

# La production de l'invertase durant la fermentation de l'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* YME S2 thermotolerante

## *The invertase production during ethanol fermentation by thermotolerant Saccharomyces cerevisiae YME S2*

Latifa JAMAI<sup>1\*</sup> & Mohamed ETTAYEBI<sup>2</sup>

1. Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agro-Alimentaire et Santé (LBEAS), Faculty of Sciences DM, University USMBA, Fez. Morocco \*(latijamai@gmail.com).

2. Laboratoire de Biotechnologie, Conservation et Valorisation des Ressources Naturelles (LBCVRN).

**Résumé.** L'utilisation de matières premières renouvelables pour la production du bioéthanol issu de première génération est très sollicitée. Ce travail vise le développement de stratégies pour améliorer les différents types de procédés de production du bioéthanol de première génération par l'utilisation d'une levure thermotolerante *Saccharomyces cerevisiae* YME S2, résistante aux hautes températures supérieures à 40°C et à l'éthanol 12% valorisant son application dans des procédés SSF (Saccharification et Fermentation Simultanées). Cette souche montre en plus une production accrue de l'activité invertase nécessaire pour la fermentation du sucrose présent dans des substrats comme la canne à sucre. L'amidon est le composé organique le plus répandu après la cellulose. Sa fermentation en éthanol nécessite un prétraitement d'hydrolyse généralement onéreux à cause du coût élevé des enzymes amylolytiques utilisées et la dépense énergétique liée à cette hydrolyse. Le prétraitement de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase conduit à une amélioration du taux d'éthanol produit par *S. cerevisiae* YME S2 de 400%. La quantité d'éthanol produite par *S. cerevisiae* YME S2 recombinée pourvue du gène AMYI de l' $\alpha$ -amylase est quatre fois plus élevée, d'où l'intérêt de son utilisation dans des procédés de type bioprocédés consolidés (CBP) très demandés dans la fermentation de substrats amylicés. Cette souche de levure, dont le gène SUC2 est naturellement amplifié, sécrète une activité invertase très précoce et élevée durant la phase logarithmique de croissance. La purification donc de l'invertase comme coproduit de la fermentation, rend l'utilisation de *S. cerevisiae* YME S2 dans le processus de production de bioéthanol plus économique et attractive.

**Mots clés:** Bioéthanol, Amidon,  $\alpha$ -amylase, Saccharification et fermentation simultanées, Bioprocédés consolidés.

**Abstract.** The use of renewable raw materials for the production of first generation bioethanol is in great demand. This work aims to develop strategies for improving different types of production processes of the first-generation bioethanol by using a thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* YME S2, resistant to high temperatures above 40°C, 12% ethanol, and enhancing its application in the SSF process (Simultaneous Saccharification and Fermentation). Additionally, this strain shows an enriched production of invertase activity necessary for the fermentation of sucrose present in substrates like sugarcane. Starch is the second most common organic compound after cellulose. Its ethanol fermentation requires an expensive hydrolysis pretreatment due to the cost of amylolytic enzymes used and the energy required for hydrolysis. Pretreatment of starch by  $\alpha$ -amylase leads to an increased ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* YME S2 of 400%. The amount of ethanol produced by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* YME S2 endue with  $\alpha$ -amylase AMYI gene is four times higher which constitutes a significant advantage to use it in Consolidated Bioprocesses (CBP) highly demanded in the fermentation of starchy substrates. This yeast, whose SUC2 gene is naturally amplified, secretes a high and early invertase activity during the logarithmic growth phase. The purification of invertase as a co-product of fermentation makes the use of *Saccharomyces cerevisiae* YME S2 in bioethanol production process more economical and attractive.

**Keywords:** Bioethanol, Starch,  $\alpha$ -amylase, Simultaneous saccharification and fermentation, Consolidated bioprocesses.

### Abridged version

#### Introduction

Renewable energies development increases energy independence, mitigates environmental impact by limiting greenhouse gases emissions and enhances economic competitiveness. First-generation bioethanol, a renewable energy gaining large interest, is produced from saccharogenic and starchy plants. However, distilling yeasts commonly used in first-generation bioethanol production lack amylolytic activities. Hence, ethanol production from starch requires either an expensive hydrolysis pre-treatment due to enzymes cost, or the use of recombinant yeast strains capable of synthesizing the amylolytic enzymes (Yamada *et al.* 2011). The application of SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) process contributes to the resolution of problems related to temperature increase and high ethanol concentration inside the fermentation tanks (Abreu-Cavalheiro & Monteiro 2013). It enables the improvement of enzymes efficiency, while minimizing the risks of contamination as well as the inhibition reactions of the enzymes by the products

formed. This process allows energy savings and subsequently a reduction in the cooling cost. However, its disadvantage resides in the differences between the optimum temperatures of the enzyme and the fermentation agent. The search for microorganisms with good fermentation performance at high temperatures is key in addressing this challenge (Castro & Roberto 2014, Faga *et al.* 2010).

The adoption of the Consolidated Bioprocessing (CBP) is of great economic importance (Favaro *et al.* 2013) as it integrates both the production of ethanol and the synthesis of enzymes required by a single microorganism in the same industrial process.

#### Objectives and Methodologies

In the search for yeast strains capable of withstanding the multiple stresses that accompany the different types of first-generation bioethanol production processes, this article presents the capabilities of a thermotolerant strain *Saccharomyces cerevisiae* YME S2 in ethanol production from starch by two methods. While the first method consists of

treating the substrate with exogenous  $\alpha$ -amylase, the second method consists of the independent introduction of two cloning vectors, pYZA-AMY1 and pYZM-AMY1 endowed with the gene AMY1 of *Sc. Occidentalis* and respectively carrying an origin of replication ARS (Autonomously Replicating Sequence) and 2  $\mu$ . Besides, this work reveals an increased production by this yeast strain of the invertase activity necessary for the fermentation of sucrose present in substrates such as sugar cane.

## Results and Discussion

The demonstration of the activity of starch hydrolytic enzymes is carried out by comparing ethanol production from starch treated and non-treated with exogenous  $\alpha$ -amylase in three species of yeast: 1) *C. tropicalis* YME C14 endowed with a glucoamylase activity, 2) *Sc. Occidentalis* ATCC 26077 endowed with  $\alpha$ -amylase activity, and 3) *S. cerevisiae* YME S2 devoided of any amylolytic activity. The results show that the treatment of starch with exogenous  $\alpha$ -amylase leads to a very significant improvement in ethanol production by the three species tested (i.e. 100% in the case of *C. tropicalis* YME C14 and *Sc. Occidentalis* ATCC 26077 and 400% in the case of *S. cerevisiae* YME S2 as shown in Fig. 2A). The ethanol yield for *S. cerevisiae* YME S2 is 5 times higher (Tab. 2). The lower ethanol production by *S. cerevisiae* YME S2 is due to the lack of encoding genes of glucoamylase or  $\alpha$ -amylase that exist in the other two species tested. Variables optimization shows that the highest ethanol production is achieved at a starch concentration of 9% (Fig. 2B) for the three strains tested. *S. cerevisiae* YME S2 and *C. tropicalis* YME C14 exhibit thermotolerance as ethanol production remains almost stable up to 42°C (Fig. 2C). There is also a maximal and constant secretion of ethanol by the three strains over a wide pH range (i.e. from 5.5 to 7) as shown in (Fig. 2D).

Genetic improvement of *S. cerevisiae* strain YME S2 by transformation with plasmids pYZM-AMY1 and pYZA-AMY1 leads to an acceleration of the cellular metabolism and an increase of 280% and 190% respectively compared to a non-transformed control strain in the absence of exogenous  $\alpha$ -amylase (Fig. 4A). The treatment of starch with exogenous  $\alpha$ -amylase causes an increase in ethanol production. Its presence in the fermentation medium exerts a cumulative effect with the endogenous enzyme in both transformants (Fig. 4B). The difference in the results observed between the transformations of *S. cerevisiae* strain YME S2 with the two aforementioned shuttle vectors can be explained by the instability of the plasmid pYZA-AMY1 as well as the nature of its origin of replication ARS that produces fewer plasmid compared with the origin of replication 2 $\mu$ . *Maximum ethanol production by the two transformants is higher than the one by S. cerevisiae carrying the glucoamylase (STA1) gene on its chromosome. This finding is similar to the one obtained by other researchers who used transformed S. cerevisiae with both genes  $\alpha$ -amylase and glucoamylase (Eksteen et al. 2003, Yamada et al. 2011).*

Sucrose is the primary source of carbon in bioethanol production by *S. cerevisiae*. This sugar is metabolized in

two different ways by the yeast. It is either hydrolysed by extracellular invertase into glucose and fructose and then absorbed or metabolized by the glucose pathway, or absorbed directly via a proton-sucrose symport followed by hydrolysis and intracellular metabolism. The hydrolysis of sucrose in *S. cerevisiae* occurs primarily in the extracellular medium.

In this work, *S. cerevisiae* YME S2 has proved to be very saccharolytic. It shows the existence of two forms of sucrose activity which succeed each other during the different growth phases. The first form is the extracellular invertase activity which increases from the beginning of the growth until the end of the exponential phase. The second form is cellular invertase which is almost inexistent at the beginning and then rapidly increases to reach its maximum value during the stationary phase (Fig. 5). These results are in agreement with those of (Basso et al. 2011) that show a very fast synthesis of the external form of invertase in *S. cerevisiae* between the beginning and the middle of the logarithmic phase of growth.

To optimize the heterologous production of invertase in *Yarrowia lipolytica*, *S. cerevisiae* SUC2 gene was cloned under the control of a strong promoter and an optimized signal peptide (Lazar et al. 2013). The maximum values obtained are slightly lower than those obtained in the aforementioned study using unmodified *S. cerevisiae* YME S2 natural strain. To try to understand the behavior of this strain of yeast, we have opted for the method of comparative genomic which demonstrated that unlike most known laboratory yeast strains (e.g. strain S1278b), the SUC2 gene responsible for synthesis of invertase is naturally amplified in *S. cerevisiae* YME S2 (unpublished results).

The very early and high secretion of extracellular invertase by *S. cerevisiae* YME S2 is an interesting property not only in the production of bioethanol but also in other industrial processes such as baking and sweet syrups production. In fact, invertase is an enzyme widely used in the food and beverage industries. It is also used in artificial honey production, plasticizers used in cosmetics, pharmaceuticals, paper industry, as well as enzymatic electrodes for sucrose detection. Therefore, *S. cerevisiae* YME S2 can be further valorized for the production of bioethanol from other abundant sources of carbon such as inulin and cellulosic biomass.

## Conclusion

This work highlights the competences of *Saccharomyces cerevisiae* YME S2 strain in alcoholic fermentation. The results show that *S. cerevisiae* is capable of sustaining high temperatures (i.e. 45°C) and very high ethanol concentrations (i.e. 12%) which are toxic for other yeast strains. The transformation of *S. cerevisiae* YME S2 specifically with pYZM-AMY2 plasmid is a successful transformation leading to a very clear improvement of all the state parameters. The quantitative importance of the extracellular form of the secreted invertase resides in its potential for industrial producers of ethanol or baker's yeasts and taking advantage of its performance and extracting the enzyme as a co-product from the unexploited culture medium.

## INTRODUCTION

Le développement des énergies renouvelables permet d'améliorer l'indépendance énergétique, d'atténuer l'impact sur l'environnement en limitant les émissions de gaz à effet de serre et de stimuler l'économie. En effet, le bioéthanol a commencé à être développé à grande échelle dans les années 1970 au Brésil et aux États-Unis (Hii et al. 2012), il est le plus

disponible sur le marché actuel (Vimmerstedt et al. 2012). Ce biocarburant issu de la première génération est produit de végétaux de types différents, les plantes amylacées comme les pommes de terre et le maïs, ainsi que les plantes saccharigènes telles que la betterave et la canne à sucre. Ces substrats sont les plus abondants après la cellulose et constituent des sources importantes de matières premières valorisables qui peuvent être dépolymérisées en sucres fermentescibles. Les levures

de distilleries communément utilisées étant dépourvues des activités amylolytiques. La production d'éthanol à partir d'amidon nécessite un prétraitement d'hydrolyse généralement onéreux à cause du coût des enzymes. Afin d'améliorer la fermentation directe de l'amidon en éthanol en éliminant l'étape de saccharification, plusieurs souches de *S. cerevisiae* ont été développées génétiquement capables d'exprimer l'activité glucoamylase et/ou  $\alpha$ -amylase (Kim *et al.* 2010).

Quoique le processus de production de bioéthanol issu de la première génération soit le mieux maîtrisé, les conditions de fermentation dans des bioréacteurs en réservoirs ouverts de grande capacité créent plusieurs types de stress aux cellules de levures, dont les principaux sont les températures élevées et les fortes concentrations d'éthanol à l'intérieur des cuves de fermentation (Abreu-Cavalheiro & Monteiro 2013). En raison donc du grand volume d'éthanol qui est produit et commercialisé chaque année, toute petite amélioration dans le processus pourrait représenter une économie de milliards de dollars.

En effet, le développement du procédé SSF (Saccharification et Fermentation Simultanées), contribue à la résolution de ces problèmes, il permet d'améliorer l'efficacité des enzymes, en minimisant aussi bien les risques de contamination que les réactions d'inhibition des enzymes par les produits formés. Il permet aussi une réduction du coût de refroidissement et par la suite une économie d'énergie ; par contre le taux de saccharification et de fermentation s'est avéré très élevé. Son inconvénient est lié aux différences entre les températures optimales de l'enzyme et de l'agent de fermentation. La recherche de micro-organismes conservant de bonnes performances fermentaires à température élevée est un facteur primordial dans la résolution de cette problématique (Castro & Roberto 2014, Faga *et al.* 2010). De même l'application du procédé de type bioprocédés consolidés (CBP) est d'une grande importance économique (Favaro *et al.* 2013). Il intègre à la fois la production d'éthanol et la synthèse d'enzymes nécessaires par un seul microorganisme dans un même procédé industriel.

Dans la recherche de souches de levures capables de résister aux stress multiples qui accompagnent les différents types de procédés de production du bioéthanol de première génération, ce travail présente les capacités d'une souche thermotolérante *Saccharomyces cerevisiae* YME S2, qui résiste à des concentrations élevées d'éthanol et qui montre une production accrue de l'activité invertase nécessaire pour la fermentation du sucrose présent dans des substrats comme la canne à sucre. Elle est aussi capable de fermenter l'amidon en éthanol à un taux très élevé à des températures allant jusqu'à 40°C une fois transformée par l'introduction du gène de l' $\alpha$ -amylase de *Schwanniomyces occidentalis*.

## MATERIELS ET METHODES

### Milieux de cultures et de fermentations alcooliques

Les cultures et les fermentations alcooliques des levures sont faites sur les milieux suivants : a) YPG et YPS constitués des mêmes composés, sauf que dans le milieu YPS le saccharose remplace le glucose. De plus, dans les conditions de cultures oxydatives, la concentration du sucre dans le milieu est de 2% seulement, et de 15% dans les conditions de fermentations alcooliques ; (Extrait de levure 1% (p/v), Peptone 2% (p/v) Saccharose ou Glucose 2% (p/v)). b) YPA même composition que les deux précédents mais la source de carbone est remplacée par l'amidon à 9%.

### Isolement et purification des souches de levures

Les souches de levures utilisées dans la réalisation de cette étude sont isolées à partir d'un fruit sec, selon la technique

d'enrichissement : 50 ml d'un milieu sélectif pour les levures, YPS/Ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et Tétracycline (12,5  $\mu$ g/ml) sont inoculés par le fruit coupé en petits morceaux ; après 48h d'incubation à 37°C sous agitation, 100  $\mu$ l de la culture obtenue sont dilués à  $10^{-4}$  et étalés sur une boîte de pétri du milieu YPS-agar. La purification des souches qui ont poussé est réalisée par la technique d'épuisement sur d'autres boîtes de pétri du même milieu incubées à 37°C. La purification est achevée (après observation au microscope) quand un type de colonie est constitué par une souche pure.

### Identification des souches de levures

L'identification des souches de levures isolées, est entreprise par amplification par PCR d'une partie de l'ADN ribosomique, la région ITS (Internal Transcribed Spacer), en utilisant les amorces universelles :

ITS-1,5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' et ITS-4, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' avec le kit MyTaq (Bioline). Le processus d'amplification, comprend une étape de dénaturation initiale d'une minute à 96°C, suivi de 25 cycles, composés chacun d'une dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, une hybridation de 5 secondes à 50°C et une élongation à 60°C pendant 4 minutes.

Après une électrophorèse sur gel d'agarose, les produits de PCR sont purifiés à l'aide du Kit ExoSAP-IT (Affymetrix) dans le but d'éliminer les amorces et les nucléotides (dNTPS) non utilisés durant la réaction de PCR.

Cette purification est suivie par un séquençage selon la méthode de Sanger sur un ABI 3130xl Genetic Analyzer (séquenceur 16 capillaires) (Applied Biosystems) en utilisant le Kit « Big Dye Terminator v3.1 ou v1.1 cycle sequencing » (Applied Biosystems) et le tampon « Big Dye terminator 5X sequencing buffer » (Applied Biosystems), conservés à -20°C. Le volume du mélange réactionnel est de 20  $\mu$ l, il contient : 4  $\mu$ l du Big Dye, 2  $\mu$ l du 5X sequencing buffer, 4  $\mu$ l des amorces (0.8 pmol/ $\mu$ l), 1.5  $\mu$ l de l'ADN matrice et 8.5  $\mu$ l d' $H_2O$  (MiliQ). Le passage dans le séquenceur est fait en utilisant le logiciel data collection v3.0 (Applied biosystems) et les résultats sont analysés à l'aide du logiciel « sequencing analysis v 5.3.1 » (Applied biosystems).

### Cinétique de fermentation en batch

La cinétique de fermentation en batch est réalisée dans un fermenteur Bioflo (New Brunswick Scientific, NJ, USA), contenant 1,3 litre de milieu YPA à 9% d'amidon, traité par la dose optimale d' $\alpha$ -amylase et inoculé avec  $6.10^8$  cellules de *S. cerevisiae* YME S2 par 1ml de milieu de culture dans les conditions optimales de pH et de température, l'agitation est maintenue constante à 450rpm. Des prélèvements sont réalisés toutes les six heures pour le dosage de l'éthanol, des sucres réducteurs et de l'amidon. La cinétique de fermentation en batch est réalisée en présence et en absence de l' $\alpha$ -amylase exogène.

### Construction du vecteur de clonage

Deux vecteurs de clonage sont construits, pYZA-AMY1 et pYZM-AMY1. Ils portent respectivement une origine de réplication ARS (Autonomously Replicating Sequence) et 2 $\mu$ , ils se répliquent de façon autonome aussi bien chez *S. cerevisiae* et *E. coli* (Fig. 1). Les deux vecteurs sont pourvus du gène AMY1 de *Sc. occidentalis* et de deux gènes de résistances à la zéocine et à l'ampicilline pour la sélection chez les levures et les bactéries respectivement. La transformation de *S. cerevisiae* par ces plasmides est réalisée par électroporation.



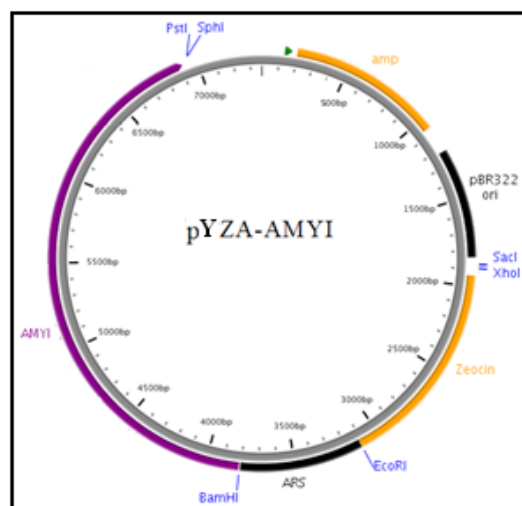


Figure 1. Vecteur de clonage pYZA-AMY1. Plasmide pYZM-AMY1 est similaire sauf que l'origine 2 $\mu$  remplace ARS.

Figure 1. Cloning vector pYZA-AMY1. pYZM-AMY1 plasmid is similar except that the origin 2 $\mu$  replaces ARS.

### Les méthodes analytiques

Le dosage des sucres réducteurs est réalisé selon la méthode de Miller (Jamai *et al.* 2007). Le taux d'éthanol est déterminé par chromatographie en phase gazeuse (PYE UMICAM PU 4500). L'activité  $\alpha$ -amylase est mesurée selon la méthode de décoloration à l'iode établie par Smith et Rose (Lazar *et al.* 2013). La technique employée pour l'extraction de l'invertase cellulaire est celle décrite par Fischer *et al.* (Faga *et al.* 2010), avec quelques modifications, son activité saccharolytique est évaluée par le dosage au réactif DNS des sucres réducteurs issus de l'hydrolyse du saccharose.

## RESULTATS

### Détermination de la température optimale de production d'éthanol

Dans les conditions optimales de pH (entre 5,5 et 7), de la concentration du saccharose, 15% (p/v) et après 24 heures de fermentation à cinq températures différentes (22, 30, 37, 40 et 42°C), les quantités d'éthanol produites par *S. cerevisiae* YME S2 sont dosées. Elles montrent une augmentation quand la température passe de 22 à 30°C, puis se stabilisent entre 30 et 42°C, avec un rendement très important de 0,47 et une productivité maximale de 2,97g/l/h (Tab. 1). Ces résultats montrent bien la propriété thermorésistante de *S. cerevisiae* YME S2, du fait qu'elle convertit des quantités importantes de carbohydrates en éthanol à des taux assez élevés et stables malgré les variations de la température.

Tableau 2. Production d'éthanol par les différentes souches étudiées à partir de 9% d'amidon à 40°C pendant 72h, en présence et en absence de l' $\alpha$ -amylase. YP/S : le rendement en éthanol (g éthanol/g substrat).

Table 2. Ethanol production by *C. tropicalis* YME C14, *S. cerevisiae* YME S2 and *Sc. occidentalis* ATCC 26077 from 9% of starch at 40 °C for 72h, in the presence and absence of  $\alpha$ -amylase.

| Souches               | <i>C.tropicalis</i> |       | <i>S.cerevisiae</i> |      | <i>Sc.occidentalis</i> |       |
|-----------------------|---------------------|-------|---------------------|------|------------------------|-------|
|                       | +                   | -     | +                   | -    | +                      | -     |
| Ethanol (g/l)         | 33,98               | 16,75 | 11,96               | 2,39 | 23,93                  | 11,96 |
| Amidon résiduel (g/l) | 0,67                | 5,53  | 0,045               | 8,52 | 0,043                  | 8,4   |
| YP/S                  | 0,38                | 0,19  | 0,13                | 0,02 | 0,26                   | 0,14  |

Tableau 1. Variation de la quantité d'éthanol produite par *S. cerevisiae* YEM S2 en fonction de l'augmentation de la température sur milieu YPS à 15% de saccharose. YP/S : le rendement en éthanol (g éthanol/g substrat).

Table 1. Variation of the amount of ethanol produced by *S. cerevisiae* YEM S2 as a function of the increase in temperature (22, 30, 37, 40 and 42 °C.) on YPS medium with 15% sucrose. YP/S: ethanol yield (g ethanol / g substrate).

| Temperature          | 22°C  | 30°C  | 37°C  | 40°C  | 42°C |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|------|
| Ethanol (g/l)        | 69,75 | 71,33 | 71,33 | 71,33 | 71   |
| YP/S                 | 0,46  | 0,47  | 0,47  | 0,47  | 0,47 |
| % Bioconversion      | 90    | 92    | 92    | 92    | 92   |
| Productivité (g/l/h) | 2,91  | 2,97  | 2,97  | 2,97  | 2,95 |

### Fermentation en batch de l'amidon en éthanol

L'optimisation de la concentration de l'amidon est réalisée dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 50 ml de milieu YPA à des concentrations allant de 2 jusqu'à 10% d'amidon. Après l'addition de l'enzyme  $\alpha$  amylase (24U/g d'amidon), l'incubation des cultures est faite sous une agitation de 450 rpm à des températures allant de 30 à 42°C pendant 72h. Les souches de levures utilisées sont : *S. cerevisiae* YME S2, *C. tropicalis* YMEC14 et *Sc. Occidentalis* ATCC26077. Ainsi indépendamment de la présence ou de l'absence de  $\alpha$  amylase, les quantités d'éthanol les plus élevées sont produites par *C. tropicalis*, alors que les taux de production les plus bas sont attribués à *S. cerevisiae*. Cependant le traitement de l'amidon par  $\alpha$  amylase conduit à une augmentation de 100% du rendement en éthanol chez *C. tropicalis* et *Sc. Occidentalis* et de 400% chez *S. cerevisiae* (Tab. 2). De même, la quantité d'amidon résiduelle est presque nulle en présence de l' $\alpha$ -amylase et varie entre 5,5g/l et 8,5g/l en l'absence de celle-ci. Le taux d'éthanol le plus élevé est produit à une concentration en amidon de 9% (Fig. 2B), ceci étant valable pour les trois souches testées. Les quantités d'éthanol produites par *C. tropicalis* YME C14 et *Sc. occidentalis* ATCC 26077 à partir de l'amidon traité par l' $\alpha$ -amylase sont les doubles de celles produites par les mêmes souches à partir de l'amidon en absence de l' $\alpha$ -amylase (Fig. 2A). Les quantités d'éthanol produites par les trois souches de levures augmentent quand la température passe de 27 à 30°C, puis se stabilisent entre 30 et 37°C (Fig. 2C). Au-delà de cette température, le taux d'éthanol produit par *C. tropicalis* YME C14 montre une très faible diminution par rapport à la température optimale, alors que celui de *S. cerevisiae* YME S2 reste stable même à 42°C. On note aussi une sécrétion maximale et constante d'éthanol par les trois souches sur une large gamme de pH allant de 5,5 jusqu'à 7 (Fig. 2D).

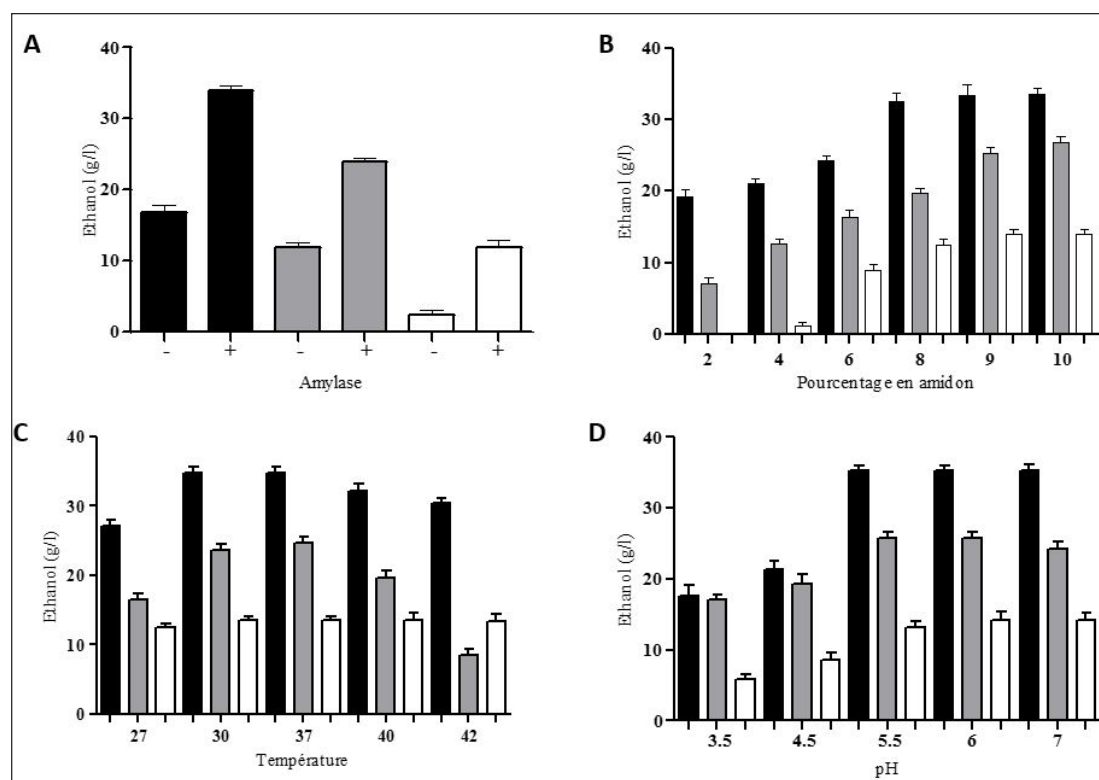


Figure 2. fermentation de l'amidon en éthanol par *C. tropicalis* YME C14 (noire), *S. occidentalis* (gris) et *S. cerevisiae* YME S2 (blanc). (A) en présence (+) et en absence (-) de l' $\alpha$ -amylase et en fonction de la variation de (B) la concentration en amidon, (C) la température et du (D) pH.

Figure 2. Starch fermentation in ethanol by *C. tropicalis* YME C14 (black), *S. occidentalis* (gray) et *S. cerevisiae* YME S2 (white). (A) in the presence (+) and absence (-) of  $\alpha$ -amylase and as a function of the variation in (B) starch concentration (C) temperature 27, 30, 37, 40 and 42°C and (D) pH.

### Effet de l'introduction du gène $\alpha$ -amylase chez *S. cerevisiae* YME S2 sur la production de l'éthanol

La détermination de la quantité d'éthanol sécrétée par les transformants *S. cerevisiae* YME S2 ayant reçu les plasmides pYZM-AMY1 et pYZA-AMY1 est réalisée sur le milieu YPA à 9% d'amidon traité ou pas par l' $\alpha$ -amylase exogène. L'activité  $\alpha$ -amylase produite par *S. cerevisiae* YME S2 ayant reçu le plasmide pYZM-AMY1 est plus élevée que celle produite à

partir de la même souche portant le plasmide pYZA-AMY1. Une augmentation conséquente des quantités d'éthanol et de biomasse est alors observée (Tab. 3). Ainsi en absence de l' $\alpha$ -amylase exogène, les quantités maximales d'éthanol produites par les souches transformées par les plasmides pYZM-AMY1 et pYZA-AMY1 sont respectivement, quatre fois et trois fois plus importantes que celle sécrétée par la souche non transformée.

Tableau 3. La production d'éthanol par *S. cerevisiae* transformée avec pYZM-AMY1, pYZA-AMY1 et non transformée à partir de 9% d'amidon à 40°C, en présence et en absence de l' $\alpha$ -amylase exogène. YP/S : le rendement en éthanol (g éthanol/g substrat).

Table 3. Ethanol production by *S. cerevisiae* transformed with pYZM-AMY1, pYZA-AMY1 and not transformed from 9% of starch at 40 °C, in the presence and absence of the exogenous  $\alpha$ -amylase. YP/S : the yield of ethanol (g ethanol / g substrate).

| Souches                           | <i>S. cerevisiae</i> |      | <i>S. cerevisiae</i> pYZM-AMY1 |       | <i>S. cerevisiae</i> pYZA-AMY1 |      |
|-----------------------------------|----------------------|------|--------------------------------|-------|--------------------------------|------|
|                                   | +                    | -    | +                              | -     | +                              | -    |
| Ethanol (g/l)                     | 11,96                | 3,32 | 17,96                          | 12,72 | 15,66                          | 9,57 |
| Biomasse (g/l)                    | 8,85                 | 8    | 9,5                            | 9     | 9                              | 8,2  |
| Activité $\alpha$ -amylase (U/ml) | ND                   | ND   | ND                             | 2,5   | ND                             | 1,6  |
| YP/S                              | 0,12                 | 0,04 | 0,19                           | 0,15  | 0,16                           | 0,11 |

### Cinétique de fermentation en batch de *S. cerevisiae* recombinée

Dans le cas de l'amidon traité par l' $\alpha$ -amylase exogène, la sécrétion d'éthanol par les trois souches démarre très tôt, dès le déclenchement de la fermentation, les quantités maximales d'éthanol atteintes après 72 heures sont plus élevées que celles obtenues à partir de l'amidon non traité, avec le même ordre de performance des trois souches déjà établies à savoir *S. cerevisiae* YME S2 pYZM-AMY1 (21.11g/l), *S. cerevisiae* YME S2 pYZA-AMY1 (18,35g/l) et *S. cerevisiae* YME S2 (14,5g/l)

(Fig. 3). La consommation du substrat révèle une dégradation plus accélérée mais incomplète des sucres réducteurs, la quantité résiduelle est non négligeable.

La superposition sur le même graphique des trois courbes de production d'éthanol en absence de l' $\alpha$ -amylase exogène (Fig. 4) laisse apparaître la grande différence entre les quantités maximales d'éthanol produites par les deux souches transformées et la souche témoin. Par contre, en présence d'enzyme on note une augmentation de la vitesse et des quantités maximales d'éthanol produites par les trois souches.

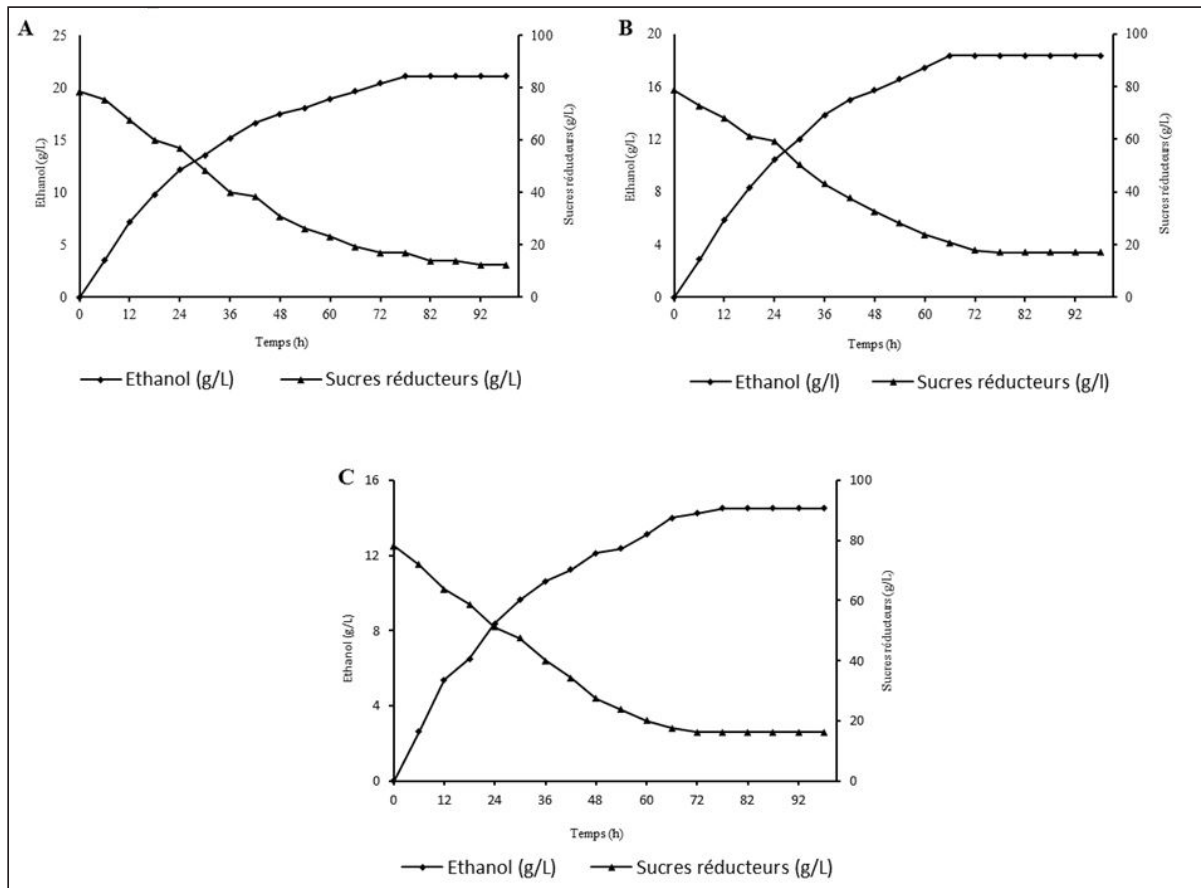


Figure 3. Cinétiques des fermentations en batch de la production de l'éthanol par (A) *S. cerevisiae* YME S2 pYZM-AMY1 (B) *S. cerevisiae* YME S2 pYZA-AMY1 et (C) *S. cerevisiae* YME S2 à partir de l'amidon traité par l' $\alpha$ -amylase exogène à 40°C. Figure 3. Kinetics of batch fermentation of ethanol production by (A) *S. cerevisiae* YME S2 pYZM-AMY1 (B) *S. cerevisiae* YME S2 pYZA-AMY1 and (C) *S. cerevisiae* YME S2 from starch treated with exogenous  $\alpha$ -amylase at 40 ° C.

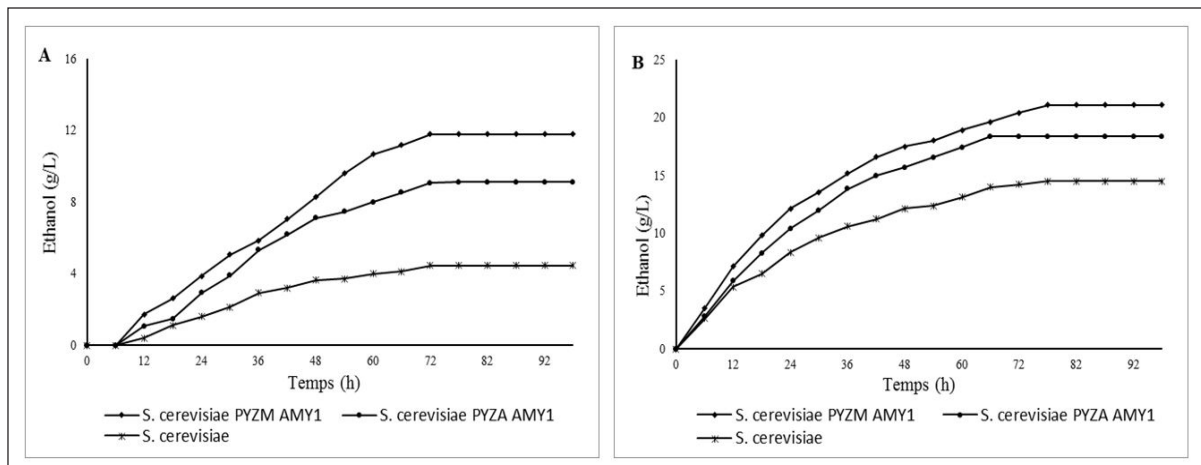


Figure 4. Comparaison des cinétiques de production d'éthanol par *S. cerevisiae* YME S2 pYZM-AMY1, *S. cerevisiae* YME S2 pYZA-AMY1 et *S. cerevisiae* YME S2 à partir de l'amidon, (A) en absence et (B) en présence de l' $\alpha$ -amylase exogène. Figure 4. Kinetics comparison of ethanol production by *S. cerevisiae* YME S2 pYZM-AMY1, *S. cerevisiae* YME S2 pYZA-AMY1 and *S. cerevisiae* YME S2 from starch (A) in absence and (B) in the presence of exogenous  $\alpha$ -amylase

#### Activité invertase chez *S. cerevisiae* YME S2

Les cultures sont réalisées dans les conditions optimales dans un fermenteur et sous agitation. Au cours de la croissance, des aliquotes de 10 ml sont prélevés, toutes les heures. Après centrifugation, l'activité enzymatique est dosée aussi bien dans le surnageant du milieu de culture que dans les cellules entières. L'isoforme extracellulaire de l'enzyme est très élevée

pendant la phase exponentielle de croissance ; en parallèle le maximum d'activité enzymatique cellulaire est atteint durant la phase stationnaire. Il y a donc une alternance entre les deux formes d'enzymes durant la croissance cellulaire (Fig. 5). Le nombre d'unités enzymatiques maximales (4816 U/l) dans le surnageant est supérieur à celui de la forme cellulaire, il est atteint une heure après le déclenchement de la réaction.

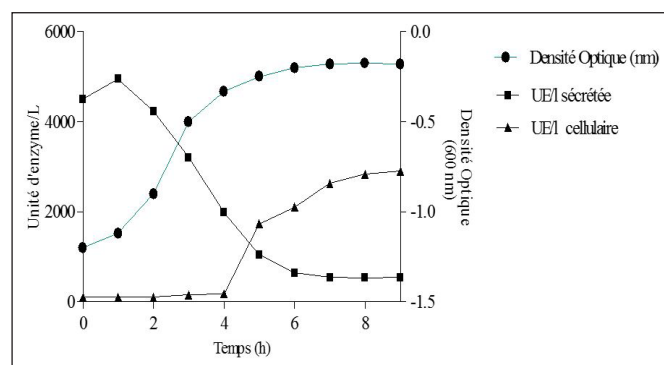


Figure 5. Détermination de l'activité invertase (cellulaire et sécrétée) en fonction de la croissance cellulaire chez *S. cerevisiae* YME S2.

Figure 5. Determination of invertase activity (cellular and secreted) as a function of cell growth in *S. cerevisiae* YME S2

## DISCUSSION

Développer des modèles énergétiques durables, constitue de nos jours l'un des grands défis pour l'humanité. Le bioéthanol issu de la biomasse est actuellement la seule alternative aux carburants d'origine fossile (pétrole, gaz) disponible immédiatement sans modification des moteurs. Pour une même quantité d'énergie restituée, la production d'éthanol à partir du maïs mobilise 2 fois moins d'énergie non renouvelable et émet 2,4 fois moins de gaz à effet de serre que l'essence. En effet l'amidon est un substrat flexible et bon marché, c'est un polymère de l'alpha-D-glucopyranose, non assimilé par la grande majorité des espèces de levures y compris *S. cerevisiae* qui est dépourvue de toute activité amylolytique (De Souza & De Oliveira 2010). Sa conversion en éthanol requiert obligatoirement soit un prétraitement par des enzymes amylolytiques, soit l'utilisation de souches de levures recombinées capables de synthétiser ces enzymes amylolytiques (Yamada *et al.* 2011). De ce fait, son exploitation dans l'industrie fermentaire nécessite d'abord un prétraitement par des amylases thermostables.

Dans cette étude, le traitement hydrolytique de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase exogène conduit à une amélioration très importante du rendement en éthanol par les trois souches testées, elle est de 100% dans le cas *C. tropicalis* YME C14 et *Sc. Occidentalis* ATCC26077 et de 400% pour *S. cerevisiae* YME S2; les paramètres d'état sont cinq fois plus élevés chez cette dernière. La production plus faible d'éthanol par YME S2 est due à l'absence du gène codant pour une glucoamylase qui existe chez les deux autres espèces testées. D'autre part, la thermotolérance de cette souche est bien évidente vu que la production d'éthanol reste stable jusqu'à 42°C. L'exploration des fermentations alcooliques en batch, à l'échelle pilote, dans les conditions optimales montre que la production d'éthanol débute très tôt, trois heures après le déclenchement de la réaction, et suit une courbe exponentielle très importante. En parallèle, la consommation des sucres est très rapide avec un épuisement total du saccharose en un temps très court (*résultat non publié*). En définitive, les performances de cette souche thermorésistante présentent un intérêt industriel très important, elles permettent son utilisation dans le procédé de fermentation en mode SSF.

L'amélioration génétique de la souche *S. cerevisiae* YME S2 par transformation avec les plasmides pYZM-AMY1 et pYZA-AMY1 porteurs du gène  $\alpha$ -amylase de *Sc. occidentalis* ATCC26077, conduit à une accélération du métabolisme cellulaire avec une augmentation d'environ 280% et 190% respectivement par rapport à la souche témoin non transformée

en absence de l' $\alpha$ -amylase exogène. Le traitement de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase exogène entraîne une augmentation de la production de l'éthanol, la présence de celle-ci dans le milieu de fermentation exerce un effet cumulatif avec l'enzyme endogène chez les deux transformants. La différence des résultats observées entre la transformation de la souche *S. cerevisiae* YME S2 par l'un ou l'autre des deux vecteurs navettes, peut être expliquée par l'instabilité du plasmide pYZA-AMY1 et par la nature de son origine de répllication ARS qui produit moins de nombres de copies de plasmide que l'origine de répllication 2 $\mu$ . Les quantités maximales d'éthanol produites par les deux transformants sont plus élevées que celles obtenues par *S. cerevisiae* portant le gène (STA1) de la glucoamylase sur son chromosome et similaires à celles d'autres chercheurs utilisant *S. cerevisiae* transformée avec les deux gènes  $\alpha$ -amylase et glucoamylase (Eksteen *et al.* 2003, Yamada *et al.* 2011).

Le saccharose est la première source de carbone dans l'industrie de production de bioéthanol par *S. cerevisiae*. Ce sucre est métabolisé de deux façons différentes par la levure, il est soit hydrolysé par l'invertase extracellulaire en glucose et fructose, puis absorbés et métabolisés par la voie du glucose, soit absorbé directement via un symport saccharose-proton suivi d'une hydrolyse et métabolisme intracellulaire. Le gène SUC2 code pour les deux isoformes de l'invertase extracellulaire et intracellulaire mais l'hydrolyse du saccharose chez *S. cerevisiae* s'effectue principalement dans le milieu extracellulaire.

Dans notre travail, *S. cerevisiae* YME S2 s'est révélée très saccharolytique, elle montre l'existence de deux formes d'activité saccharase qui se succèdent au cours des différentes phases de croissance; invertase extracellulaire dont l'activité est accrue dès le début de la croissance et jusqu'à la fin de la phase exponentielle, invertase intracellulaire, presque inexistante au départ et qui augmente rapidement pour atteindre sa valeur maximale pendant la phase stationnaire. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Basso *et al.* 2011) qui ont montré une synthèse très rapide de la forme externe de l'invertase chez *S. cerevisiae* entre le début et la moitié de la phase logarithmique de croissance.

Les valeurs obtenues de l'invertase extracellulaire sont beaucoup plus élevées que celles obtenues par d'autres souches de levures (*résultats non publiés*).

Pour optimiser la production hétérologue de l'invertase chez *Yarrowia lipolytica*, le gène SUC2 de *S. cerevisiae* a été cloné sous le contrôle d'un promoteur fort et d'un peptide signal optimisé (Lazar *et al.* 2013). Les valeurs maximales obtenues sont légèrement inférieures à celles obtenues dans cette étude par la souche naturelle *S. cerevisiae* YME S2 non modifiée. Pour essayer de comprendre le comportement extraordinaire de cette souche de levure nous avons opté pour des méthodes de la génomique comparative qui ont démontré que contrairement à la plupart des souches de levures de laboratoires connues, telle que la souche S1278b, le gène SUC2 responsable de la synthèse de l'invertase est naturellement amplifié chez *S. cerevisiae* YME S2 (*résultats non publiés*).

La sécrétion très tôt et élevée de l'invertase extracellulaire par *S. cerevisiae* YME S2 est une propriété intéressante non seulement dans la production du bioéthanol mais aussi dans d'autres procédés industriels telles que la panification et la production des sirops sucrés. En effet, l'invertase est une enzyme largement utilisée dans les industries alimentaires et des boissons, elle est également utilisée dans la fabrication du miel artificiels, des agents plastifiants, les industries



cosmétiques, pharmaceutiques et de papier ainsi que des électrodes enzymatiques pour la détection du saccharose.

Par conséquent, *S. cerevisiae* YME S2 pourra être valorisée davantage pour la production du bioéthanol à partir d'autres sources de carbones abondantes comme l'inuline et la biomasse cellulosique.

### CONCLUSION

Ce travail contribue à résoudre certains problèmes rencontrés dans les procédés de production de bioéthanol issu de la première génération et Ce travail contribue à résoudre certains problèmes rencontrés dans les procédés de production de bioéthanol issu de la première génération et à rendre les procédés plus économiques. Les compétences de la souche *Saccharomyces cerevisiae* YME S2, dans la fermentation alcoolique ont été mises en évidence dans plusieurs travaux de recherche. Cette même souche est également dotée de grandes capacités dans la tolérance aux fortes températures (45°C) et à des concentrations très élevées en éthanol (12%) qui sont toxiques pour d'autres souches de levures. La transformation de *S. cerevisiae* YME S2, surtout avec le plasmide pYZM-AMY1, est une procédure très réussite, elle conduit à une amélioration très claire de tous les paramètres d'état et à une rapidité du métabolisme cellulaire. En tenant compte de l'importance quantitative de la forme extracellulaire de l'invertase et sachant qu'il s'agit d'une enzyme ayant un intérêt capital dans l'industrie alimentaire, cette souche serait très intéressante pour les industriels producteurs de levures boulangères ou d'éthanol pour profiter de cette performance et d'essayer d'extraire l'enzyme comme coproduit à partir du milieu de culture qui n'est normalement pas exploité.

### RÉFÉRENCES

- Abreu-Cavalheiro A. & Monteiro G. 2013. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 665-671.
- Basso T.O., de Kok S., Dario M. *et al.* 2011. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. *Metabolic Engineering*, 13, 694-703.
- Castro R.C. & Roberto I.C. 2014. Selection of a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 1553-1564.
- De Souza P.M. & De Oliveira M.P. 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850-861.
- Eksteen J.M., van Rensburg P., Cordero R.R. *et al.* 2003. Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the  $\alpha$ -amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biotechnology & Bioengineering*, 84, 639-646.
- Faga B.A., Wilkins M.R. & Banat I.M. 2010. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D(5)A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. *Bioresource Technology*, 101, 2273-2279.
- Favaro L., Jooste T., Basaglia M. *et al.* 2013. Designing industrial yeasts for the consolidated bioprocessing of starchy biomass to ethanol. *Bioengineered*, 4, 97-102.
- Hii S.L., Tan J.S., Ling T.C. *et al.* 2012. Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Research*, 2012, 1-14.
- Jamai L., Ettayebi K., El Yamani J. *et al.* 2007. Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of alpha-amylase. *Bioresource Technology*, 98, 2765-2770.
- Kim J.H., Kim H.R., Lim M.H. *et al.* 2010. Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase, alpha-amylase and debranching enzyme. *Biotechnology Letters*, 32, 713-719.
- Lazar Z., Rossignol T., Verbeke J. *et al.* 2013. Optimized invertase expression and secretion cassette for improving *Yarrowia lipolytica* growth on sucrose for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40, 1273-1283.
- Vimmerstedt L.J., Bush B. & Peterson S. 2012. Ethanol distribution, dispensing, and use: analysis of a portion of the Biomass-to-Biofuels supply chain using system dynamics. *PLoS One*, 7, e35082.
- Yamada R., Yamakawa S., Tanaka T. *et al.* 2011. Direct and efficient ethanol production from high-yielding rice using a *Saccharomyces cerevisiae* strain that express amylases. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 393-396.

Manuscrit reçu le 25/12/2017

Version révisée acceptée le 13/07/2020

Version finale reçue le 17/07/2020

Mise en ligne le 20/07/2020