0,4
Mn Cl <sub>2</sub> . . . . .	. 0,01
Fe Cl <sub>2</sub> . . . . .	. 0,01
Eau robinet Q.S.P. . . . .	. 1 litre

Le milieu de culture ainsi constitué est ajusté à pH 5.2 à l'aide d'acide chlorhydrique (1 N). La stérilisation est effectuée en autoclave à 116° C pendant 30 Minutes.

3) *Conditions de culture*: Les cultures ont été réalisées en mini-fermenteur (New Brunswick scientific) de capacité 1 litre. Le volume de milieu utilisé pour chaque fermentation a été de 700 ml avec une agitation maximum. Les paramètres de croissance utilisés pour les cultures sont les suivants.

Température . . . . .	37° C
pH . . . . .	5,2
Aération . . . . .	1 l/minute

Ces paramètres correspondent à ceux définis par les travaux de LEVINE et COONEY sur la souche *Hansenula polymorpha* en 1973.

4) *Moyens d'études de la croissance*: Le contrôle de la croissance a été réalisé par des mesures de densité optique et de rendement pondéral. L'évolution de la densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Perkins Elmer) à 540 nm par comparaison avec une souche standard. La récolte des

cellules se fait par centrifugation à 3500 tr/mn. Le poids sec est effectué par séchage à 110° C jusqu'à poids constant.

Pour des raisons techniques le méthanol est analysé selon deux méthodes.

— Par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes:

Carbowax 400 à 10% sur chromosorb lavé aux acides.

Détecteur à ionisation de flamme.

Température de la colonne 90° C.

Température à l'injecteur 120° C.

Température du manifold 130° C.

Rotamètre sur 40 nm/mn.

Prise d'essai 0,05 µl.

L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse du méthanol est probablement la plus intéressante. Cependant il ne nous a pas été possible de nous placer dans des conditions préconisées par plusieurs auteurs (LEVINE et COONEY). Nous avons donc adopté une seconde méthode fréquemment employée en Oenologie.

— Dosage par colorimétrie utilisant l'acide chromotropique après oxydation par le permanganate. Cette deuxième méthode a permis d'évaluer les pertes en méthanol par évaporation dans les conditions de culture fixées.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS.

1) *Analyse du méthanol*: L'analyse qualitative du méthanol réalisée en chromatographie gazeuse dans les conditions décrites ci-dessus met en évidence une grande pureté de ce substrat. Seule l'acétone à l'état de traces est détecté tel le montre le chromatogramme.

2) *Pertes en méthanol par évaporation*: Nous avons mesuré l'évaporation totale au cours des essais à blanc en se plaçant dans les conditions normales de culture. Les variations des teneurs en méthanol enregistrées dans le temps sont indiquées dans le tableau 1.

On constate que la perte globale en méthanol au bout de 30 heures est de l'ordre de 3,8%. Celle-ci est due essentiellement à l'effet conjugué de la température (37° C), de l'agitation et de l'aération appliquées au milieu de culture.

TABLEAU 1 - *Les pertes en méthanol par évaporation.*

Durée d'incubation en heures	Teneur en méthanol en g/l dans le milieu
0	15,5
10	15,4
20	15,1
30	14,9

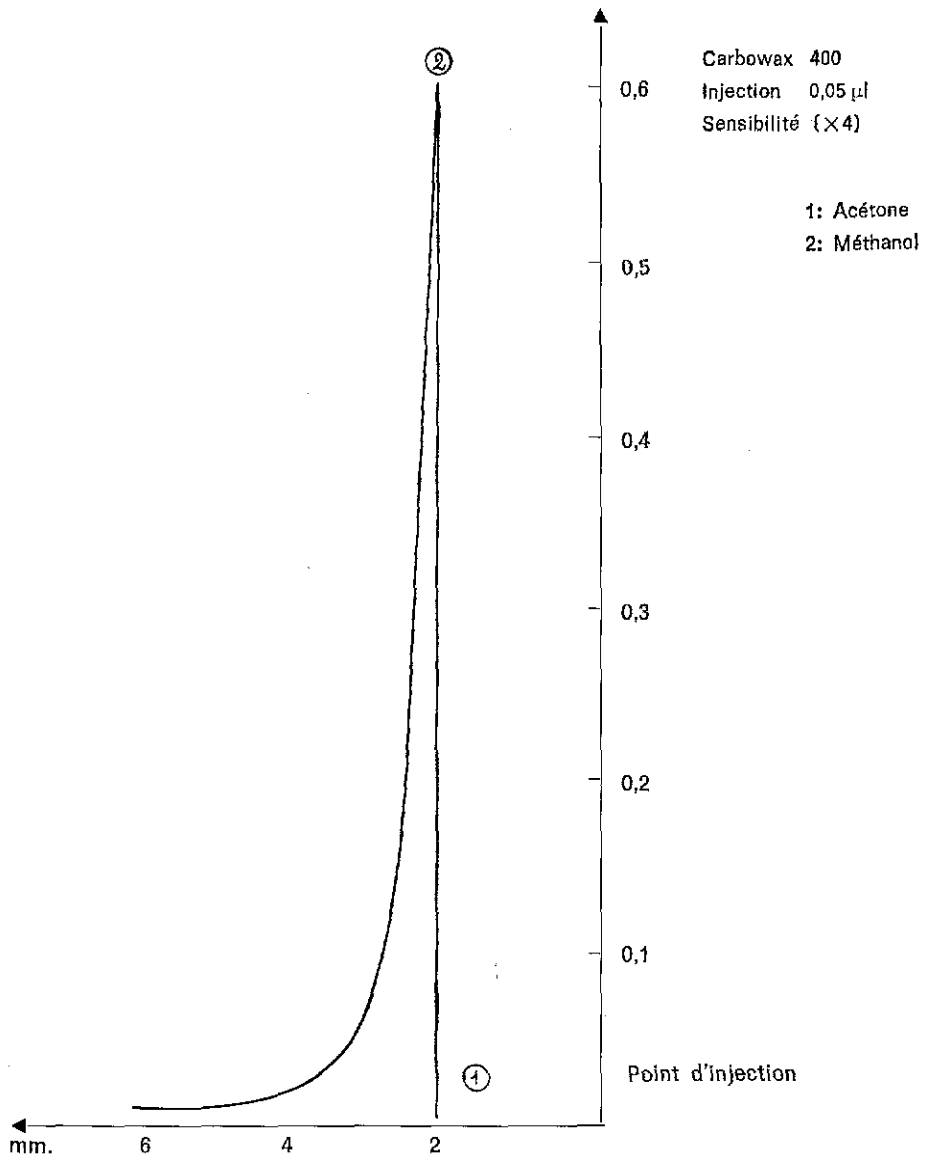
3) *Croissance de Hansenula polymorpha en présence de différentes concentrations en méthanol.*

Pour chacune des concentrations en méthanol, il a été réalisé deux essais de culture.

Les courbes de croissance enregistrées pour les différentes concentrations sont indiquées dans le graphique n. 1.

TABLEAU 2 - *Les différentes concentrations de méthanol utilisées.*

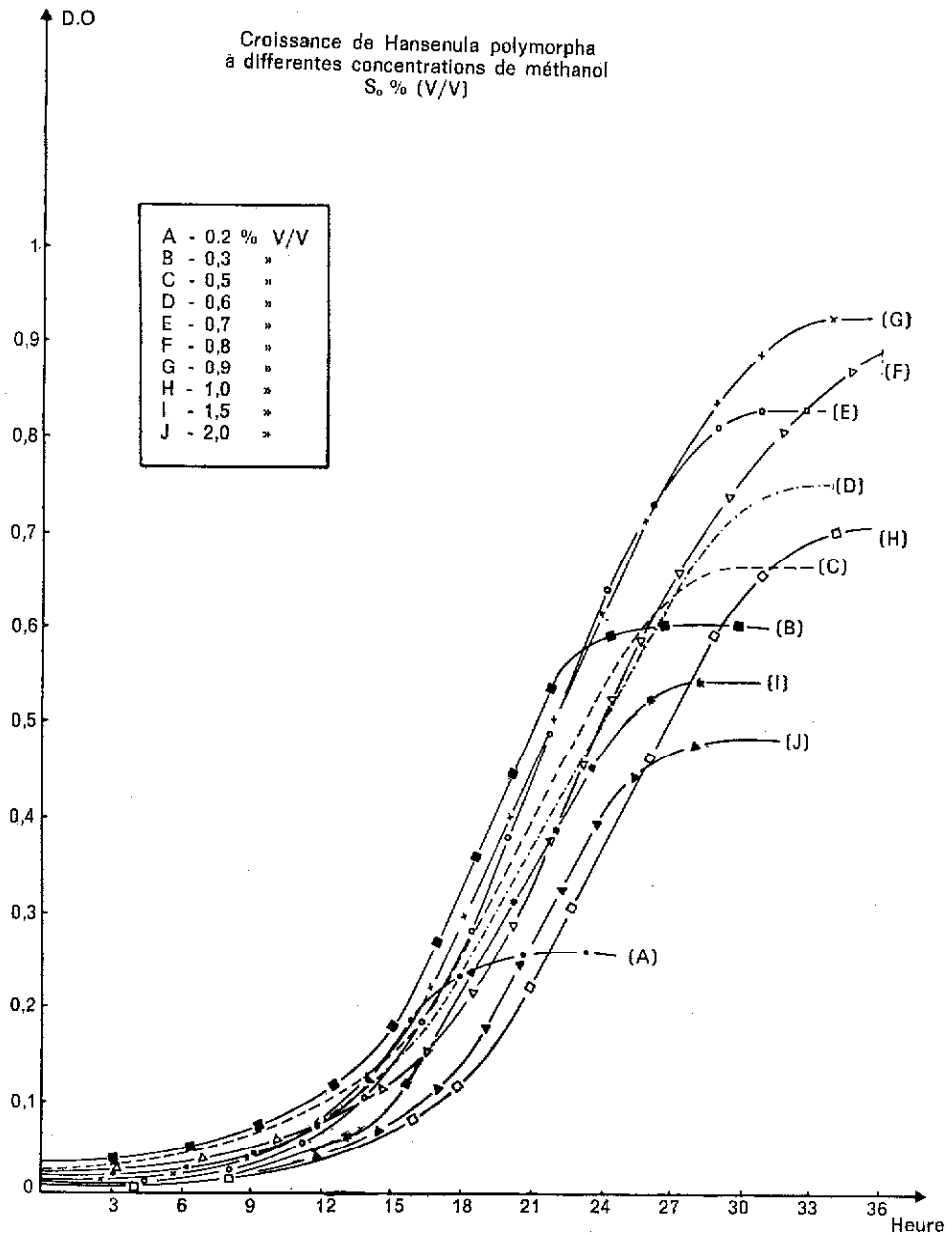
Essais N°	Méthanol en % V/V
I	0,2
II	0,3
III	0,5
IV	0,6
V	0,7
VI	0,8
VII	0,9
VIII	1,0
IX	1,5
X	2,0



Chromatogramme du méthanol

*Taux de croissance:* Les taux de croissance aux différentes concentrations en méthanol sont résumés dans le tableau 3. Il s'agit des taux de croissance maximum correspondant à la phase exponentielle de multiplication.

Nous remarquons d'après ce tableau et le graphique précédant que les concentrations de ce substrats qui donnent lieu à des taux de croissance maximum sont de 0,7 à 0,9% V/V. Pour les concentrations en méthanol allant de



Graphique N.° 1.

TABLEAU 3 - Variation du taux de croissance en fonction de la concentration en méthanol.

Essais N°	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Concentration en méthanol % V/V	0,2	0,3	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,5	2
$\mu$ (H <sup>-1</sup> )	0,20	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,23	0,20	0,16

S

0,2 à 0,7% V/V. La croissance suit la cinétique de Monod  $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$

Le substrat constitue un facteur limitant par défaut pour l'évolution de la culture. Alors que les concentrations supérieures à 0,9% (V/V) se traduisent par une diminution du taux de croissance et une réduction de la phase exponentielle. Dans cette zone, on assiste à un effet inhibiteur du méthanol sur la croissance de la levure (graphique n. 2).

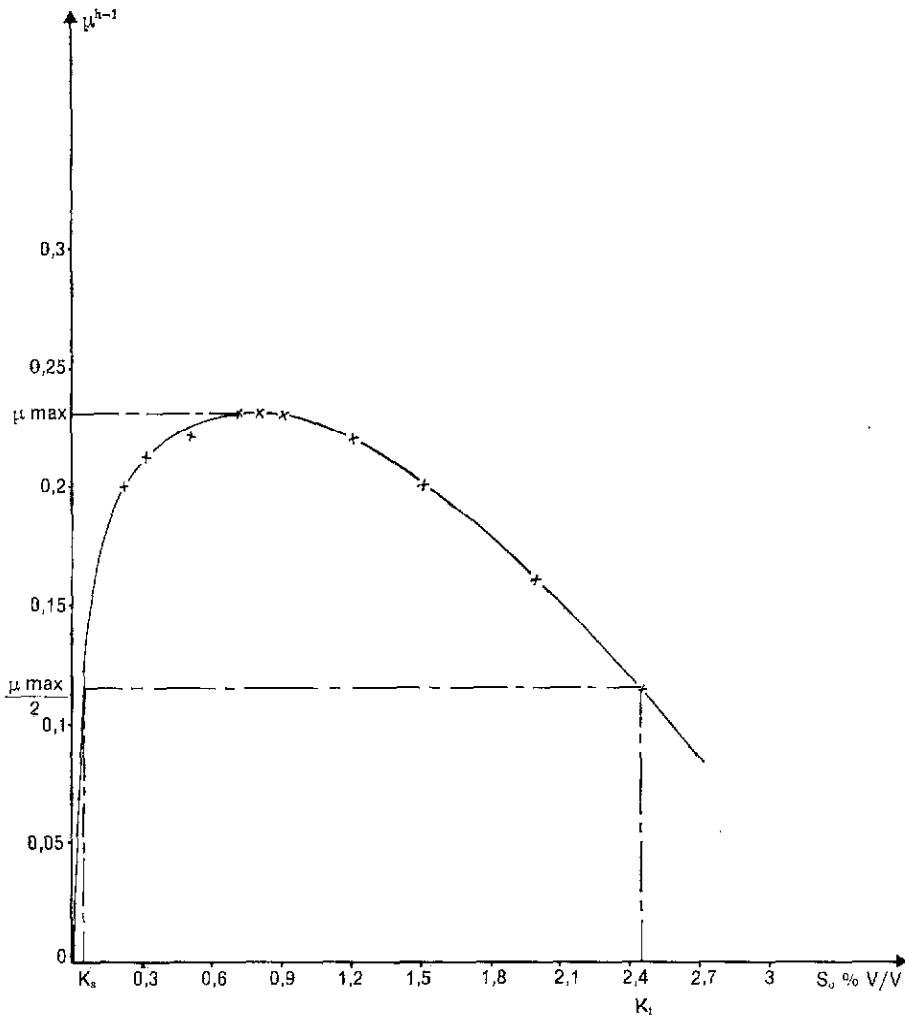
*Phase de latence:* Les différences constatées dans la durée des phases de latence, entre les divers essais ne sont probablement liées qu'au procédé d'ensemencement appliqué. Nous utilisons directement comme inoculum, une suspension de cellules prélevées du milieu d'entretien gélosé et diluées ensuite dans l'eau physiologique à 9‰ de NaCl. Néanmoins, il semble que la durée de la phase de latence soit liée à la concentration en méthanol. En effet on peut remarquer sur le graphique des courbes de croissance que cette durée est d'autant plus longue que la concentration en méthanol est élevée. Tout se passe, comme si la cellule présente un temps d'adaptation à l'utilisation du méthanol et dont la durée serait fonction de la concentration.

TABLEAU 4 - Variation des rendements en fonction de la concentration en méthanol.

Concentration en méthanol % V/V	0,2	0,3	0,5	0,9	1	1,5	2
R <sup>dt</sup> en %	28	27	24	23	23	20	18



Influence de la concentration en méthanol  
sur le taux de croissance



Graphique N.° 2.

*Rendement:* Les rendements en biomasse  $\frac{Q_{te} \text{ de biomasse p. sec}}{Q_{te} \text{ de sub. consommé}}$  obtenus pour chaque concentration ont été les suivants.

Nous constatons que le rendement maximum est obtenu pour la concentration la plus faible. On note que les rendements sont inférieurs à la valeur

théorique qui est de l'ordre de 50% (4). Ces faibles rendements obtenus expérimentalement laissent supposer que les conditions de cultures adoptées ne sont sans doute pas les meilleures.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) COONEY C. L. et LEVINE D. W., 1973 - *Isolation and characterisation of a thermotolerant méthanol utilizing*. « Applied microbiology », V. 26, N. 6, 982-990.
- (2) COONEY C. L., LEVINE D. W. et BRADLEYS, 1975 - *Production of single-cell protein from methanol*. P. 33 - 42 MIT Cambridge.
- (3) COONEY et MAKIGUCHI, 1975 - *An assesment of single-cell protein from methanol*. Grown yeast congres du Nov. au 5 Déc. (Mexico).
- (4) HARUYA TEZEKA, 1975 - *Production of yeast cells from methanol*. « Agr. Biol. Chem. », 39 (1), 285-286 (Tokyo).
- (5) KOSARIC N. et ZAJIC J. E. - *Microbial oxidation of methane and methanol*. Apria 78802, 89-125.
- (6) LLYODS S., 1974 - *S.C.P. the methanol way food engineering*. Juillet 1974, 68-71
- (7) PILAT P. et PROCOP P., 1975 - *The effect of methanol, formaldebyde and formic acid on growth of candida 11 B.H.* « Biotech. and bioeng. », vol. XVII, n. 12, 1717-1728.
- (8) QUEVEDO J., 1976 - *Contribution à des études d'identification et de conduite numérique en fermentation continue sur méthanol*. Thèse de Doctorat Université Paul Sabatier de Toulouse.
- (9) STEVEN R., JANNEBAUM et WAMG I. C., 1975 - *Single-cell protein*. Tom II, Editors.
- (10) YASUHAROV, 1974 - *Yeast utilizing methanol as a sole carbone source*. « Journal ferment technology », vol. 52, n. 4, 201-229.