**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**
**UNIVERSITE YAHI FARES DE MEDEA**
**FACULTE DE TECHNOLOGIE**

**Mémoire de fin d'études de Master**

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Génie des procédés de l'environnement

---

# OPTIMISATION D'UN PROCEDE ENZYMATIQUE DE PRETRAITEMENT D'UN DECHET ORGANIQUE DESTINE A LA PRODUCTION DE BIOETHANOL

---

Présenté par :
**TALEB LINA**
**BENKESSIRAT AMIRA**

**Devant le jury :**

- **Dr. BENKIAR Amina : Présidente**
- **Dr. ARBIA Wassila : Examinatrice.**
- **Dr. TASSIST Amina : Promotrice.**

**Promotion 2023-2024**

# *Remerciement*

Nous tenons à remercier avant tout Dieu le Tout-Puissant de nous avoir donné la force, le courage et la volonté d'accomplir ce travail.

En premier lieu, nous tenons à exprimer à Madame **TASSIST AMINA**, notre profonde gratitude pour tout son soutien et ses conseils avisés tout au long de la réalisation de ce mémoire ; car, elle nous a appris la patience.

- Nous remercions également **Dr. BENKIAR Amina** pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant le jury de ce mémoire.
- Nous remercions également **Dr. ARBIA Wassila** pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Nous tenons à remercier sincèrement les ingénieurs de laboratoire de **l'Université de MEDEA**, spécialement **Benhaoua Meriem**, d'avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Enfin, nous remercions les enseignants du département de génie des procédés et environnement, et toutes les personnes qui nous ont fait part d'aide, d'encouragement ou ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# *Dédicace*

Grace à l'aide de dieu 'Allah', tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail ; que je dédie aux deux être les plus chers au monde, qui ont souffert nuit et jour pour nous couvrir de leur amour, mes parents. Que DIEU vous bénisse pour votre aide et votre soutient durant tout mon cycle d'étude. Je vous aime énormément.

- A mes très chères sœurs : Amina et Nesrine
- A mes frères : Zaki et Younes
- A mes petits : Hiba, Imade et Rayan
- A ma jumelle : Khadidja
- A mon binôme : Amira
- A tous mes amies et mes collègues d'études.

Lina

# Dédicace

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide de* ***Dieu*** *tout puissant*

*A Ceux qui m'ont toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études, qui m'ont guidé Dans le droit chemin, qui m'ont appris que rien n'est impossible…*

*Merci pour votre amour et votre confiance totale...A vous* ***très chers parents*** *: je requiers mon* ***Dieu*** *à préserver votre santé, votre joie et longue vie.*

*A mes chère sœurs:* ***Maroua,Asmaa,Rahil.***

*A mon cher frère :* ***Abderraouf.***

*A mes cousines* ***:Imane,Rym.***

*A mon cousin* ***:Mustapha.***

*A ma cousine* ***: Sara.***

*A ma* ***grand-mère*** *que Dieu la protège et toutes les familles* ***Benkessirat*** *et* ***Tchalabi .***

*A mes oncles et mes tantes et leurs familles.*

*A mon binôme :* ***Lina.***

*A tous les gens qui me connaissant et que je connais en particulier* ***Abderrahmane.***

*A toute la promotion de* ***Génie des procédés et environnement*** *2019/2024.*

***AMIRA***

**ملخص**

في هذه الدراسة، قمنا بدراسة إنتاج الإيثانول الحيوي باستخدام النشا من قشور البطاطس الطازجة. ومن الضروري إجراء المعالجة الحرارية عند درجة حرارة 130 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة يليها الطحن والتسييل الإنزيمي باستخدام ألفا أميلاز. يستخدم جلوكواميلاز للتسكير والتخمير مع فطريات خميرة الجعة. يقوم ألفا أميلاز بتسييل النشا خلال ساعتين عند 55 درجة مئوية، ودرجة الحموضة = 6، مع نسبة S/E تبلغ 300 CEIP/جم من النشا، وهو ما يعادل 18 CEIP /جم من النشا. استخدام التسكير عند درجة الحموضة = 5، درجة الحرارة = 60-65 درجة مئوية، لمدة 3 ساعات أعطى مردود يقدر ب 91٪ لنسبة 0.67 جم من الجلوكواميلاز لكل جرام من النشا المسال. ولكن عند التركيزات العالية من قشور البطاطس ينخفض المردود إلى 63% .تم الحصول على مستوى إيثانول قدره 42.67 جم / لتر أثناء التخمير في درجة الحموضة المحيطة = 5، مع إنتاج 0.56جم من الإيثانول لكل جرام من الجلوكوز. تشهد اختبارات تحديد هوية الكحول .

**الكلمات المفتاحية:** الإيثانول الحيوي، قشور البطاطس، الإسالة، التسكير، التخمير، فطريات خميرة الجعة.

**Résumé**

Cette étude, traite la fabrication du bioéthanol en utilisant l'amidon des épluchures de pomme de terre fraiche. Il est nécessaire de procéder à un prétraitement thermique à 130°C pendant 15 minutes puis un broyage et à une liquéfaction enzymatique par l'alpha-amylase. La glucoamylase est utilisée pour la saccharification et la fermentation avec ***Saccharomyces cerevisiae***. L'alpha-amylase liquéfie l'amidon en 2 heures à 55°C, pH=6, avec un rapport E/S de 300 CEIP/g d'amidon, ce qui équivaut à18 CEIP/g MF. La saccharification à pH=5, T°=60-65°C, pendant 3 heures a donné un rendement moyen de 91% pour un rapport de 0.67g de glucoamylase par gramme d'amidon liquéfié. Cependant aux fortes charges en épluchures ce rendement diminue à 63%. Un taux d'éthanol de 42.67g/l a été obtenu lors de la fermentation à Température ambiante, pH =5, avec un rendement de 0.56g d'éthanol/g de glucose. Enfin, les tests d'identification réalisés attestent son identité.

**Les mots clés :** Bioéthanol, Epluchures de Pomme de terre, Liquéfaction, Saccharification, Fermentation, Saccharomyces cerevisiae.

**Abstract**

In this study focuses the production of bioethanol using fresh potato peel starch. It is necessary to carry out a thermal pretreatment at 130°C for 15 minutes, followed by grinding and enzymatic liquefaction using alpha-amylase. Glucoamylase is used for saccharification. Fermentation is conducted with ***Saccharomyces cerevisiae***. Alpha-amylase liquefies the starch in 2 hours at 55°C, pH=6, with an E/S ratio of 300 CEIP/g of starch, which is equivalent to 18 CEIP/g MF. The use of saccharification at pH=5, T°=60-65°C, for 3 hours yielded an average efficiency of 91% for a ratio of 0.67g of glucoamylase per gram of liquefied starch. However, at high peel loads this yield drops to 63%. An ethanol concentration of 42.67g/l was obtained during fermentation at ambient temperature, pH=5, with a yield of 0.56g of ethanol per g of glucose. Finally, identification tests certify his identity.

**The key words:** Bioethanol, Potato peelings, Liquefaction, Saccharification.

# Sommaire

**Remerciement**

**Dédicace**

**Résumé**

**Sommaire**

**Liste des abréviations**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Introduction Générale** .....1

**Partie Bibliographique**

I. Gestion des déchets en Algérie .....4

I.1. Les déchets ménager et assimilés (DMA).....4

I.2. Déchets organiques .....6

II. La pomme de terre.....6

II.1 Généralité sur la pomme de terre .....6

II.2 Composition de la pomme de terre .....6

II.3 La pomme de terre en Algérie : Statistiques de production …….7

II.4 Sous-produit de pomme de terre .....8

II.5 Amidon de pomme de terre : structure .....9

II.5.1 L'Amylose .....10

II.5.2 Amylopectine.....11

II.6 Propriétés.....11

II.6.1. Influence de la température .....11

- *La gélification* .....11
- *La rétrogradation* .....12

II.6.2. Hydrolyse de l'amidon .....12

III. Les enzymes .....13

III.1. Généralité sur les enzymes .....13

III.2. Classification des enzymes .....13

III.3. Aperçue sur l'alpha-amylase.....14
III.3.1. Définition et Nomenclature .....14
III.3.2. Caractéristique et propriétés de l'alpha-amylase .....14
III.3.2.1. Poids moléculaire .....14
III.3.2.2. Température optimum .....14
III.3.2.3 pH optimum .....14
III.3.3. Origines .....15
III.3.4. Mécanisme d'action.....15
III.3.5. Applications industrielles.....17
III.4. La glucoamylase .....18
III.4.1. Définition .....18
III.4.2. Sources et formes de glucoamylase .....19
III.4.3. Propriétés de la glucoamylase .....19
III.4.4. Dosages de glucoamylase et leurs limites .....20
III.4.5. Applications industrielles des glucoamylases.....21
IV. Généralités sur le bioéthanol.....22
IV.1. Le Bioéthanol : Biocarburant .....22
IV.2. Etapes de production .....23
IV.2.1 Préparation ou Pré-traitement de la matière première (Biomasse) .....23
IV.2.2. La fermentation alcoolique .....24
IV.2.3 Extraction du bioéthanol.....25
IV.3. Génération de bioéthanol.....26
IV.3.1. Le bioéthanol de première génération .....26
IV.3.2 Le bioéthanol de deuxième génération .....27
IV.3.3 Le bioéthanol de troisième génération .....27
IV.4. Les avantages et les inconvénients de bioéthanol .....28
IV.4.1 Les avantages.....28
IV.4.2 Les inconvénients.....28

**Partie expérimentale**

I. Matériels .....31

I.1. Verreries et petit matériel .....31

I.2. Réactifs, produits et solutions .....31

I.3. Equipements .....32

I.4. Matériel biologique .....32

II. Méthodes, Résultat et Discussion ..... ..33

II.1. Caractérisation de l'alpha amylase ..... 33

II.1.1. Essais en présence d'amidon insoluble .....34

II.1.2. Essais en présence d'amidon d'une solubilité modérée..... 35

1/ La courbe étalonnage .....35

2/ Test de l'activité enzymatique.....37

II.2. Caractérisation de la Glucoamylase .....46

II.2.1. Optimisation des paramètres physico-chimiques .....46

1/ Préparation de l'amidon liquéfié .....46

2/ Essai Préliminaire .....47

3/ Optimisation du pH .....48

4/ Optimisation de la température .....50

II.2.2. Courbes de saturation : Effet de la concentration du substrat sur

L'activité Glucoamylase .....52

1/Préparation de l'amidon liquéfié ..... .52

2/ Saccharification ..... 54

II.2.3. Optimisation du rapport E/S dans les conditions optimales .....57

II.3. Traitement enzymatique des épluchures de pommes de terre en vue

de la production de bioéthanol ..... .59

II.3.1. Caractérisation d'épluchure de pomme de terre .....59

II.3.2. Etapes de Prétraitement des épluchures de pomme de terre .....62

1/Travaux antérieurs .....62

2/ Objectif visé .....63

II.3.3. Optimisation du rapport E/S de la glucoamylase .....64

1/ Prétraitement physique et Liquéfaction .....64

2/ Saccharification .....65

II.3.4. Application du rapport E/S en milieu concentré .....67

1/ Prétraitement physique et Liquéfaction des épluchures de pommes de terre...67

2/ Saccharification .....69

II.3.5. Production du bioéthanol aux fortes charges .....70

1/ Traitement physique, liquéfaction et saccharification .....70

2/ Fermentation .....71

3/ Distillation .....71

II.3.6. Analyse du distillat .....77

1/ Tests d'identification .....78

a/ Le test au dichromate de potassium .....78

b/ Le Flambage .....79

c/ Test d'identification B (selon USP) .....80

d/ Le spectre Infrarouge .....80

2/ Tests de conformité .....82

a/ Test de l'Acidité (selon USP) .....82

**Conclusion générale**.....84

**Références bibliographiques**.....86

**ANNEXES**.....94

# Liste des abréviations

**CEIP** : Centre d'Évaluation et d'Information de la Pharmacodépendance

**A :** Alpha

**β :** Beta

**Vi** : Vitesse Initiale

**C0 :** Concentration initiale

**[ ] :** Concentration

**Km :** Constante de Michaelis Menten

**°C :** Degré Celsius

**H :** Hydrogène

**N** : Normalité

**AE** : Activité Enzymatique

**IR :** Indice de réfraction

**Cf** : Concentration Finale

**m :** La masse

**MF :** Matière fraiche

**min :** Minute

**OP :** Optimale

**O :** Oxygène

**pH :**Potentiel d'hydrogène

**R :** Rendement

**S :** Substrat

**T :** Température

**Vmax :** Vitesse maximale

**V :** Volume

**λ :**La longueur d'onde

**DO :** La densité optique

**T%** : Titre massique

# Liste des tableaux

## Partie bibliographique

**Tableau II.1**: Teneur en amylose et amylopectine des amidons de différentes sources botaniques.....10

**Tableau III.1**: Classification des enzymes.....13

**Tableau III.2**: Différentes applications des α-amylases..... .18

**Tableau IV.1:** Les trois générations de bioéthanol.....28

## Partie expérimentale

**Tableau II-1 :** Constantes cinétiques tirés à partir des linéarisations de Lineweaver burk et Eadie Hofstee : Comparaison avec ceux tirés à partir de la courbe de Saturation.....44

**Tableau II-2 :** Constantes cinétiques tirés à partir des linéarisations de Lineweaver-burk et Eadie Hofstee : Comparaison avec ceux tirés à partir de la courbe de Saturation.....57

**Tableau II-3 :** Bilan de fermentation .....76

**Tableau II-4 :** Données relatives au distillat global.....78

# Liste des figures

## Partie bibliographique

**Figure I.1:** Composition moyenne annuelle des DMA.....5

**Figure I.2:** Modes de traitement des DMA en Algérie.....5

**Figure II.1 :** Représentation graphique de la composition biochimique moyenne d'un tubercule de pomme de terre .....7

**Figure II.2:** Structure de l'amylose .....11

**Figure II.3:** Structure moléculaire de l'amylopectine avec les branchements..... 11

**Figure III.1:** Mécanisme d'action de l'α-amylase.....16

**Figure IV.1**: Procédé de production du bioéthanol.....26

**Figure IV.2**: Production du bioéthanol à partir de la biomasse de 1ère génération….27

## Partie expérimentale

**Figure II-1 :** Photos de solutions d'amidons de plusieurs origines. Solutions préparées dans l'eau froide sur laquelle nous avons ajouté de l'eau bouillante.....34

**Figure II-2** : Courbes d'étalonnages destinées au dosage de l'amidon (obtenues avec 3 essais réalisés dans les mêmes conditions). …….....35

**Figure II-3 :** Courbes d'étalonnage obtenues pour l'amidon dispersé et non dispersé…….36

**Figure II-4 :** Courbes d'étalonnage obtenues avec l'eau distillée (iodine 0,001N) et avec iodine 0.0005N (diluant HCl 0.1N) .....37

**Figure II-5 :** Cinétique de dégradation de l'amidon par les deux échantillons d'alpha-amylase.....39

**Figure II-6 :** Courbe de saturation : Évolution la vitesse initiale (Vi) des deux échantillons d'alpha-amylase en fonction de la concentration initiale en amidon…..40

**Figure II-7 :** Linéarisation de Lineweaver-burk tracée pour les deux échantillons d'alpha-amylase.....42

**Figure II-8 :** Linéarisation d'Eadie Hofstee tracée pour les deux échantillons d'alpha amylase.....43

**Figure II-9 :** Concentration initiale et finale après ajout de l'iodine 0.001N…….47

**Figure II-10 :** courbe de saccharification de l'amidon liquéfié à 10g/l par la glucoamylase (2ml de à 1g/l dans 100ml) .....48

**Figure II-11 :** Courbe de saccharification de l'amidon liquéfié à 10g/l par la glucoamylase à 0.01g/100ml.....48

**Figure II-12 :** Effet du pH sur l'activité glucoamylase : Cinétique aux différents pH.....50

**Figure II-13 :** Rendements de la saccharification aux différents pH.....50

**Figure II-14 :** Effet de la température sur l'activité glucoamylase : cinétiques aux différentes températures …….....51

**Figure II-15 :** Rendements de la saccharification aux différentes températures …...52

**Figure II-16** : Cinétique d'hydrolyse de l'amidon par l'alpha amylase au rapport E/S optimal .....53

**Figure II-17 :** Cinétique de saccharification des différentes concentrations d'amidon liquéfiées par glucoamylase….....55

**Figure II-18 :** Courbe de saturation : Évolution la vitesse initiale (Vi) de glucoamylase en fonction de la concentration initiale en amidon liquéfié.....55

**Figure II-19 :** Linéarisation de Lineweaver-burk de la glucoamylase .....56

**Figure II-20 :** Linéarisation d'Eadie Hofstee de la glucoamylase.....56

**Figure II-21 :** Cinétique de saccharification de l'amidon liquéfié à 30g/L par la glucoamylase aux différentes concentrations ….....59

**Figure II-22 :** Composition moyenne des épluchures de pomme de terre.....61

**Figure II-23 :** Limites de la Composition des épluchures de pomme de terre.....61

**Figure II-24 :** Révélation de l'amidon à l'iodine au cours de la liquéfaction.....65

**Figure II-25 :** Cinétique de libération du glucose aux différentes concentrations de

glucoamylase……66

**Figure II-26 :** Rendement de saccharification aux différentes concentrations de la glucoamylase.....67

**Figure II-27 :** Révélation de l'amidon à l'iodine au cours de la liquéfaction.....68

**Figure II-28 :** Saccharification des épluchures de pomme de terre, traitées thermiquement, broyées et liquéfiées en utilisant de la glucoamylase au rapport E/S optimal. .....69

**Figure II-29 :** Montage de distillation .....72

**Figure II-30 :** Evolution de (S, pH, X) durant la fermentation sans autoclavage..... 73

**Figure II-31 :** Evolution de (S, pH, X) durant la fermentation avec autoclavage…...74

**Figure II-32 :** Vinasse : Résidu de la distillation qui sert de fertilisant .....77

**Figure II-33 :** Résultat de la révélation de l'éthanol dans le distillat global au bichromate de potassium.....79

**FigureII-34 :** Résultat de Flambage du distillat.....79

**Figure II-35 :** Résultat du test d'identification B.....80

**Figure II-36 :** Spectre infrarouge du distillat.....80

**Figure II-37 :** Spectre Infrarouge d'un éthanol (96%) .....81

**Figure II-38 :** Résultat de Test de l'Acidité.....82

# Introduction Générale

La pomme de terre est l'une des cultures agricoles les plus importantes pour la consommation humaine, dont sa production dépasse 381 millions de tonnes chaque année. Les déchets de pommes de terre (Épluchures, pièces impropres à la consommation) sont des sous-produits de valeur nulle. Ils provoquent des préoccupations environnementales en raison de leur détérioration microbienne, et pourtant, ils contiennent la même quantité de composés précieux que le légume comestible **(Mirabella, 2014 ; Wu, 2016).**

Des méthodes de caractérisation et de recyclage des épluchures de pommes de terre ont été étudiées. Les principaux résultats montrent que ce sous-produit possède un grand potentiel de valorisation en raison de sa composition chimique **(Sepelev et Galoburda, 2015).** De nombreux travaux scientifiques ont été menés au cours des dernières années, offrant des solutions et des approches originales à l'utilisation des déchets de pommes de terre dans la production de sous-produit à potentiel d'application tel que les enzymes industriels ; les acides organiques, le bioéthanol, les biogaz et les acides phénoliques **(Olayinka, 2015)**.

La valorisation des épluchures de pommes de terre dans la production de bioéthanol nécessite un prétraitement dont l'objectif est de rendre ce sous-produit accessible la fermentation alcoolique. Par rapport aux prétraitements chimiques, les prétraitements enzymatiques sont les plus utilisés à l'échelle mondiale. Leur mise en œuvre est simple, ils génèrent peu de dérivés dangereux et ont moins d'effets négatifs sur l'environnement.

Pour garantir la rentabilité d'un procédé enzymatique, il doit être appliqué dans les conditions optimales de l'activité des enzymes utilisées (pH, température, agitation…). Pour éviter le gaspillage de ces biocatalyseurs tout en garantissant une efficacité catalytique, il faut définir le rapport E/S qui module la quantité de l'enzyme nécessaire par rapport à celle de son substrat contenu dans le matériau à traiter. Les quantités d'enzymes sont évaluées en termes d'activités enzymatiques.

L'objectif de notre étude est d'optimiser un schéma de prétraitement enzymatique des épluchures de pomme de terre afin de les préparer pour la production de bioéthanol par fermentation alcoolique. Ce schéma utilise deux enzymes : l'alpha-amylase et la Glucoamylase. Les principaux paramètres étudiés sont la nature et les propriétés du substrat utilisé, le pH, la température, le rapport E/S et la charge du milieu. Une fermentation des épluchures de pommes de terre prétraitées dans les conditions optimales est réalisée afin de produire et d'extraire le bioéthanol. Des analyses du produit récupéré ont étés réalisés afin de prouver son identité, le quantifier et calculer le rendement de la fermentation.

La présente étude est divisée en deux grands volets, le premier est une partie théorique qui traite :

1. des généralités sur la pomme de terre et son amidon,
2. un aperçu général sur les enzymes (alpha-amylase et glucoamylase) et leur application dans les différents domaines.
3. un résumé sur le bioéthanol, ses propriétés, ses usages et ses méthodes de production.

Le deuxième volet est une partie pratique qui traite en détail notre procédure expérimentale utilisée pour atteindre les objectifs visés ainsi les principaux résultats obtenus avec leurs discussions. Enfin, une conclusion générale résume les principaux résultats obtenus dans cette étude.

# PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

# I. Gestion des déchets en Algérie :

En Algérie, à l'instar des autres pays du monde, la production des déchets solides municipaux ne fait qu'augmenter. La croissance démographique, l'urbanisation de plus en plus forte et les transformations socio-économiques que connaît le pays ces dernières années ont été accompagnées par des changements notables au niveau des quantités et de la qualité des déchets produits **(AND, 2020)**.

La loi 01-19 du 12 décembre 2001 relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets définit le cadre général du contrôle et de l'élimination des déchets et consacre les principes d'une gestion rationnelle et saine des déchets et l'ensemble des activités qui s'y rapportent notamment la collecte, le transport, le tri, la valorisation et le traitement **(AND, 2020)**.

Des investissements significatifs entre 2002 et 2017 d'environ 88 Milliards DA, dont 41 Milliards DA destinés au matériel de collecte et de transport et 37 Milliards DA pour la réalisation d'infrastructures dédiées au traitement des déchets **(AND, 2020)**.

## I.1. Les déchets ménager et assimilés (DMA) :

Selon la loi du cadre 01-19, les déchets ménager et assimilés (DMA) sont définis comme tous déchets issus des ménages ainsi que les déchets similaires provenant des activités industrielles, commerciales, artisanales et autres qui, par leur nature et leur composition, sont assimilables aux déchets ménagers (secteurs industriel agroalimentaire, entités économiques, établissement et institutions) (**AND, 2020)**.

Parmi les déchets solides générés en Algérie, les déchets ménagers et assimilés représentent la fraction la plus importante avec environ 11 millions de tonnes/an (en 2014) **(AND, 2014),** 13.5 millions de tonnes/an (2020) **(AND, 2020)** et pourrait dépasser les 20 millions de tonnes en 2035. La maîtrise de leur composition est donc nécessaire pour évaluer au préalable leur potentiel risque pour le milieu récepteur et le choix du mode de traitement le plus optimal **(AND, 2020)**.

Les résultats de la dernière compagne de caractérisation des DMA **(Fig. I.1)** montrent que la fraction organique est la plus prépondérante des DMA, elle représente 53,61%, suivi par le plastique qui représente 15,31%, et la fraction papier/carton de 6,76%. Cette compagne a également mis en évidence le problème des couches jetables qui représente une fraction importante des DMA avec environ 11,76% ce qui nécessite une mise en place d'un mode de traitement spécifique pour ce type de flux **(AND, 2020)**.

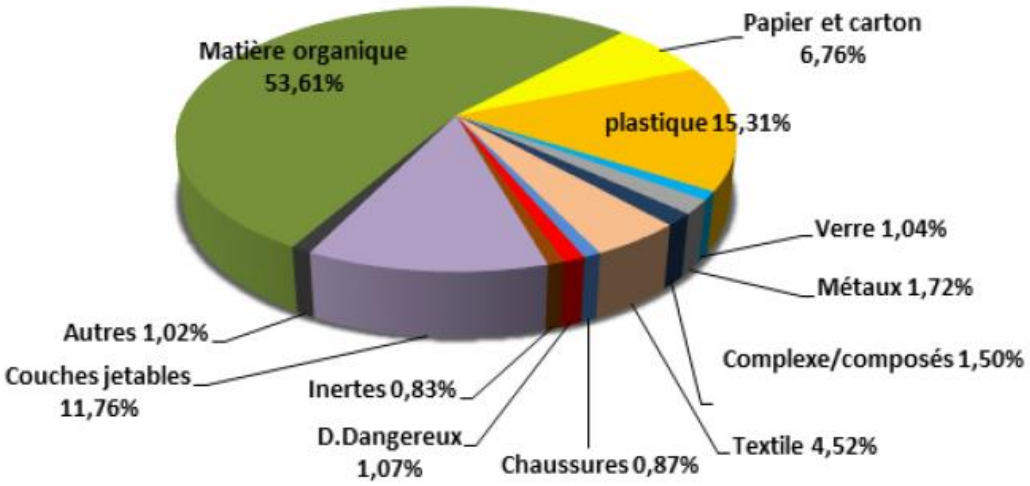



**Figure I.1 :** Composition moyenne annuelle des DMA **(AND, 2020)**.

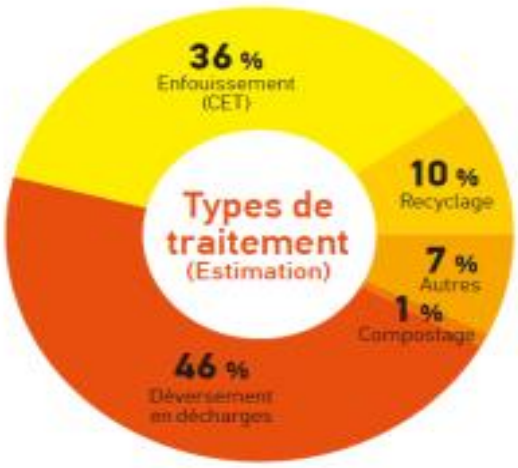



**Figure I.2 :** Modes de traitement des DMA en Algérie **(AND, 2014)**

A ce jour, la mise en décharge est la destination finale la plus privilégiée pour l'élimination des déchets ménagers et assimilés, du fait de son faible coût par rapport aux autres filières comme l'incinération ou le compostage (**Fig. I.2**). Cet état de fait a provoqué la saturation des décharges existantes et a engendré des problèmes d'hygiène et de salubrité publique (odeurs nauséabondes, problèmes respiratoires, allergie…). Ajouter à cela, le potentiel risque que constituent les lixiviations pour les nappes phréatiques ainsi que les émissions des gaz à effet de serre. Selon les services du Ministère des ressources en eau et de l'environnement (MREE), pour la seule année 2000, les décharges ont émis environ 7 542 000 Teq.$CO_2$. **(AND, 2014)**

### I.2. Déchets organiques

Ils comprennent tous les résidus biodégradables, les déchets de jardins ou de parcs, des produits alimentaires ou des déchets de cuisines issus notamment des ménages, des restaurants, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que tout déchet comparable provenant des établissements de production ou de transformation de denrées alimentaires. Ils sont caractérisés par une cinétique de décomposition rapide (biodégradable) **(Hatik, 2015)**.

## II. La pomme de terre

### II.1. Généralité sur la pomme de terre

La pomme de terre, originaire d'Amérique du Sud, est une plante vivace dicotylédone tubéreuse, herbacée, cultivée pour ses tubercules riches en amidon et possédant des qualités nutritives. Le nom botanique de la pomme de terre est ***Solanum tuberosum*** appartenant à la famille de ***Solanacées***. Le genre ***Solanum*** est très vaste, il regroupe environ 2000 espèces **(Berrabah, 2020 ; FAO, 2008)**.

### II.2. Composition de la pomme de terre

Les pommes de terre est l'un des légumes les plus consommés dans le monde entier. Le tubercule de la pomme de terre contient environ les trois quarts de son poids

en eau une quantité relativement élevée en glucides, un faible taux en substances azotées et très peu de lipides **(Delaplace et Fauconnier, 2004)**.

Le tubercule de la pomme de terre **(Fig. II.1)** est un organe de stockage contenant à maturité une moyenne de 77,5 % d'eau. La matière sèche, exprimée en pourcentage de la matière fraîche, se répartit globalement en 19,4 % de glucides totaux (principalement amidon, saccharose, glucose, fructose, cellulose brute et substances pectiques), 2,0 % de protides (protéines, acides aminés libres et bases azotées), 1,0 % de cendres (majoritairement du potassium) et 0,1 % de lipides. Des acides organiques (acides citrique et ascorbique entre autres), des substances phénoliques (acides chlorogénique et caféique, pigments, etc.) complètent cette composition, mais ne sont présents qu'en faible quantité dans le tubercule **(Delaplace, 2007)**.

Le tubercule de la pomme de terre contient une grande quantité d'amidon et se classe au quatrième rang des cultures les plus productives au monde après le maïs, le blé et le riz **(FAO, 2008).**

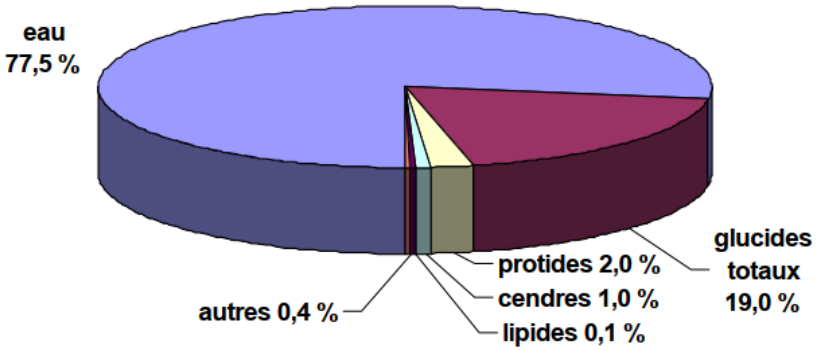



**Figure II.1 :** Représentation graphique de la composition biochimique moyenne d'un tubercule de pomme de terre (***Solanum tuberosum L.***). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la matière fraîche totale **(Delaplace, 2007)**

## II.3. La pomme de terre en Algérie : Statistiques de production (Abada et al, 2022 ; Khelifa, 2018).

La consommation de la pomme de terre en Algérie est l'une des plus importantes dans le monde, selon les chiffres annoncés par le ministre de

l'Agriculture Abdelkader Bouazgui, qui a indiqué aujourd'hui que l'Algérien consomme une moyenne de 100 à 111 Kg par an. Cette moyenne n'est que de 31 Kg/ an sur le plan mondial et représente presque un quart de ce que nous consommons en Algérie.

Cette tendance de consommation a amené les pouvoirs publics à augmenter la production locale qui a doublé sur une période de presque vingt ans. La production nationale de la pomme de terre a atteint :

- 26 millions de quintaux en 2009 (2,6 millions de tonnes),
- 47,8 millions de quintaux en 2016 (4,78 millions de tonnes) avec 156,000 ha cultivés.
- 50 millions de quintaux en 2017 (5 millions de tonnes) avec un rendement de 310 quintaux (31 tonnes) par hectare.

### II.4. Sous-produits de la pomme de terre :

Les co-produits ou sous-produits peuvent être considérés comme des déchets issus de la transformation des matières premières par l'industrie agro-alimentaire. Ils deviennent dès lors 'co-produits' et acquièrent le statut de matières premières. **(Decruyenaere et al, 2005)**. On ajoute aussi, les déchets issus des activités culinaires ménagères, les restaurants collectifs et commerciaux.

Les résidus issus de la pomme de terre peuvent se classer en :

- les co-produits issus du marché du frais après triage. Les tubercules non conformes issus de ce tri (les tubercules hors calibres, verts, déformés ou vitreux) sont ainsi orientés vers l'alimentation animale. Ces déchets constituent généralement 10 % de la production écoulée sur le marché du frais **(Decruyenaere et al, 2005)**.
- les co-produits issus de l'industrie agro-alimentaire (transformation pour l'alimentation humaine et féculerie). L'industrie de transformation de la pomme de terre pour l'alimentation humaine produit 3 grands types de co-produits **(Decruyenaere et al, 2005)** :

- des déchets crus,
- des épluchures à la vapeur,
- des déchets de purée.
- Des produits précuits déclassés, riches en matières grasses sont aussi disponibles mais en quantité moindre (Frites précuites, Chips et purées non commercialisables).
- Des eaux de lavages riches en amidon.

A côté de l'industrie de transformation, la féculerie fournit également **(Decruyenaere et al, 2005)**:

- des pulpes de pommes de terre (fraîche, surpressée, déshydratée),
- des résidus issus du râpage des tubercules pour l'extraction de la fécule,
- des solubles de pommes de terre riches en amidon et en protéines coagulables, appelés concentré protéique de pomme de terre (CPPT), obtenu à partir des eaux de végétation dans le processus de fabrication du fécule.

• On ajoute aussi les déchets issus des ménages et des restaurants (privés, collectifs, …) : pièces impropres à la consommation, épluchures, plats cuisinés à base de pomme de terre (frites, purées, …).

Les sous-produits de la pomme de terre, riches en amidons, sont principalement utilisés dans l'alimentation animale pour leurs propriétés nutritives et énergétiques. Ils sont aussi utilisés comme biofertilisants **(Decruyenaere et al, 2005)**. Cependant, l'amidon de ces déchets peut être recyclé dans de nombreux secteurs industriels non-alimentaires d'exploitation de l'amidon, tels que la production papetière, l'industrie pharmaceutique, cosmétique, textile, la production de matières plastiques bio-basées et biodégradables ainsi que pour la production de bioéthanol, qui est un carburant utilisé dans les moteurs à essence **(Wertz, 2011)**.

## II.5. Amidon de pomme de terre : Structure

L'amidon est le principal polysaccharide de réserve des végétaux supérieurs. L'amidon est biosynthétisés sous forme de grains dont la taille, la forme et la structure

cristalline dépendent de son origine botanique **(Seyed, 2012)**.

L'amidon consiste en deux glucanes structurellement différents : l'amylose, polymère linéaire (c.-à-d. non branché) et l'amylopectine, polymère fortement branché. L'amylopectine est le constituant principal de la plupart des amidons **(MONNET, 2008)**. La teneur en chacun des constituants est différente suivant l'origine de l'amidon **(Tableau II.1)**.

**Tableau II.1** : Teneur en amylose et amylopectine des amidons de différentes sources botaniques **(Wertz, 2011)**.

| Source botanique | Amylose (%) | Amylopectine (%) |
|---|---|---|
| Maïs | **28** | **72** |
| Pomme de terre | **21** | **79** |
| Blé | **28** | **72** |
| Maïs cireux (1) | **0** | **100** |
| Amylomaïs | **50-80** | **50-20** |
| Riz | **17** | **83** |
| Pois | **35** | **65** |
| Manioc | **17** | **83** |

La teneur en amylose varie entre 0 % (amidon de maïs cireux) et 70-80 % (amidon de pois ridé et maïs riche en amylose). Ces valeurs extrêmes sont obtenues pour des génotypes mutés, alors que la teneur en amylose des espèces sauvages telles que la pomme de terre, le blé et le pois lisse varie entre 18 et 35 %. L'amidon est constitué d'entités granulaires semi- cristallines qui résultent d'une organisation de ses deux constituants **(Wertz, 2011).**

### II.5.1. L'Amylose

L'amylose (**Fig. II.2)** est un polymère linéaire constitué de résidus D-glucopyranose liés par des liaisons α-1,4 (liaison avec l'oxygène glucosidique en

position axiale). Il est l'analogue α de la cellulose, qui, lui, est un polymère linéaire de résidus D-glucopyranose liés par des liaisons β-1,4 (liaison avec l'oxygène glucosidique en position équatoriale) **(Wertz, 2011).**

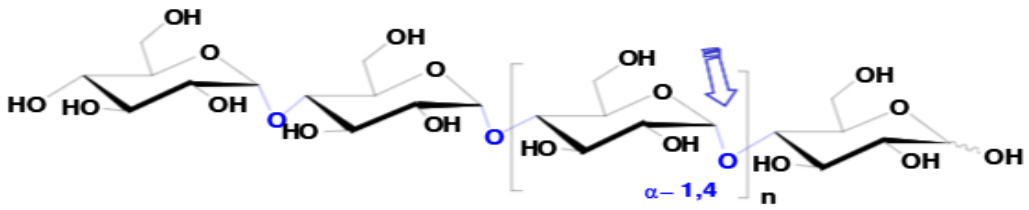



**Figure II.2**: Structure de l'amylose **(MONNET, 2008)**.

### II.5.2. Amylopectine

L'amylopectine **(Fig. II.3)** est un polymère fortement branché constitué de résidus D- glucopyranose liés par des liaisons α. Les liaisons glucosidique sont 1,4 sauf aux points de branchement où elles sont 1,6 **(Wertz, 2011).**

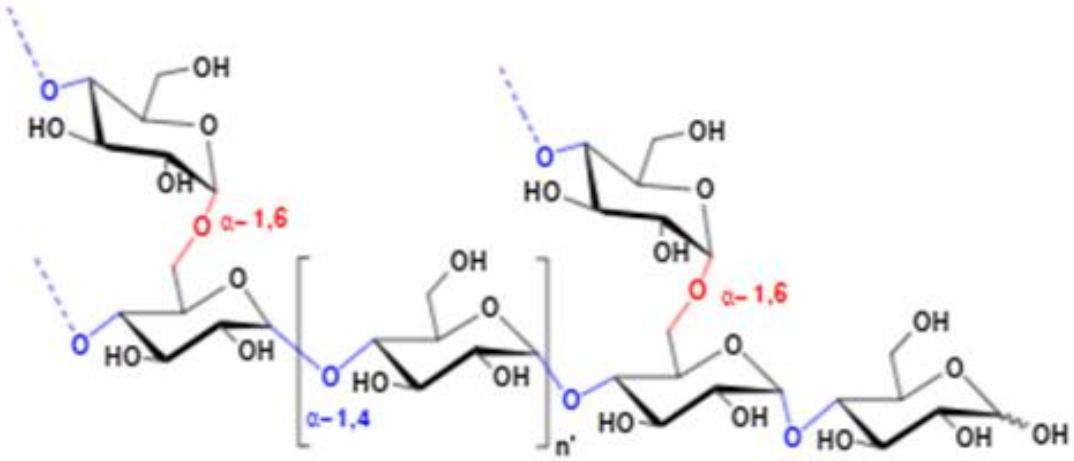



**Figure II.3** : Structure moléculaire de l'amylopectine avec les branchements **(MONNET, 2008)**.

## II.6. Propriétés

### II.6.1. Influence de la température :

- ***La gélification :***

Lorsque les grains d'amidons, en présence d'un excès d'eau, sont chauffés à une température suffisante, de l'eau pénètre en masse et engendre un gonflement de

ceux-ci. Par la suite lorsque le chauffage se poursuit, débute une lixiviation des molécules d'amylose qui s'échappent du grain. Les « petits » amyloses sont libérés plus facilement, tandis que pour avoir une dispersion totale, y compris celle des amyloses participant à la cristallisation de l'amylopectine, il fallait parfois atteindre des températures de 90°C. La température à partir de laquelle la dispersion des amyloses commence est fonction de l'origine botanique et du type de cristallinité des grains **(MONNET, 2008)**. La gélification commence graduellement à partir de 50°C mais elle dépend de l'agitation moléculaire, de la grosseur des grains, de la nature de l'amidon, de l'eau employée et de la concentration en amidon **(Sadek, 2015)**.

- ***La rétrogradation :***

Lorsqu'on redescend en température, l'amidon gélatinisé se réorganise, ou plus précisément que les chaînes d'amylose et d'amylopectine se réorganisent entre elles pour qu'énergétiquement l'ensemble soit plus stable. En effet, les chaînes, après être sorties du grain, se recombinent sous forme de double hélice mais de manière aléatoire. La recristallisation se fait de proche en proche. Cette recristallisation inévitable des empois d'amidon lors de leur retour à température ambiante est le phénomène de rétrogradation **(MONNET, 2008)**.

### II.6.2. Hydrolyse de l'amidon :

Il existe trois types d'action : thermique, chimique et enzymatique **(Sadek, 2015)** :

- L'action thermique modifie la teinte et la saveur de l'amidon grâce à la dextrinisation.
- L'action chimique : les acides hydrolysent partiellement l'amidon, ce qui entraîne la création de dextrines. Le gel qui se forme est plus fin. On accélère cette hydrolyse en augmentant la température.
- Il est également possible que l'amidon soit soumis à l'action d'enzymes telles que les amylases végétales, animales ou microbiennes.

# III. Les enzymes

## III.1. Généralité sur les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques intervenant dans diverses réactions. La production d'enzymes est une activité centrale de l'industrie biotechnologique moderne. Les marchés des enzymes industrielles continuent de croître avec une demande d'un nombre toujours croissant de biocatalyseurs supplémentaires. Les enzymes peuvent être obtenus à partir de plusieurs sources, telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes **(Headon et Walsh, 1994).**

## III.2. Classification des enzymes

La nomenclature des enzymes, ainsi que leur classification, dépendent de leur activité catalytique. Une nomenclature a été proposée par la commission des enzymes de l'union internationale de biochimie divisant les enzymes en sept grandes classes. Le numéro EC (Enzyme Commission) est utilisé pour classer les enzymes de manière numérique selon leurs réactions. **(Tableau III.1) (Garcia et al, 2023).**

**Tableau III.1:** Classification des enzymes **(Garcia et al, 2023)**.

| Enzyme Type | EC | Reaction | Examples |
|---|---|---|---|
| Oxidoreductase | EC1 | Oxidation reactions involve the transfer of electrons from one molecule to another | Lipoxidases<br>Dehydrogenases<br>Glucose oxidase |
| Transferase | EC2 | They catalyze the transfer of groups of atoms from one molecule to another | Aminotransferase<br>Transaminase |
| Hydrolase | EC3 | Hydrolysis reactions involve the cleavage of substrates by water | Lactase<br>Proteases<br>Trypsin |
| Lyase | EC4 | Catalyze the addition of groups to double bonds or the formation of double bonds via the removal of groups | Pectate lyases<br>Decarboxylase<br>Hydratases |
| Isomerase | EC5 | Catalyze the transfer of groups from one position to another on the same molecule | Topoisomerase<br>Glucose isomerase |
| Ligase | EC6 | They catalyze the joining of two molecules to form a new bond | Glutathione synthase<br>Aminoacyl tRNA synthetase |
| Translocases | EC 7 | Catalyze the movement of ions or molecules across membranes or their separation within membranes | Ubiquinone reductase<br>ATP synthase<br>Ascorbate ferrireductase |

## III.3. Aperçue sur l'alpha-amylase

### III.3.1. Définition et Nomenclature :

Les α-amylases (E.C.3.2.1.1) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons α- 1,4-glycosidiques internes dans l'amidon donnent des produits à faible poids moléculaire, telles que les dextrines, maltose et maltotriose ainsi que les unités de glucose. La composition saccharidique obtenue après hydrolyse de l'amidon est fortement dépendante de l'effet de la température, des conditions d'hydrolyse et de l'origine de l'enzyme. La Spécificité, la thermo stabilité et la réponse des enzymes aux pH sont des propriétés essentielles pour l'usage industriel.

Les amylases sont d'une grande importance pour la biotechnologie ; elles représentent environ 25% du marché mondial des enzymes. Ils peuvent être obtenus à partir de plusieurs sources, telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes. Aujourd'hui, un grand nombre d'amylases microbiennes stables sont disponibles et ont presque complètement remplacé l'hydrolyse chimique de l'amidon dans l'industrie du traitement de l'amidon. Les α-amylases sont l'une des formes les plus populaires et les plus importantes d'amylases industrielles **(De Souza et de Oliveira M, 2010)**.

### III.3.2. Caractéristique et propriétés de l'alpha-amylase :

#### III.3.2.1 Poids moléculaire :

Le poids moléculaire des alpha-amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons **(Schomburg et al, 1991)**

#### III.3.2.2 Température optimale :

Selon l'origine et les espèces, les alpha amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C **(Schomburg et al, 1991)**. En effet, l'alpha amylase bactérienne est réputé pour sa grande thermo-stabilité. Celle de ***Bacillus amyloliquefaciens*** est caractérisée par un optimum de température qui, selon les applications va de 70°C à 90°C, alors que l'optimum de l'alpha amylase fongique se situe entre 50°C et 70°C.

### III.3.2.3 pH optimum :

L'alpha -amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme **(McMahon et al 1999)**. L'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8 **(Kindle, 1983).**

### III.3.3 Origines :

Les alpha-amylases sont des enzymes omniprésentes produites par les plantes, les animaux et les microbes, où elles jouent un rôle dominant dans le métabolisme des glucides. Les amylases d'origine végétale et microbienne sont utilisées depuis des siècles comme additifs alimentaires. Les amylases d'orge sont utilisées dans l'industrie brassicole. Les amylases fongiques sont largement utilisées pour la préparation des aliments orientaux.

Malgré la large distribution des amylases, les sources microbiennes, à savoir les amylases fongiques et bactériennes, sont utilisées pour la production industrielle en raison d'avantages tels que la rentabilité, la consistance, la réduction du temps et de l'espace nécessaires à la production, ainsi que la facilité de modification et d'optimisation des processus **(Burhan et al, 2003).**

Parmi les bactéries, Bacillus sp. est largement utilisé pour la production d'alpha-amylase thermostable afin de répondre aux besoins industriels. ***B. subtilis***, ***B. stearothermophilus***, ***B. licheniformis*** et ***B. amyloliquefaciens*** sont reconnus comme de bons producteurs d'alpha-amylase et sont largement utilisés pour la production commerciale de l'enzyme pour diverses applications.

De même, les champignons filamenteux sont largement utilisés depuis des siècles pour la production d'amylases. Comme ces moisissures sont connues pour être de prolifiques producteurs de protéines extracellulaires, elles sont largement exploitées pour la production de différentes enzymes, dont l'alpha-amylase. Les champignons du genre Aspergillus sont les plus couramment utilisés pour la production d'alpha-amylase. La production d'enzymes par fermentation en milieu

solide (SSF) à l'aide de ces moisissures s'est avérée être une technique de production rentable **(Vihinen et Mantasala, 1989 ; Pandey et al, 2000)**.

### III.3.4. Mécanisme d'action

L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif : Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261 (donneur catalytique de l'hydrogène et Asp 328 (l'aide de catalyse) **(McCarter, 1996 ; Uitdehaag et al, 1999)**. En effet, la réaction catalytique est réalisée en trois étapes **(Fig. III.1) :**

- Protonation de l'oxygène glucosidique par le donneur de proton Glu 261 suivi d'une attaque nucléophile sur C1 du résidu du sucre en position 1 par Asp 231 et le départ de l'extrémité réductrice du substrat **(Davies et al, 1999)**.
- Activation d'une molécule d'eau, vraisemblablement par le maintien du Glu 261 de protoné **(Nielson et al, 2001)**
- Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1de résidu du sucre en position1**(Nielson et al, 2001)**

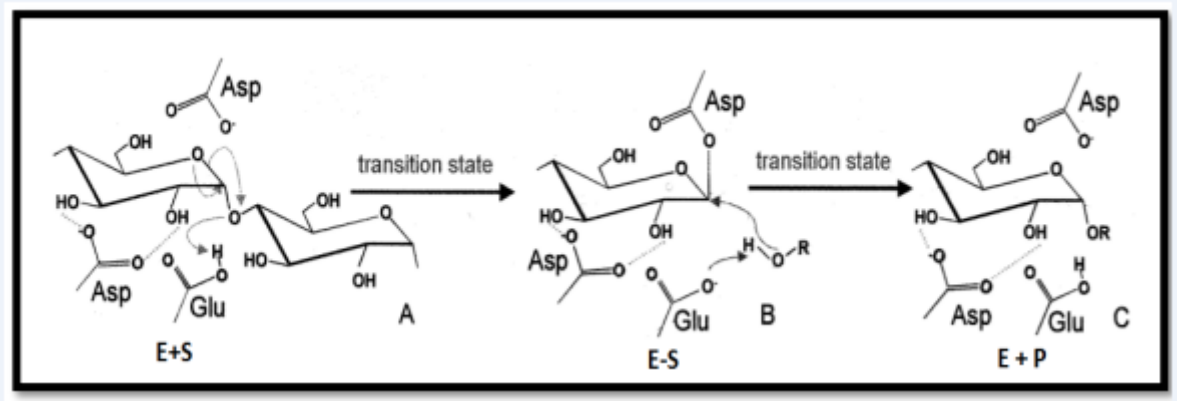



**Figure III.1:** Mécanisme d'action de l'alpha amylase **(Lim et Oslan, 2021).**

L'α-amylase (E.C.3.2.1.1) hydrolyse de manière aléatoire les liaisons glycosidiques α-1,4 dans l'amylose, l'amylopectine et le glycogène selon un mode endo. Ces enzymes contournent les liaisons glycosidiques α-1,6 sans les cliver.

L'hydrolyse de l'amylose par l'α-amylase entraîne sa conversion en maltose et maltotriose, suivie d'une deuxième étape de réaction : l'hydrolyse du maltotriose. L'hydrolyse de l'amylopectine par l'α-amylase produit également du glucose et du

maltose, ainsi qu'une série de dextrines α-limites ramifiées. Ces dextrines contiennent chacune quatre résidus de glucose ou plus avec les liaisons glucosidiques α-1,6 de la structure d'origine. Ces enzymes nécessitent du calcium comme cofacteur et peuvent être subdivisées en deux groupes :

- Les α-amylases liquéfiantes qui dégradent préférentiellement des substrats d'au moins 15 résidus.
- Les α-amylases saccharifiantes qui dégradent des substrats de 4 résidus ou plus.

Les applications commerciales des α-amylases comprennent la fluidification de l'amidon dans le processus de liquéfaction utilisé dans les industries du sucre, de l'alcool et de la brasserie. La liquéfaction est un procédé de dispersion de granules d'amidon insolubles dans une solution aqueuse, suivie d'une hydrolyse utilisant une amylase thermostable **(Vihinen et Mantsala, 1989).**

### III.3.5. Applications industrielles

Les α-amylases sont parmi les hydrolases les plus importantes pour toutes les industries à base d'amidon, et leur commercialisation est la plus ancienne, avec première utilisation en 1984, comme aide pharmaceutique pour le traitement de désordres digestifs. Aujourd'hui, les α- amylases trouvent l'application dans tous les processus industriels, avec une dominance des α- amylases microbiennes qui ont complètement remplacé, non seulement l'hydrolyse chimique dans les industries de transformation d'amidon, mais également dans les industries chimiques pharmaceutiques et autres **(Bennett, 1998).**

Actuellement, les α-amylases ont la part principale du marché mondial d'enzymes, dont plusieurs différentes préparations l'α-amylase sont disponibles avec de divers fabricants d'enzymes pour utilisation spécifique dans diverses industries **(Aehle et Misset, 1999).** Le **Tableau III.2**, rapporte les divers domaines d'application des α-amylases.

**Tableau III.2:** Différentes applications des α-amylases
**(Van der Maarel et al, 2002 ; Riegal et al, 2003 ; Gupta, 2003)**

| Secteur | Les usages |
|---|---|
| Industrie alimentaire | Production de sirops de glucose et de glucose cristallin<br>Production de sirops de maïs à haute teneur en fructose<br>Production de sirops de maltose<br>Réduction de la viscosité des sirops de sucre<br>Réduction de la formation de voile dans les jus de fruits<br>Solubilisation et saccharification de l'amidon pour la fermentation alcoolique dans les brasseries<br>Retardement du rassissement dans l'industrie de la boulangerie |
| Industrie des détergents | Utilisé comme additif pour éliminer les saletés à base d'amidon. |
| Industrie du papier | Réduction de la viscosité de l'amidon pour un encollage approprié du papier |
| Industrie textile | Encollage des chaînes des fibres textiles |
| Industrie pharmaceutique | Utilisé comme aide digestive. |

### III.4. La glucoamylase :

#### III.4.1. Définition :

La glucoamylase est une enzyme exo-agissant qui décompose l'amidon en ses unités constitutives, le β-D-glucose. La glucoamylase a été improprement appelée amyloglucosidase, glucamylase ou I-amylase **(Solomon, 1978)**. Un nom plus technique est α-(1→4) glucane glucohydrolase où glucane est le nom d'une série d'unités de glucose attachées et glucohydrolase décrit la rupture de la liaison entre deux unités de glucose. Le code EC 3.2.1.3 est le code enzymatique attribué par la commission des enzymes **(IUBM, 1992)**. Le chiffre 3 désigne les hydrolases qui catalysent le clivage hydrolytique de grosses molécules par addition d'eau. Le chiffre 2 indique les glycosidases, ces enzymes qui catalysent le clivage d'une liaison glycosidique. Les glycosidases sont ensuite subdivisées en celles hydrolysant les composés O-glucosyl, le groupe 3.2.1. Il existe plusieurs enzymes dans ce groupe,

dont la glucoamylase (EC 3.2.1.3) est le numéro 3 **(IUBM, 1992)**.

### III.4.2. Sources et formes de glucoamylase

Les glucoamylases peuvent être issues d'une grande variété de plantes, d'animaux et de micro-organismes, bien que la plupart proviennent de champignons. Les enzymes utilisées commercialement proviennent de souches d'***Aspergillus niger*** ou de ***Rhizopus sp.*** et servent à la conversion des malto-oligosaccharides en glucose **(Fogarty, 1983; Pandey, 1995).** Ces enzymes sont généralement considérées comme sûres (Generally Recognized As Safe ou GRAS) par la Food and Drug Administration (FDA) américaine.

### III.4.3. Propriétés de la glucoamylase :

Les glucoamylases peuvent hydrolyser 88,5 à 100 % de l'amidon soluble, mais peu d'entre elles sont capables de digérer l'amidon brut. Les glucoamylases de certaines souches d'***A. awamori*** et d'***A. oryzae*** sont connues pour hydrolyser l'amidon brut, et les valeurs de Km pour l'amidon brut diffèrent selon les différentes formes de glucoamylase **(Vihinen and Mântsâlâ, 1989).** La composition en acides aminés des glucoamylases fongiques montre une teneur élevée en thréonine et en sérine **(Fogarty, 1983)**, mais la composition des glucoamylases bactériennes varie d'une espèce à l'autre.

Lors de l'hydrolyse de l'amidon brut, un comportement synergique a été observé entre certains enzymes amylolytiques. Une action synergique de la glucoamylase et de l'α-amylase a été identifiée dans les enzymes d'***Aspergillus sp***. K-27 et d'autres souches de moisissures **(Abe et al. 1988 ; Saha and Zeikus, 1989).** La glucoamylase de cette souche était thermostable et son action sur la dégradation des granules d'amidon était renforcée en présence d'α-amylase. En utilisant 20 U d'activité glucoamylasique, on a obtenu une hydrolyse de l'amidon à 40 % en 9 h. Lorsque 0,2 U d'activité α-amylasique a été ajouté à 20 U de glucoamylase, la réaction a augmenté de 1,8 fois et, avec l'ajout de 5 U d'α-amylase, la vitesse de réaction a augmenté de 2,9

fois en 3 h **(Abe et al. 1988).**

L'ajout d'iso amylase a accéléré l'hydrolyse de l'amidon de maïs par la glucoamylase du koji noir et la pullulanase d'***Aerobacter*** a stimulé la digestion de l'amidon brut par la glucoamylase de ***Rhizopus*** **(Saha and Zeikus. 1989).**

Cette action synergique de l'α-amylase et de la glucoamylase sur l'hydrolyse de l'amidon soluble a été modélisée par des équations cinétiques. Au début de la réaction, l'α-amylase contribue à la formation de nouvelles extrémités de chaîne non réductrices, mais une fois que le poids moléculaire du substrat descend en dessous de 5 000 environ, seule l'équation de vitesse de la glucoamylase est utilisée **(Fujii and Kawamura, 1985).**

### III.4.4. Dosages de glucoamylase et leurs limites :

L'activité de la glucoamylase a été mesurée par réaction avec de gros oligosaccharides, comme l'amidon, en solution, puis en mesurant la quantité de glucose libérée. Un exemple typique est l'analyse réalisée par **(Ueda et al 1981)**, où le mélange enzyme-substrat suivant a été préparé : 5 ml d'amidon soluble à 1 %, 1 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4,5, 1 ml d'eau et 1 ml de solution d'enzyme. Après incubation à 40°C pendant 10 minutes, la quantité de substances réductrices dans un mélange de 1 ml a été déterminée par la méthode de Nelson-Somogyi **(Nelson, 1944)**. Une unité d'activité glucoamylase a été définie comme la quantité d'enzyme qui forme 1 mg de glucose dans 1 ml de milieu réactionnel dans les conditions d'analyse. Des analyses similaires de la glucoamylase ont été utilisées par d'autres chercheur **(Mahajan et al, 1983; Ghosh et al, 1990; Kuchin et al, 1993).**

L'hydrolyse de l'amidon par la glucoamylase peut être affectée par d'autres enzymes amylolytiques telles que l'α-amylase, la β-amylase, la pullulanase, l'isoamylase ou l'α-glucosidase, ce qui rend difficile l'estimation de l'activité. Des améliorations ont été obtenues en détectant la contamination par l'α-amylase en utilisant un amidon oxydé **(Saha and Zeikus, 1989)**.

La contamination par la pullulanase ou l'isoamylase peut être facilement évitée en utilisant l'amylose comme substrat, et la contamination par l'α-glucosidase en mesurant la différence d'activité enzymatique en utilisant l'amidon comme substrat, avec ou sans maltose. Un rendement plus élevé en glucose dans ce dernier cas révélerait la présence d'α-glucosidase **(Saha and Zeikus, 1989).**

### III.4.5. Applications industrielles des glucoamylases

La glucoamylase est la deuxième enzyme industrielle la plus répandue et vendue dans le monde, après la protéase. Les glucoamylases trouvent de nombreuses applications dans l'industrie. Cette enzyme est utilisée dans la production de dextrose, dans l'industrie boulangère, dans le brassage de bière à faible teneur en calories et dans l'hydrolyse des céréales complètes pour l'industrie de l'alcool.

L'application la plus importante de la glucoamylase est la production de sirops à haute teneur en glucose. D'autres produits de dextrose formés par l'action de la glucoamylase sont le sirop de maïs à haute teneur en fructose et les sirops à conversion élevée. La conversion de l'amidon en sucres est l'un des processus biotechnologiques les plus importants, avec une production annuelle de plus de 8 millions de tonnes **(Lee, 1991).**

Initialement, le D-glucose était préparé à partir d'amidon par hydrolyse acide, méthode découverte par Kirchoff en 1811 et de Saussure en 1815. Cependant, les rendements étaient faibles et les réactions de réversion considérables. Aujourd'hui, l'amidon est hydrolysé par un processus en deux étapes : la liquéfaction, puis la saccharification à l'aide d'un mélange d'enzymes amylolytiques - une alpha-amylase thermostable suivie de la glucoamylase **(Lee, 1991).** La première étape, appelée liquéfaction, consiste à traiter l'amidon avec de l'alpha-amylase à 85-100°C. La dextrine obtenue est soluble et peut être passée à travers un lit de glucoamylase immobilisée qui effectue une hydrolyse supplémentaire en unités de glucose. Une grande importance est accordée à la stabilité thermique et à la thermoactivité de la glucoamylase destinée à la transformation de l'amidon en sirops de glucose. Les

sirops à haute teneur en glucose contiennent 96-98% de D-glucose. Ils peuvent être utilisés directement, par exemple en fermentation, mais le transport et le stockage nécessitent des conditions chauffées pour éviter la cristallisation et la solidification.

Les sirops à haute teneur en glucose sont utilisés soit pour la production de D-glucose cristallin, soit comme matière première pour la production de sirops à haute teneur en fructose. Dans les applications de production de glucose cristallin, les concentrations de glucose les plus élevées possibles sont requises pour améliorer les rendements. Pour les sirops à haute teneur en fructose, cela permet de réduire la quantité d'isomérase de glucose nécessaire pour obtenir un certain niveau de fructose **(Fogarty, 1983).**

Les sirops à conversion élevée ont un équivalent dextrose (DE) de 60-70, comprenant 35-43% de glucose, 30-47% de maltose et 8-15% de maltotriose. Ces sirops ont une concentration maximale admissible de glucose d'environ 43%. Au-delà, le glucose risque de cristalliser. Ces sirops sont utilisés dans les industries brassicole et boulangère comme adjuvants des sucres fermentables. Ils servent également d'édulcorants dans les industries des boissons gazeuses, de la conserve et de la confiserie **(Fogarty, 1983).**

## IV. Généralités sur le bioéthanol

### IV.1. Le Bioéthanol : Biocarburant (Riess, 2012) :

Le monde fait actuellement face à une diminution de ses ressources énergétiques principalement basées sur des énergies non renouvelables à l'échelle d'une vie d'homme tel le pétrole. De plus ces ressources deviennent de plus en plus difficiles à exploiter et donc de moins en moins bon marché. Face à cet épuisement des réserves, l'émergence de certains pays, comme la Chine et l'Inde, augmente la pression exercée sur les ressources énergétiques. Par ailleurs, l'utilisation massive de ces énergies a pour effet d'augmenter la concentration en dioxyde de carbone dans l'atmosphère, augmentant l'effet de serre et engendrant un changement climatique.

Des alternatives d'énergies, qui sont renouvelables à court terme, existent comme : l'éolien, la géothermie, le solaire, l'énergie marémotrice, la biomasse... Certains organismes vivants sont capables de capter l'énergie solaire et de la stocker, ce phénomène est appelé la photosynthèse. Ce sont eux qui, après des millions d'années d'enfouissement, sont à l'origine du pétrole stocké dans le manteau terrestre. Il n'est donc pas surprenant que les plantes cultivées aujourd'hui permettent de produire des carburants aux propriétés similaires : léger, liquide et concentré en énergie.

Les biocarburants, appelés aussi agrocarburants, sont des carburants issus de la biomasse destinés au moteur thermique pouvant se substituer partiellement ou totalement aux carburants pétroliers. On distingue actuellement deux filières principales à partir des végétaux supérieurs terrestres :

- La filière biodiesel, à partir d'huiles végétales (colza, palme, tournesol…), de déchets (huiles alimentaires usagées, graisses animales).
- La filière éthanol à partir de la fermentation de sucres de betterave ou de canne, de l'amidon de blé, de maïs, de riz, de l'orge et de pommes de terre ou encore à partir de végétaux complets…

**IV.2. Etapes de production :**

En tenant compte de la composition biochimique des biomasses à fermenter, le bioéthanol peut être produit à partir :

- De substrats riches en saccharose (canne à sucre, betterave sucrière, etc., ou leurs déchets),
- De substrats riches en amidon (maïs, orge, blé, pomme de terre, etc., ou leurs déchets),
- De substrats cellulosiques tels que les résidus agricoles (la paille ou les cannes de maïs), les cultures énergétiques (le panic érigé, Tallis, miscanthus, ou des arbres à courte rotation), les résidus forestiers, les déchets ménagers constitués de résidus de fruits et de légumes (écorces, épluchures, pièces impropres à la consommation).

Les grandes lignes de la production du Bioéthanol sont en général identiques. La différence réside dans le procédé de prétraitement de la biomasse. Ce dernier varie en fonction de la nature biochimique des biomasses.

### IV.2.1 Préparation ou Pré-traitement de la matière première (Biomasse) (Riess, 2012) :

L'objectif de cette étape est de rendre la matière première simple et accessible à la fermentation alcoolique par la levure.

Pour ce qui est de la canne à sucre et des betteraves, le saccharose est directement fermentescible, il ne nécessite pas une hydrolyse car il est hydrolysé en glucose et en fructose par les enzymes (Saccharases, invertases) de la levure elle-même.

L'amidon contenu dans les plantes amylacées n'est ni fermentescible, ni accessible directement, il doit donc être transformé en glucose par des prétraitements chimiques (hydrolyse acide) enzymatique en utilisant des alpha-amylases et des glucoamylases.

Dans le cas de l'éthanol produit à partir de matière lignocellulosique, couramment appelé éthanol cellulosique, le procédé d'hydrolyse enzymatique est beaucoup plus complexe et laborieux puisque la matière lignocellulosique est formée d'une matrice rigide difficile à déstructurer pour libérer la cellulose

### IV.2.2. La fermentation alcoolique (Riess, 2012) :

Elle est réalisée dans un milieu riche en sucres issus de l'hydrolyse de la biomasse ou la matière première. Le moût est introduit dans le fermenteur puis inoculé avec le milieu de fermentation. La fermentation dure de 40 à 72 heures. Dans les conditions optimales de croissance de la souche utilisée (***Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis)***. Elle se déroule généralement en milieu non renouvelé (mode batch). L'équation bilan de la réaction de fermentation du glucose par ***Saccharomyces cerevisae*** est :

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ Pi + 2\ ADP \rightarrow 2\ C_2H_6O + 2\ CO_2 + 2\ ATP$$

Le rendement théorique limite de conversion du glucose en éthanol est donc de 0,511 gramme d'éthanol par gramme de glucose.

La croissance de ***Saccharomyces cerevisia*e** peut être limitée par l'accumulation des substances toxiques. Il faut signaler que les acides gras : l'acide octanoïque, décanoïque, formés par les levures, deviennent toxiques pour elle. Pour remédier à ce phénomène, du charbon est additionnée aux moûts avant ensemencement pour faciliter la reprise de la fermentation.

Les fermentations alcooliques sont des procédés multiphasiques, ce qui pose des contraintes biologiques et physico-chimiques. Les cellules vivantes constituent un système organisé avec des entrées de substrats, d'oxygène, de facteurs de croissance et des sorties de déchets comme le CO2 et l'éthanol. La croissance nécessite un environnement adéquat du point de vue du pH, de la température, de la force ionique, de la présence de cofacteurs enzymatique. Ceci permet le développement, la maintenance et la reproduction des cellules dans de bonnes conditions. Les systèmes multiphasiques posent des problèmes de transferts entre chacune des phases, ce qui entraine, lors de leurs mises en œuvre à grande échelle, l'hétérogénéité du milieu**.**

### IV.2.3 Extraction du bioéthanol (Riess, 2012) :

La liqueur fermentée contient entre 8 et 15 % d'alcool. L'éthanol est séparé de la liqueur par un système de distillation à plusieurs colonnes qui fournit un alcool pur à 96 %. Pour les besoins de commercialisation, l'éthanol est déshydraté par un tamis moléculaire. L'éthanol est alors dit « anhydre ». Un dénaturant y est ajouté en petite quantité (2 à 5 %) afin d'éviter qu'il soit commercialisé sur le marché de l'alimentation humaine.

L'éthanol et l'eau composent un azéotrope quand est atteinte une concentration en éthanol de 95,6% (w/w). Sa température d'ébullition à pression atmosphérique est alors de 78,2°C, pour 79°C concernant l'éthanol. Il est possible d'obtenir de l'éthanol pur en effectuant une distillation à une pression de 0,11

atmosphères, mais ce procédé est trop coûteux. Il est préférable d'effectuer deux étapes d'extraction. Une première ***distillation classique*** est effectuée pour obtenir un mélange proche de la proportion azéotropique. Plusieurs solutions existent ensuite pour déshydrater ce mélange, la distillation azéotropique, la distillation extractive, la séparation sur tamis moléculaire ou la pervaporation.

### IV.3. Génération de bioéthanol

La production de bioéthanol **(Figure IV.1)** à base de biomasse est plus durable et largement distribuée. À l'heure actuelle, il existe trois générations de bioéthanol qui ont été fondées sur différentes matières premières. Le bioéthanol se répartie en plusieurs classes comme il est indiqué dans le **Tableau IV.1**:

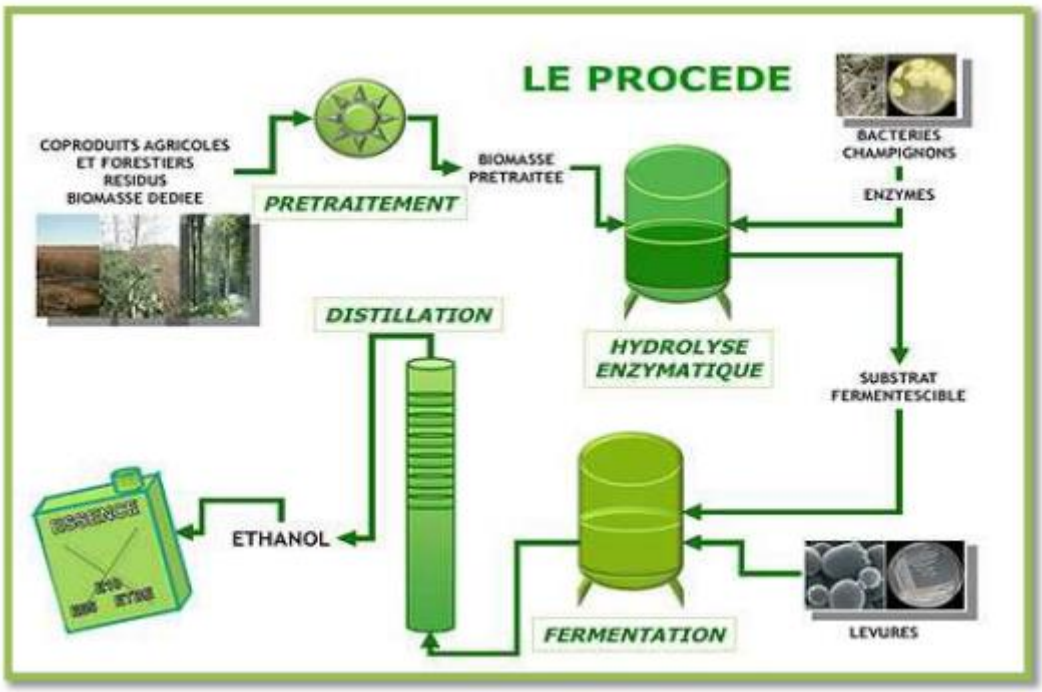



**Figure IV.1**: Procédé de production de bioéthanol.

### IV.3.1. Le bioéthanol de première génération

Le bioéthanol de première génération est obtenu par fermentation alcoolique de sucres fermentescibles (glucose, saccharose, etc.) **(Demirbas, 2009)**. Ces sucres sont soit directement présents dans la plante (canne à sucre, betterave sucrière), soit

obtenus après hydrolyse enzymatique de l'amidon contenu dans les grains de blé ou de maïs **(Lestari et al, 2009)**

Cependant, le principal inconvénient du bioéthanol de première génération est la menace de limitation de l'approvisionnement alimentaire qui peut affecter la population mondiale humaine car les matières premières sont dérivées de sources alimentaires. En outre, l'utilisation des ressources alimentaires pour le carburant peut entraîner une augmentation des prix des denrées alimentaires. D'un autre côté, il est important de préciser que la première génération de bioéthanol est économiquement déraisonnable, car les teneurs en carbone des plantes sont principalement perdues au cours du processus de conversion **(Akbi, 2013).**

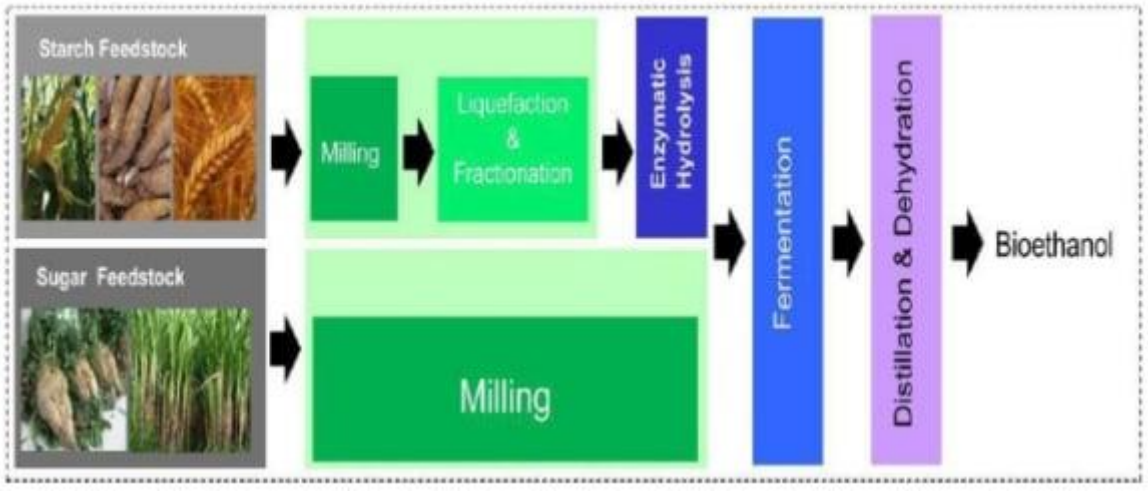



**Figure IV.2**: Production de bioéthanol de première génération à partir de la biomasse **(Sims et al, 2008)**

### IV.3.2. Le bioéthanol de deuxième génération :

Le bioéthanol de deuxième génération, également appelé « biocarburant avancé », est produit par des matières premières lignocellulosique et des résidus de forêts agricoles. Les avantages de ces matières premières sont la facilité de disponibilité. Toutefois, l'expansion industrielle du bioéthanol de deuxième génération a connu l'obstacle dû à certains problèmes technologiques. Il s'agit du coût élevé et du rendement moyen du bioéthanol en raison de sa composition de lignine. D'autres

problèmes principaux liés à la production de bioéthanol de deuxième génération sont l'exigence de technologies et d'installations de pointe **(Akbi, 2013).**

### IV.3.3. Le bioéthanol de troisième génération :

Les algues sont considérées comme la matière première potentielle pour la production de bioéthanol de troisième génération car la biomasse peut être convertie directement en énergie. Généralement, l'utilisation de cette matière première dépend de la technologie et l'environnement marin **(Akbi, 2013)**.

| Génération de bioéthanol | Première génération | Deuxième génération | Troisième génération |
|---|---|---|---|
| Source de matière première | Culture comestible (canne à sucre, mais, betterave) | Culture non comestible (résidus agricoles et forestiers) | Biomasse algale |
| Utilisation des terres pour la culture | Croque sur les terres arables | Croque sur les terres arables et marginales | Eau de mer<br>Eaux douces<br>Eaux usées |
| Technologies de conversion | Extraction de sucre<br>Fermentation et distillation | Prétraitement, hydrolyse, fermentation, distillation | Distillation et Fermentation |
| Rendement en bioéthanol | Faible | Moyen | élevé |
| Impact sur l'environnement | Faible apport à l'atténuation du $CO_2$ | Contribution élevée à l'atténuation du $CO_2$ | Contribution élevée à l'atténuation du $CO_2$ |
| Avantages ou inconvénients | Processus de conversion relativement simple | Pas de concurrence avec la ressource alimentaire | Investissements limités et difficultés dans la conception des processus |

**Tableau IV.1** Les trois générations de bioéthanol **(Lorne, 2011)**

### IV.4. Les avantages et les inconvénients de bioéthanol (Riess, 2012) :

### IV.4.1. Les avantages :

- Transformer les déchets agricoles en éthanol : un choix gagnant pour l'environnement et l'économie : il s'agit d'une valorisation de déchets pour une énergie propre et durable (l'éthanol est une source d'énergie renouvelable et écologique).

- Stimulation économique et création d'emplois dans les zones rurales
- Réduction de la pollution de l'air et du réchauffement climatique
- Amélioration des performances des moteurs

### IV.4.2. Les inconvénients

- **Émissions polluantes :** Les véhicules à l'éthanol émettent plus d'oxydes d'azote, d'éthylène et d'acétaldéhyde que ceux à essence.
- **Coût :** L'éthanol est généralement plus cher que l'essence pour les pays producteurs de pétrole.
- **Corrosion :** L'éthanol contient de l'eau qui peut corroder les pièces du moteur et du système de carburant.
- **Inflammabilité :** L'éthanol est plus inflammable que l'essence, ce qui requiert des précautions de sécurité accrues.

# PARTIE EXPERIMENTALE

Ce travail a été réalisé au niveau du hall technologique de l'université Yahia Farès de Médéa. Il faut signaler que les conditions opératoires, les méthodes d'analyse, ainsi que le protocole général de cette étude ont été adaptés aux moyens disponibles.

Les objectifs de ce travail se résument ainsi :

1/ Caractériser les deux enzymes d'hydrolyse de l'amidon : l'α-amylase pour la liquéfaction et la glucoamylase pour la saccharification.

2/ Déterminer définitivement les méthodes d'évaluation des activités enzymatiques dans les conditions optimales afin de pouvoir quantifier les enzymes utilisées lors de l'hydrolyse.

3/ Optimiser le prétraitement enzymatique de l'amidon des épluchures de la pomme de terre et spécialement par la Glucoamylase.

4/ Produire de l'éthanol à partir de l'amidon des épluchures de pomme de terre en passant par étapes suivantes :

- Une étape de prétraitement physique et enzymatique en utilisant l'α-amylase pour la liquéfaction et la glucoamylase pour la saccharification dans les conditions optimisées.
- Une étape de fermentation alcoolique en utilisant *Saccharomyces cerevisiae*.
- Récupération de l'éthanol produit par distillation.

# I. Matériels :

## I.1. Verreries et petit matériel :

- Verrerie de laboratoire : pipettes + poire, fioles jaugées, béchers, erlenmeyers, cristallisoirs, éprouvettes, verre de montre, tubes à essaies….

- Spatules, micropipettes, barreaux magnétiques, thermomètres, pinces métalliques, bec bensun.

## I.2 Réactifs, produits et solutions :

- Iode ($I_2$).

- Iodure de potassium (KI).

- Solution d'iodine mère (0.1N) et Solutions d'iodine diluées 0.05N et 0.001N.

- Acide chlorhydrique HCl pur (12N), solutions d'HCl (0.1N) et (0.2N).

- Solution tampon (acétate de sodium tri hydraté/ acide acétique), pH 5.8.

- Solutions d'amidon de concentration différentes.

-Réactif de dosage du Glucose type « Bio labo ».

-Solution de bichromate de potassium (0.1M).

-Solution d'acide sulfurique 25%.

-NaOH 0.01N.

- Phénolphtaléine

La préparation de certaines solutions est indiquée sur l'**annexe 01.**

**I.3. Equipements :**

- Agitateur magnétique « Heidolph MR Hei-standard »

- Balance « Sartorius »

- Spectrophotomètre (UV-Visible) « UV mini 1240-SHIMADZU »

- pH mètre « Hanna »

- Bain-marie « Memmert »

- Autoclave « Memmert »

-Centrifugeuse « EBA20 »

- Dispositif de distillation « Jeulin ».



### I.4. Matériel biologique :

**• Biocatalyseurs (Enzymes) :**

- Alpha-amylase BAN 480L en solution, aimablement fournie par le complexe SAIDAL de Médéa : Code 09330028 L, Titre : 3.7 à 4.1 $*10^6$ unités CEIP /100 ml, Densité : 1.2g/ml. Température optimale **55°C, pH $_{Optimum}$ = 6.**
- Glucoamylase en poudre : Température optimale **65°C**, **pH $_{Optimum}$ =5 (optimisés dans cette étude).**

**• Micro-organismes :**

- *Saccharomyces cerevisiae* commercialisée « S.I. Lesaffre Marq-France ».

- **Biomasse à fermenter ou matière première :** Épluchures de pommes de terre.

## II. Méthodes, Résultat et Discussion :

### II.1. Caractérisation de l'alpha amylase :

Il faut signaler que la caractérisation de la Ban alpha-amylase a été déjà réalisée par **Abdesselam, Bennia, 2016.** Selon cette étude cette enzyme possède une activité maximale à pH6 et à T°=55ºC. Le rapport E/S optimale était de 30 CEIP/g d'amidon soluble. Ces auteurs on établis un protocole qui permet de calculer l'activité alpha-amylase et qui converge dans ces résultats avec l'activité signalée par le fournisseur de l'enzyme.

Le problème principal dans le test de l'activité alpha-amylase est le degré de solubilité de l'amidon : **Boumenir et Azzouzi, 2019 ; Cherifi et Bennaissa, 2022** ainsi que **Khelil cherfi et Sadfi, 2021** ont pu confirmer la validité du test de l'activité alpha-amylase en utilisant un amidon moins soluble.

Dans notre cas, nous avons trouvé des problèmes avec l'insolubilité de l'amidon disponible, ce qui nous a amené à tester plusieurs types d'amidon afin de pouvoir sélectionner le plus valable au test d'activité alpha-amylase **(Figure II-1)**.




**Figure II-1 :** Photos de solutions d'amidons de plusieurs origines.
Solutions préparées dans l'eau froide sur laquelle nous avons ajouté de l'eau bouillante.

Parmi les solutions testées la solution 5 est la plus soluble. Cependant, cette dernière se décante après préparation (comme toute les autres solutions insolubles). Nous n'avons donc pas un amidon soluble. Nous avons donc terminé notre travail avec les deux solutions les plus solubles (4 et 5) en modifiant le protocole de la préparation de ces solutions **(Cf. annexe 1)**.

### II.1.1. Essais en présence d'amidon insoluble :

Afin de solubiliser l'amidon, nous avons suivi la préparation décrite en **annexe 1**. L'**annexe 2** décrit le protocole d'établissement de la courbe d'étalonnage destinée au dosage de l'amidon.

En présence d'un amidon insoluble, nous avons déjà des problèmes au niveau des résultats de la courbe d'étalonnage. La **Figure II-2** présente les résultats de trois essais réalisés dans les mêmes conditions et avec le même type d'amidon : nous avons trois droites différentes avec des pentes présentant des écarts importants. Bien que les préparations ont été réalisées en respectant le même protocole, mais la solubilité de l'amidon est variable. De plus, l'examen de toutes les solutions préparées montre la formation de particules d'amidons insoluble qui restent en suspensions. Ce type d'amidon est donc exclu.

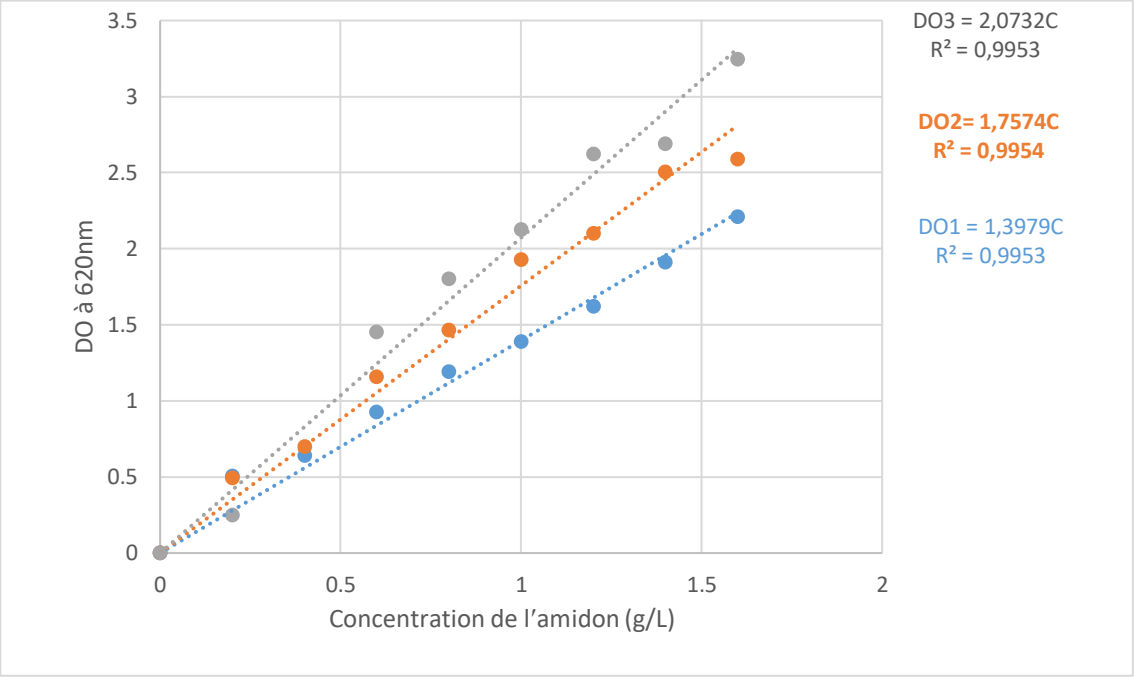



**Figure II-2** : Courbes d'étalonnages destinées au dosage de l'amidon (obtenues avec 3 essais réalisés dans les mêmes conditions).

### II.1.2. Essais en présence d'amidon d'une solubilité modérée :

**1/ Courbe d'étalonnage :**

La solubilisation de l'amidon, ainsi que l'établissement de la courbe d'étalonnage ont étés réalisés selon les mêmes protocoles décrit en **annexes 1 et 2.** Afin d'assurer une bonne solubilité, nous avons réalisé une dispersion de la solution mère à 130°C sous pression pendant 1h. Cette méthode a été adoptée par **Thivend et al., 1965** pour solubiliser l'amidon lors des tests de l'activité alpha-amylase.

La **Figure II-3** montre que les deux courbes d'étalonnage obtenues en utilisant de l'amidon dispersé et non dispersé sont identiques et présentent des pentes très proches. De plus les pentes sont très proches de celles trouvés par **Boumenir et Azzouzi, 2019 ; Cherifi et Bennaissa, 2022** ainsi que **Khelil cherfi et Sadfi, 2021.**

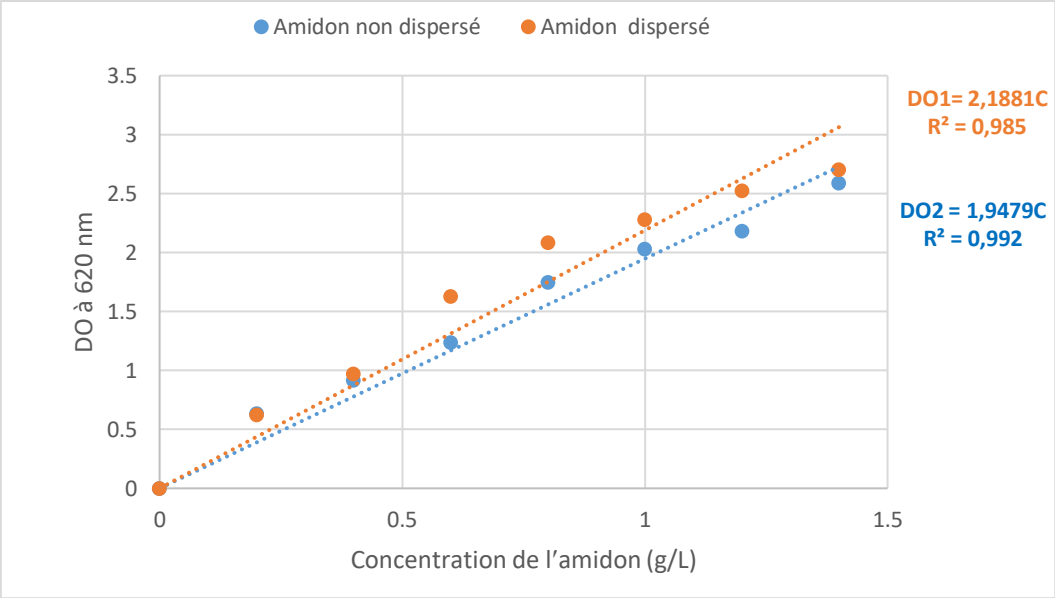



**Figure II-3 :** Courbes d'étalonnage obtenues pour l'amidon dispersé et non dispersé.

Nous avons essayé de diminuer les densités optiques (supérieurs à 1) en changeant le diluant : eau distillée au lieu HCl (0,1N) tout en gardant la même concentration du réactif (iodine 0,001N) ou en changeant la concentration du réactif : Iodine 0,0005N au lieu 0,001N tout en gardant le même diluant (HCl 0,1N), car la concentration de l'amidon, la nature du diluant et la présence d'ions peuvent tous influencer la dispersion des particules d'amidon et donc la DO. **La Figure II-4** montre que les deux courbes possèdent des pentes très proches de celles obtenues en **Figure II-3** (courbes obtenues pour le HCl 0,1N et pour l'idoine 0,001N). Cela indique que le diluant a une faible influence sur la dispersion de notre amidon et que le réactif se trouve déjà en excès.

A cet effet, et vue la répétabilité et la reproductibilité des résultats, et puisque nos courbes d'étalonnage sont très similaires à celles obtenues par des travaux antérieurs, nous terminons notre travail avec ce type d'amidon tout en retenant :

- Le HCl 0,1N comme diluant puisque l'activité alpha amylase est arrêtée dans les prélèvements en diluant ces dernier dans du HCl 0,1N.
- L'iodine 0,001N comme réactif.

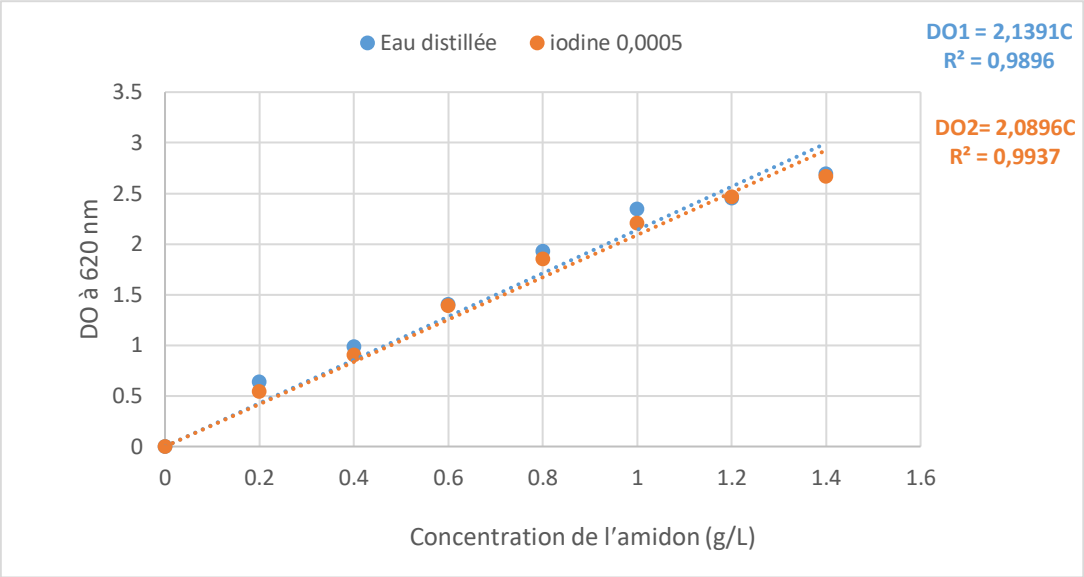



**Figure II-4 :** Courbes d'étalonnage obtenues avec l'eau distillée (iodine 0,001N) et avec iodine 0.0005N (diluant HCl 0.1N).

**2/ Test de l'activité enzymatique :**

Nous avions deux flacons de la BAN Alpha-amylase qui dataient d'une année (2 échantillons issus du même lot). L'activité des deux flacons a été testé afin de prouver la reproductibilité de la méthode de mesure de l'activité alpha-amylase sous des conditions déjà optimisées par **Abdesselam et Bennia, 2016 (**pH6 T°=55ºC).

**Méthode :**

Le suivi de la réaction enzymatique se fait en mesurant la quantité restante en amidon à chaque instant en utilisant la courbe d'étalonnage de la **Figure II-3** (aussi en **Annexe 02)**. Le protocole se résume ainsi :

1. Préparer 100 ml de solutions d'amidon à 5g/L, 10 g/L, 20 g/L et 30 g/L dans du tampon pH6.
2. Incuber les solutions dans un bain marie à une température de 55ºC. Apres stabilisation de la température. Ajouter pour chaque solution 0.5 ml d'enzyme diluée au 1/1000.

**3.** Prélever 1ml du milieu réactionnel à T0, 5 min, 10 min et 15 min. Faire des dilutions avec HCl (0.1 N) afin d'arrêter la réaction et pour mesurer la quantité d'amidon restante dans la gamme d'étalonnage.

**5.** Ajouter à 1ml du mélange final 2.4ml d'iodine (0.001N).

**6.** Mesurer l'absorbance à 620nm après une incubation à l'abri de la lumière pendant 15 min.

**7.** Déduire les concentrations en amidon correspondantes aux prélèvements à partir de la courbe d'étalonnage.

**Résultats et discussion**

Les courbes cinétiques correspondantes aux deux échantillons d'alpha-amylase sont représentés sur la **Figures II-5**. Malgré la durée de conservation, les deux échantillons sont encore fonctionnels, car nous avons une diminution de la concentration de l'amidon pour toutes les concentrations initiales testées (5g/L ; 10g/L ; 20g/L et 30g/L). Pour les concentrations initiales de 5g/L, toute la quantité d'amidon est pratiquement dégradée au bout de 10 min (**Figures II-5)** alors que pour C0=10 g/L, la concentration d'amidon atteint un équilibre aux environ de 4g/L à partir de 10min (**Figures II-5)**. Pour les concentrations initiales de 20 g/L et 30g/L, la cinétique atteint son équilibre à partir de de 15 min donnant des concentrations situées aux environs de (8-9) g/L pour C0=20g/L et (13,5-17,5) g/L pour C0=30g/L.

Des mesures de la vitesse initiale de la réaction aux différentes concentrations d'amidon ont été réalisées. Ils correspondent aux pentes des parties linéaires des courbes cinétiques avant établissement de l'équilibre. Les résultats sont représentés sur **Figure II-6** pour les deux échantillons 1 et 2.

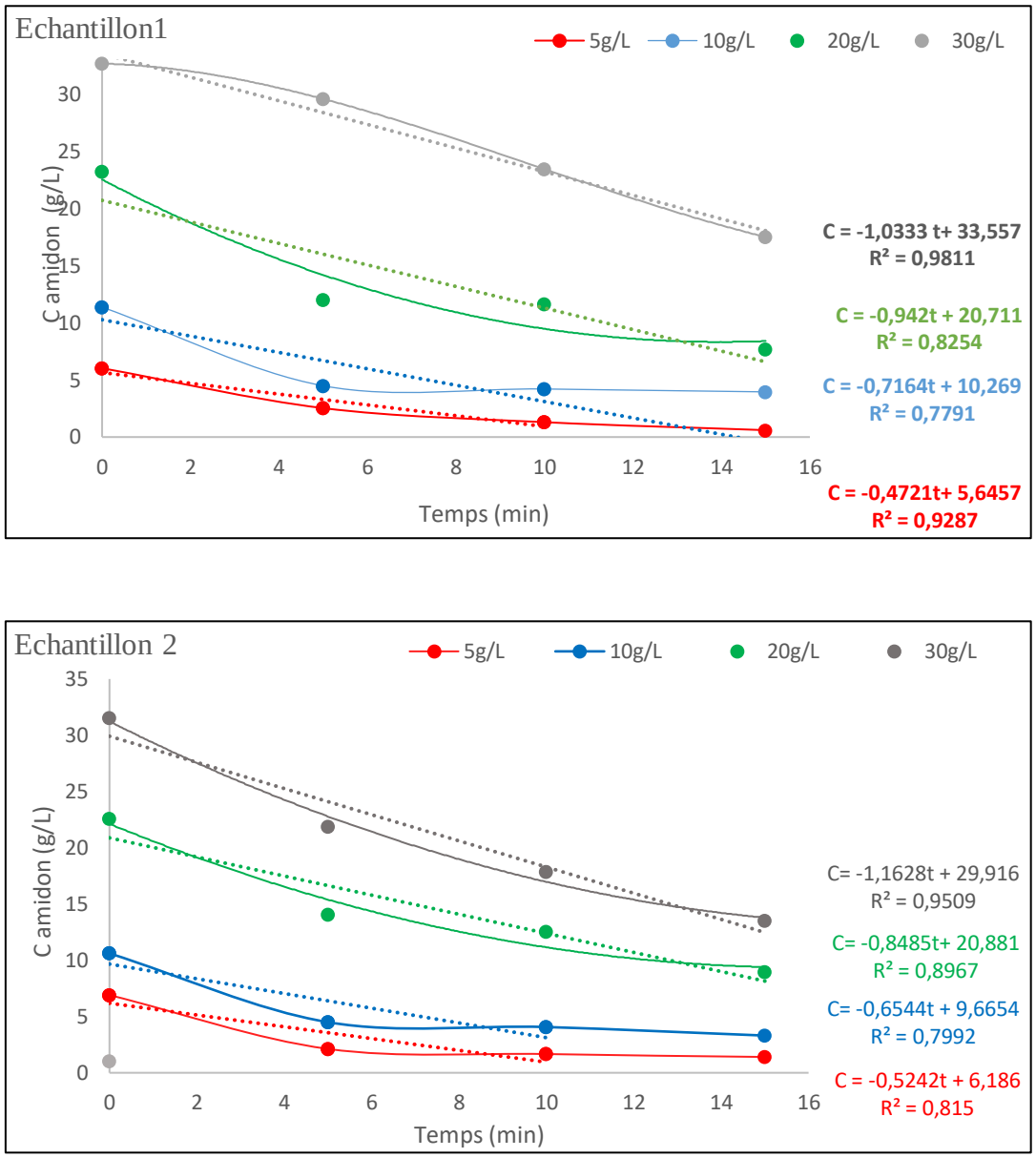
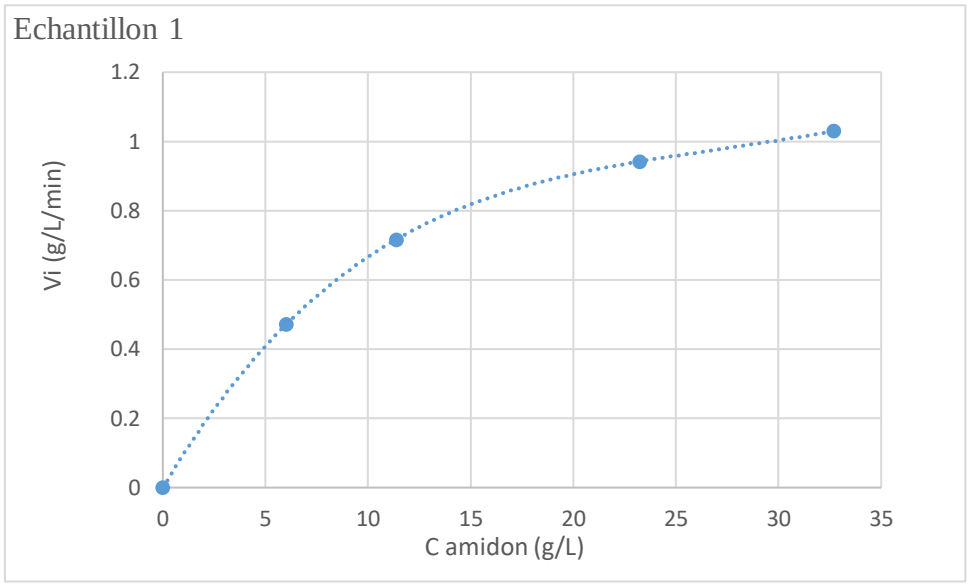



**Figure II-5:** Cinétique de dégradation de l'amidon par les deux échantillons d'alpha-amylase à pH=6, T°=55°C

Les deux courbes de saturation sont des hyperboles. Nous avons une augmentation de la vitesse de la réaction avec l'augmentation de la concentration de l'amidon jusqu'à un maximum (saturation de l'enzyme). Ce comportement correspond au modèle cinétique de Michaelis-Menten selon l'équation :

$$Vi = \frac{V\ \max[s]}{Km + [s]} \quad \text{.....(1)}$$



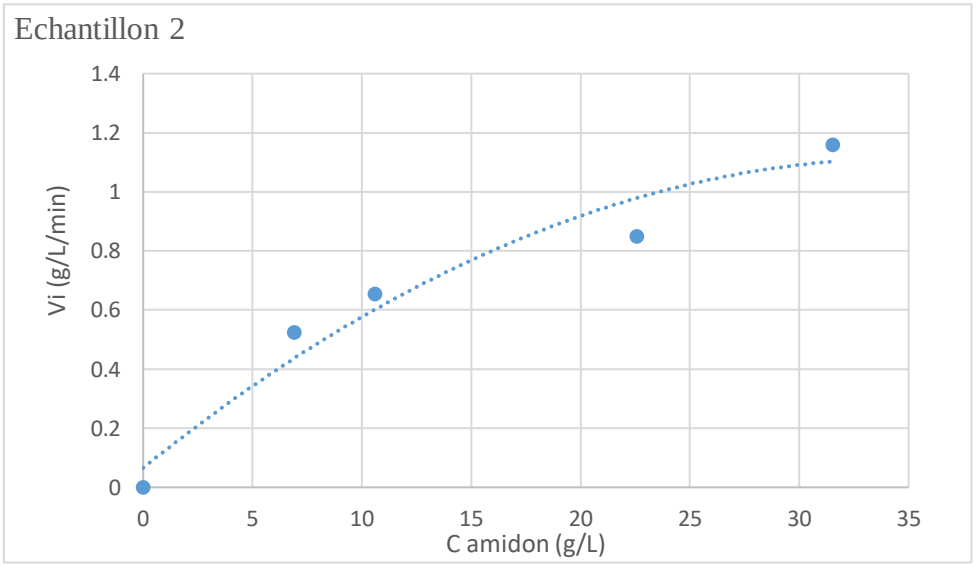




**Figure II-6 :** Courbe de saturation : Évolution la vitesse initiale (Vi) des deux échantillons d'alpha-amylase en fonction de la concentration initiale en amidon.

A partir de la courbe de saturation de Michaelis-Menten, nous pouvons déterminé les constantes Km et Vmax. Vmax correspond à la vitesse maximale pour une concentration saturante en substrat. Km (constante de Michaelis-Menten) est la concentration en substrat correspondante à la moitié de la vitesse maximale. Elle est inversement proportionnelle à l'affinité (1/Km) de l'enzyme pour son substrat.

Les vitesses maximales des deux échantillons obtenues expérimentalement et tirées à partir des deux courbes de saturation sont très proches (**Figure II-6**) ». Elles sont de:

- 1,03 g/L/min pour l'échantillon 1 avec un Km aux environs de 7,5 g/L, ce qui correspond à une affinité 1/Km de 0 ,13 L/g.
- 1,16 g/L/min pour l'échantillon 2 avec un Km aux environs de 10 g/L, ce qui correspond à une affinité 1/Km de 0 ,1 L/g.

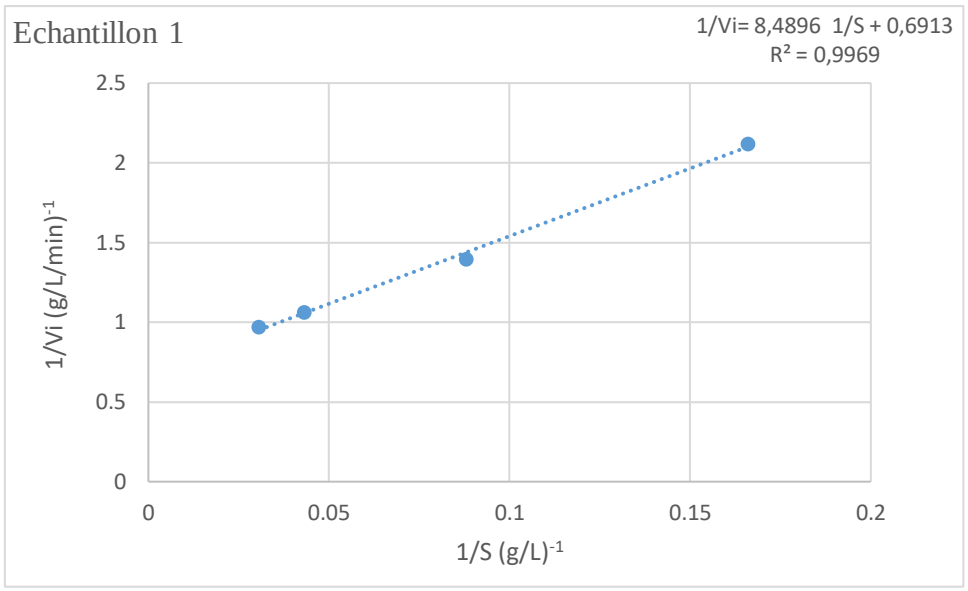
La courbe de saturation étant non linéaire, il est difficile d'évaluer précisément les valeurs de Km et Vmax. Pour cela, nous avons essayé d'appliquer la linéarisation de Lineweaver-burk (**Figure II-7**) selon l'équation :

$$\frac{1}{Vi} = \frac{Km}{V\,\max}\frac{1}{[s]} + \frac{1}{V\,\max} \quad \text{.....(2)}$$

et la linéarisation d'Eadie Hofstee (**Figure II-8**), selon l'équation :

$$Vi = V\,\max - Km\frac{Vi}{[s]} \quad \text{.....(3)}$$

Les deux linéarisation (**Figure II-7** et **Figure II-8**) tracées pour les deux échantillons permettent d'obtenir une droite linéaire. D'après les équations, nous pouvons déterminer les constantes cinétiques avec précision. Ces derniers sont représentés sur le **Tableau II-1.**



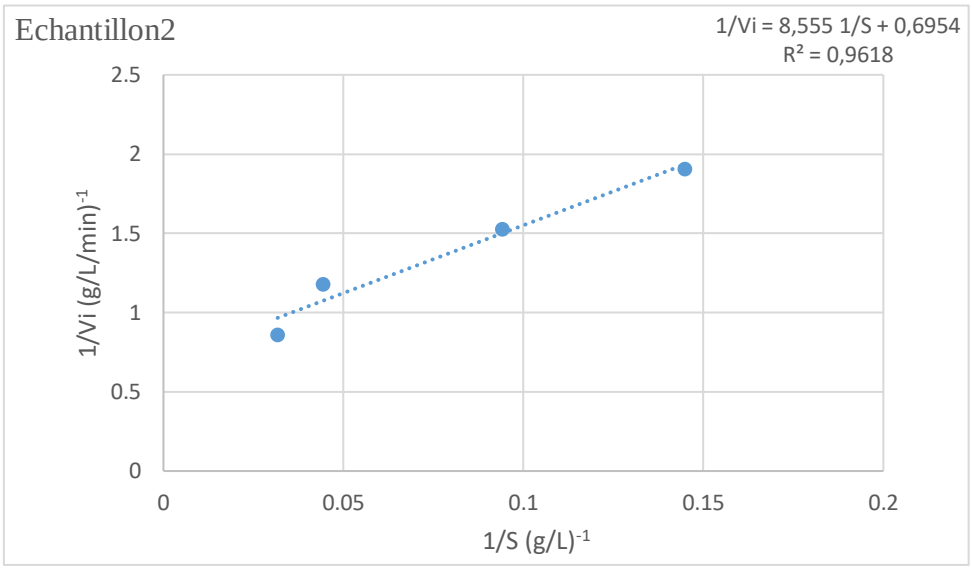
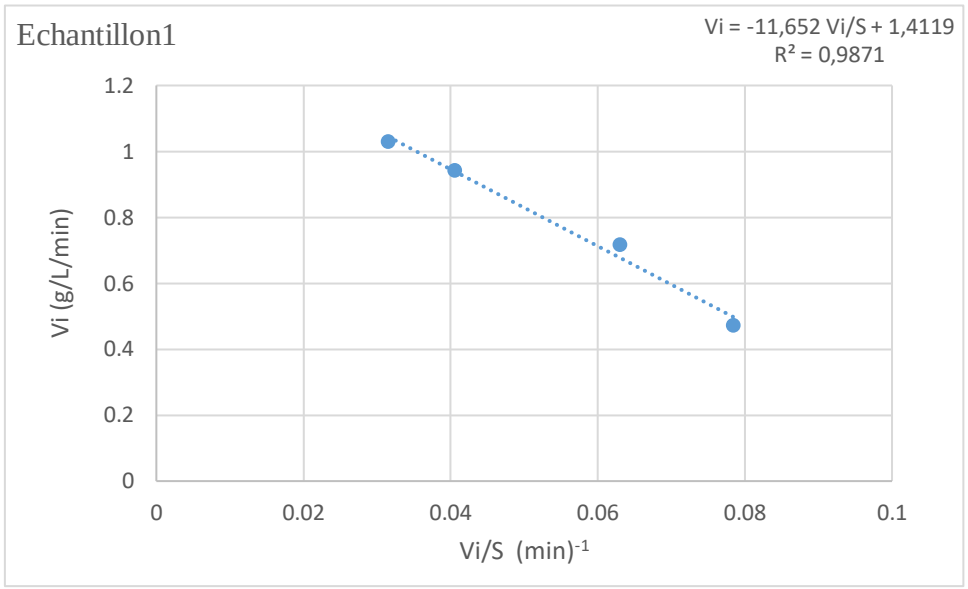




**Figure II-7 :** Linéarisation de Lineweaver-burk tracée les deux échantillons d'alpha-amylase.



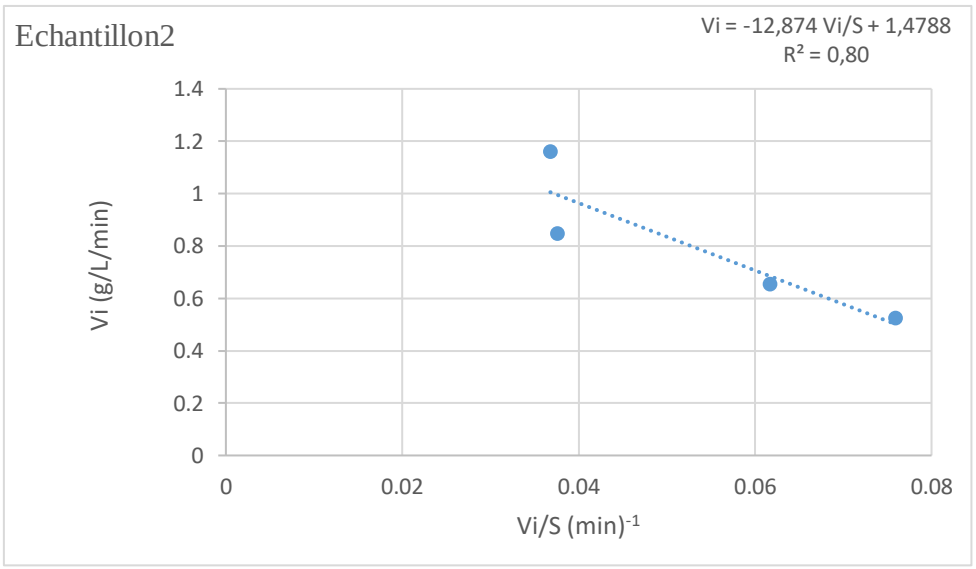




**Figure II-8 :** Linéarisation d'Eadie Hofstee tracée pour les deux échantillons d'alpha-amylase.

**Tableau II-1** : Constantes cinétiques tirés à partir des linéarisations d'Eadie Hofstee et Lineweaver-burk : Comparaison avec celles tirés des courbes de Saturation.

| | Km(g/L) | Vmax (g/L/min) | L'affinité 1/Km (L/g) |
|---|---|---|---|
| | **Echantillon 1** | | |
| Lineweaver-Burk | 12.22 | 1.44 | 0.08 |
| Eadie Hofstee | 11.65 | 1.41 | 0.08 |
| Courbe de saturation | 7.5 | 1.03 | 0.13 |
| | **Echantillon 2** | | |
| Lineweaver-Burk | 12.31 | 1.44 | 0.08 |
| Eadie Hofstee | 12.87 | 1.47 | 0.077 |
| Courbe de saturation | 10 | 1.16 | 0.1 |

Les deux modèles convergent vers les mêmes constantes cinétiques Km et Vmax. Les vitesses maximales calculées sont importantes de celles trouvées expérimentalement pour une concentration saturante de 30g/L donnant des Km aussi plus grandes par rapport au Km tirées directement à partir des courbes de saturation. En fait, ces modèles calculent les vitesses maximales pour des concentrations saturantes en substrat, supérieures à 30g/L en tenant compte d'une solubilité idéale de l'amidon utilisé. Réellement, nous avons travaillé avec un amidon difficile à solubiliser à des concentrations supérieures à 30g/L.

***Bilan du test de l'activité enzymatique***

***Echantillon 1 :***

- **Vmax réelle=1,03g/L/min,** ce qui correspond à **0,103 g/min/100ml**
- La quantité d'enzyme diluée au 1/1000 utilisée est de 0,5ml/100ml de volume réactionnel. La vitesse exprimée en g d'amidon hydrolysé/min/volume d'enzyme est donc **0,103g /min/0,5ml** d'enzyme diluée au 1/1000 soit **0,206 g/min/ml** d'enzyme diluée au 1/1000.

- L'activité enzymatique par ml d'enzyme pure est de **206 g/min/ml.**
- En convertissant l'activité (g/min/ml) en (mg/s/ml), nous avons **3433.33 mg/s/ml** d'enzyme pure.

En unité CEIP (mg/10s/ml), nous avons **34333.3 CEIP/ml** d'enzyme pure.

***Echantillon 2 :***

- **Vmax réelle=1,16g/l/min**, ce qui correspond à **0,116 g/min/100ml**
- La vitesse exprimée en g d'amidon hydrolysé/min/volume d'enzyme est **0,116g /min/0,5ml** d'enzyme diluée au 1/1000 soit **0,232 g/min/ml** d'enzyme diluée au 1/1000.
- L'activité enzymatique par ml d'enzyme pure est de **232 g/min/ml** ce qui correspond à 3866.66 mg/s/ml d'enzyme pure.

En unité CEIP (mg/10s/ml), nous avons **38666.6 CEIP/ml** d'enzyme pure.

D'après nos résultats l'activité enzymatique de l'échantillon 1 est de 34333.3 CEIP/ml légèrement plus basse par rapport l'activité enzymatique de l'échantillon 2 qui est de 38666.6 CEIP/ml. Les deux flacons datent d'une année, et sont issus du même lot, seulement le premier flacon a été utilisé plusieurs fois, alors que le 2ème flacon n'a pas été ouvert. Il était donc bien conservé. Ces deux activités peuvent être tout simplement deux mesures différentes à causes des erreurs engendrés par la solubilité de l'amidon, des dilutions…. Cependant nous considérant que l'écart n'est pas très important vu que les vitesses maximales obtenues pour l'enzyme diluée au 1/1000 sont très proches. En conclusion, la vitesse de notre alpha-amylase est donc de **36500 CEIP/ml,** qui constitue la moyenne des deux mesures.

Sur l'étiquette des caractéristiques de l'enzyme offerte par SAIDAL, le fournisseur annonce une activité de 3,7 à 4,1. $10^6$ unités CEIP /100 ml ce qui correspond à 37000 à 41000 CEIP/ml. L'activité enzymatique de notre alpha-amylase mesurée dans les conditions optimales (pH6 et T°=55°C) est située à la limite minimale de cet intervalle, car elle a légèrement diminué durant la conservation.

Notre activité reste aussi inférieure à celle trouvée par **Khelil chorfi et Sadfi, 2021** (44333,33CEIP/ml), Et **Boumenir et Azzouzi, 2019** (44000CEIP /ml). Ce même lot avait une activité de **44333.33 CEIP/ml** selon les mesures de **Reghmit et Boughazi, 2023.** Nous avons donc une diminution de l'activité enzymatique durant une année de conservation.

En conclusion, le test de l'activité alpha-amylase adopté depuis 2016 permet d'estimer correctement l'activité de cette enzyme, car il converge avec les mesures du fournisseur de cette enzyme et permet de détecter toute diminution de l'activité pour les anciens lots. La seule précaution à prendre en considération c'est la solubilité de l'amidon.

### II.2. Caractérisation de la Glucoamylase :

Pour que la Glucoamylase soit efficace, son substrat doit être pré-hydrolysé par l'alpha-amylase. Pour cela, un pré-traitement de l'amidon doit être réalisé jusqu'à l'équilibre de la concentration.

#### II.2.1. Optimisation des paramètres physico-chimiques :

**1/ Préparation de l'amidon liquéfié :**

Le pH et la température ont été optimisés pour une concentration en amidon de 10 g/L. Pour cela une liquéfaction de cette solution a été réalisée dans les mêmes conditions que celles fixées pour la courbe de saturation et pour une durée de temps de 30 min : durée suffisante pour atteindre l'équilibre de la concentration **(Cf. Figure II-5)**. Un dosage des concentrations initiales et finales a été réalisé afin de quantifier la quantité d'amidon liquéfié. Pour toutes les séries préparées (pour les essais préliminaires, optimisation du pH et la température) la liquéfaction a été réalisée avec un rendement situé dans une moyenne de 83%. La **Figure II-9** atteste l'efficacité de la liquéfaction.

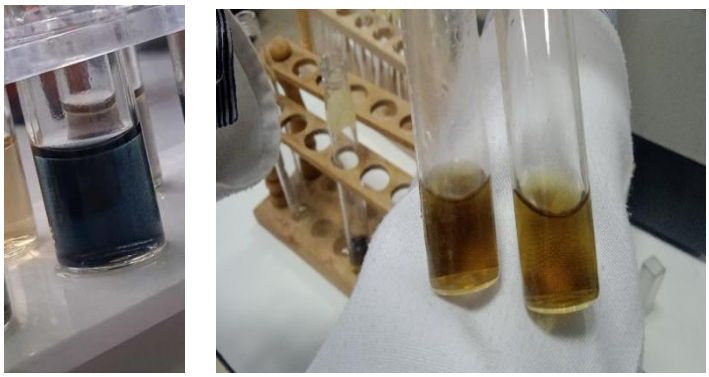


**Figure II-9 :** Concentrations initiale (C0) et finale (Cf à l'équilibre) après ajout de l'iodine 0,001N.

La solution d'amidon liquéfié est divisée en aliquotes de 100ml. Ces derniers sont congelés pour servir à l'optimisation de l'activité Glucoamylase. Afin de quantifier la quantité de glucose libéré par la glucoamylase une courbe d'étalonnage a été réalisée selon le protocole décrit en **annexe 2.**

**2/ Essai Préliminaire :**

**Méthode :**

Nous avons préparé une solution enzymatique de glucoamylase à 1g/L (0.1 dans 100ml). 2ml ont été prélevés de cette solution et ajoutés à 100ml de la solution d'amidon liquéfié à 10g/L. La saccharification a été réalisée à pH=6 et T=55°C. Une remarque très importante qu'il faut signaler c'est l'insolubilité de l'enzyme. C'est la raison pour laquelle il nous a été difficile d'être précis dans la quantité prélevée de l'enzyme à partir de ***la suspension*** préparée.

**Résultat :**

Nous avons obtenu un faible rendement de saccharification (14 %) (**Figure II-10).** Ceci est due soit à l'insolubilité de l'enzyme dans la solution préparée ou bien à une quantité insuffisante de l'enzyme. Par conséquent, nous avons essayé d'augmenter la quantité d'enzyme à 0,01 g et de l'ajouter directement dans le milieu réactionnel. Cela a permis d'obtenir un rendement de saccharification de 57 %. **(Figure II-11)**

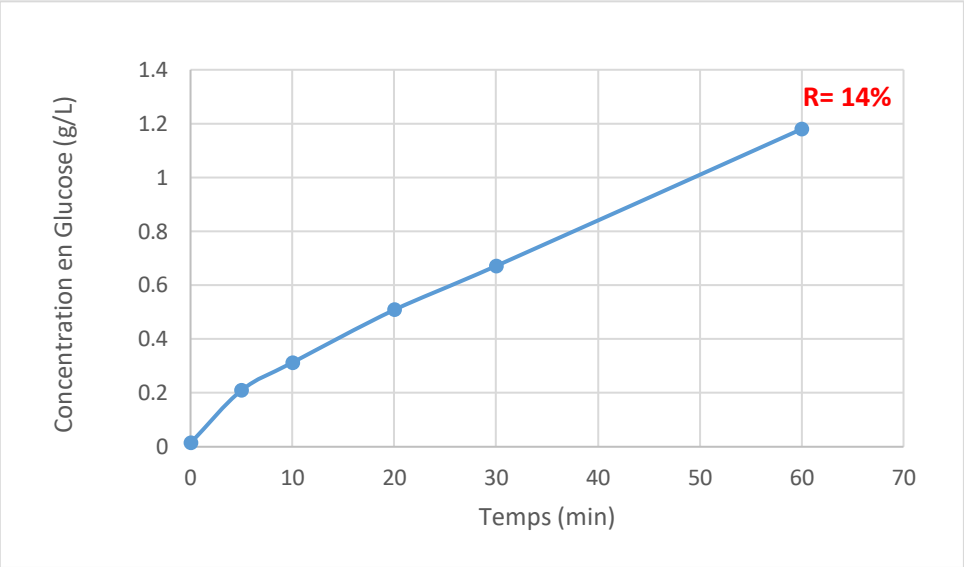



**Figure II-10 :** Courbe de saccharification de l'amidon liquéfié à 10g/L par la glucoamylase (2ml de à 1g/L dans 100ml).

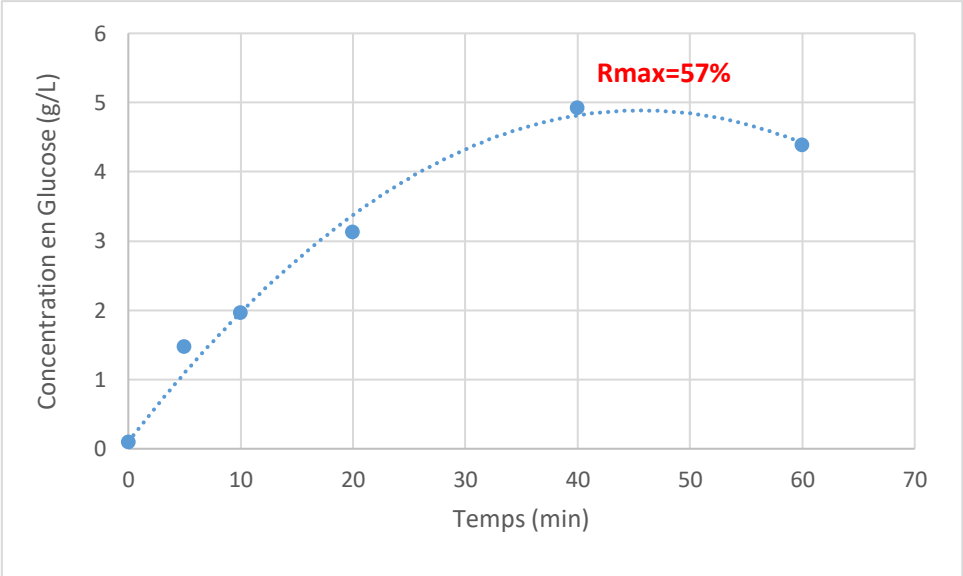



**Figure II-11 :** Courbe de saccharification de l'amidon liquéfié à 10g/L par la glucoamylase à 0.01g/100ml.

### 3/ Optimisation du pH :

**Méthode :**

Le pH des aliquotes d'amidon liquéfiés (C=10g/L, V=100ml) est ajusté avec un HCl ou Na OH (1N) dans un intervalle allant de 3 à 8 afin d'étudier l'effet du pH sur l'activité enzymatique de la glucoamylase.

**Résultats :**

L'étude de l'influence du pH sur l'activité enzymatique de la glucoamylase nous a donné les résultats représentés sur la **Figure II-12** (cinétiques aux différents pH) et **Figure II-13** (rendement à l'équilibre pour les différents pH). D'une façon générale, plus l'activité est importante plus la concentration du glucose à l'équilibre est grande. Une concentration maximale (7g/L) est enregistrée pour le pH 5. Des concentrations minimales de 0,9 g/L et 1,75 g/L sont enregistrées aux pH extrêmes-basique (pH8) et acide (pH3) respectivement (**Figure II-12**). Nous déduisons que l'activité enzymatique est optimale à pH 5, faible à pH 3 et presque nulle à pH8. La **Figure II-13** présente une courbe en forme de cloche qui met en évidence un pH optimal de 5 correspondants à un rendement maximal de 84 %. Dans un intervalle de pH allant de 3 à 5, l'activité progresse proportionnellement à la variation du pH. Au-delà de cette valeur, l'activité commence à diminuer et devient presque nulle à pH 8, avec un rendement faible de 10,5 %.

Nos résultats sont en parfaite concordance ou très proches avec les données de :

- ✓ **Ganghofner, et al, 1998 :** Glucoamylase de ***Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*****,** pH optimal est situé entre 4.5 et 5 ;
- ✓ **Jeffrey wilson et Michael Ingledew, 1982** : Glucoamylase de ***Schwanniomyces alluvius***, pH optimal =5 ;
- ✓ **SILVA et al, 2010 :** Glucoamylase de ***Aspergillus niger*** et ***Streptomyces sp***, pH optimal =4,5 ;
- ✓ **Benassi, 2013** : Glucoamylase ***d'Aspergillus phoenicis*****,** pH optimal =4,5-5
- ✓ **Keera et al, 2014 :** Glucoamylase de ***Aspergillus oryzae FK-923***, pH optimal= 5.5 ;
- ✓ **Natalia et al, 2002 :** Glucoamylase de ***Bacillus acidocaldarius***, pH optimal= 4,5.

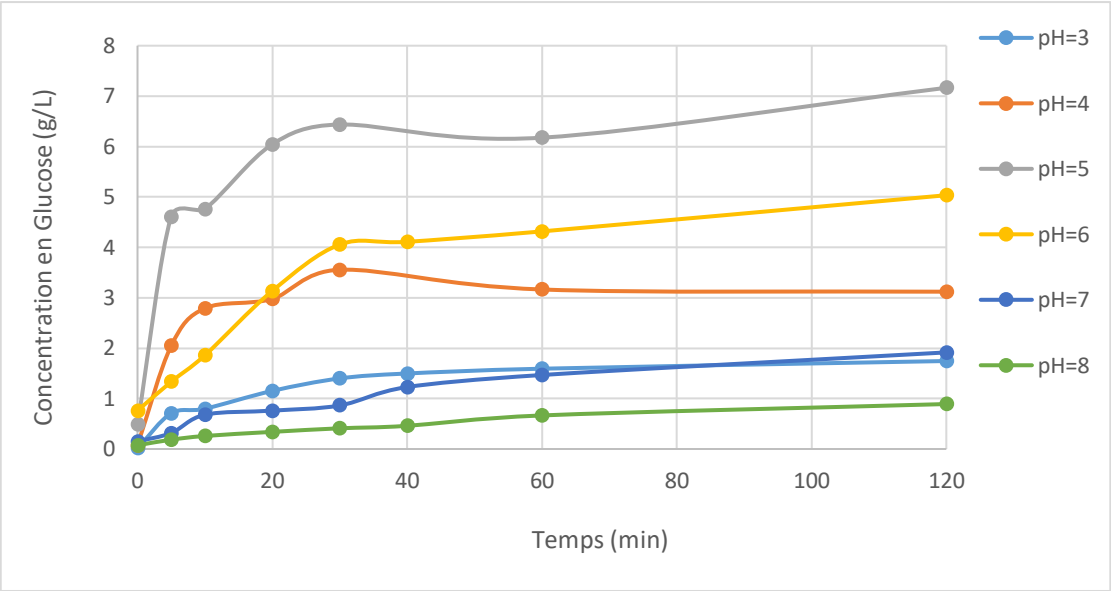



**Figure II-12 :** Effet du pH sur l'activité glucoamylase : Cinétiques aux différents pH.

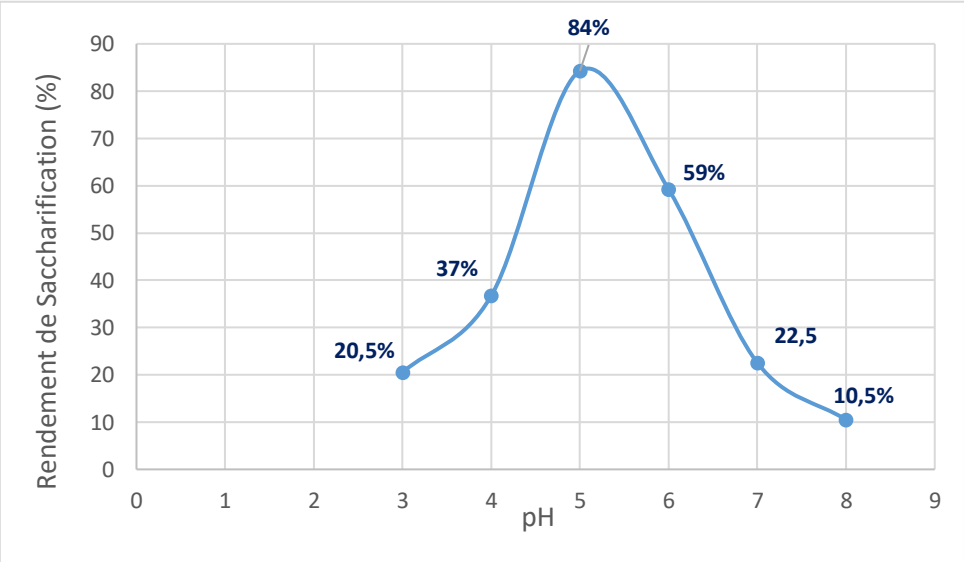



**Figure II-13 :** Rendements de la saccharification aux différents pH.

**4/ Optimisation de la température :**

**Méthode :**

Il faut rappeler que ce paramètre a été testé en fixant le pH à son optimum (pH 5) et en variant la température à chaque fois allant un intervalle de 20 à 90°C. Les résultats obtenus sont représentés sur la **Figure II-14** et **II-15.**

**Résultats :**

D'après les **Figures II-14** et **II-15**, on observe que l'activité enzymatique de la glucoamylase augmente avec la température jusqu'à une température d'environ 65°C, atteignant un rendement maximal de 93%. Au-delà de cette température optimale, l'activité enzymatique diminue graduellement pour devenir presque nulle à 90°C, avec un rendement final de seulement 2% où la glucoamylase est dénaturée. La température optimale est donc située entre 60 et 65°C.

Nos résultats sont en parfaite concordance avec :

- ✓ **Koç et Metin, 2010** : Glucoamylase de ***Aspergillus flavus HBF34***, température optimale=60°C.
- ✓ **SILVA et al, 2010 :** Glucoamylase de ***Aspergillus niger and Streptomyces sp***, température optimale=60°C.
- ✓ **Benassi, 2013** : Glucoamylase ***d'Aspergillus phoenicis*****,** température optimale = 60°C-65°C.
- ✓ **Natalia et al, 2002 :** Glucoamylase de ***Bacillus acidocaldarius***, température optimale = 65°C.

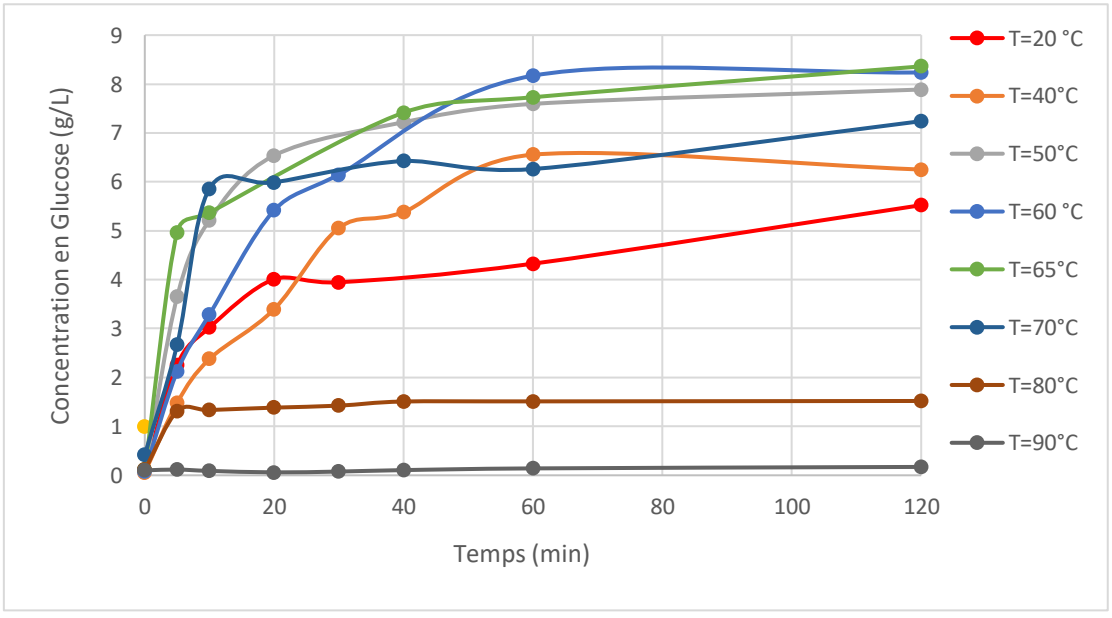



**Figure II-14 :** Effet de la température sur l'activité glucoamylase : cinétiques aux différentes températures.

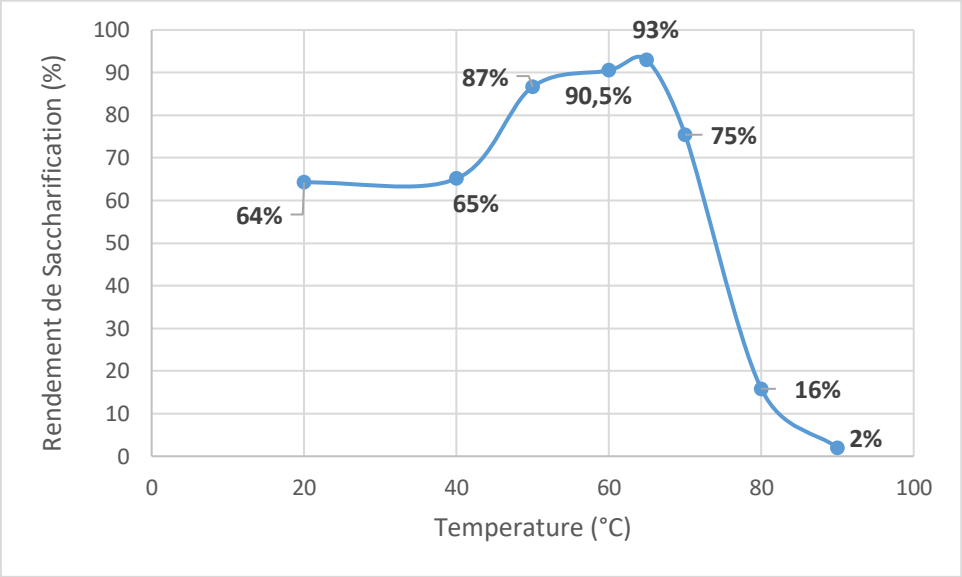



**Figure II-15 :** Rendements de de la saccharification aux différentes températures.

### II.2.2. Courbes de saturation : Effet de la concentration du substrat sur l'activité Glucoamylase :

#### 1/Préparation de l'amidon liquéfié :

Pour établir la courbe de saturation, nous avons augmenté la concentration de l'amidon hydrolysé. Pour cela, nous avons préparé deux séries d'amidon allant de 5g/L jusqu'au 30 g/L (100ml pour chaque concentration). Afin d'assurer une bonne liquéfaction de ces solutions d'amidon dans les conditions optimales (T=55°C, pH=6), il faut augmenter la quantité d'alpha-amylase avec l'augmentation de sa concentration : il faut donc travailler au rapport E/S optimal (30CEIP/g d'amidon) selon **Abdesselam et Bennia, 2016**.

A partir de la solution mère de la glucoamylase **34333.3 CEIP/ml,** nous avons réalisé une dilution de **1/1000**. La dilution obtenue est de **34,33 CEIP/mL**. Par conséquent, nous calculons les volumes d'alpha-amylase à mettre dans 100ml de ces solutions d'amidon :

- Pour 5g/L, il nous faut 15CEIP/100ml→ 0.4ml
- Pour 10g/L, il nous faut 30CEIP/100ml → 0.8ml
- Pour 15g/L, il nous faut 45CEIP/100ml →1.3ml

- Pour 20g/L, il nous faut 60CEIP/100ml→1.7ml
- Pour 25g/L, il nous faut 75CEIP/10ml→2.2ml
- Pour 30g/L, il nous faut 90CEIP/100ml →2.6ml

Dans le but de fixer le temps d'établissement de l'équilibre à un rapport E/S optimal, un essai préliminaire a été réalisé pour deux concentrations en amidon :

- Une concentration basse (=5g/l)
- Une concentration plus importante (=20g/L)

**La Figure II-16** montre que la concentration d'amidon diminue au cours du temps pour les deux concentrations initiales jusqu'à établissement de l'équilibre entre 30min et 1h, donnant des rendements de 80% pour une concentration de 20g/L, par contre pour une faible concentration de 5g/L le rendement est de 90%.

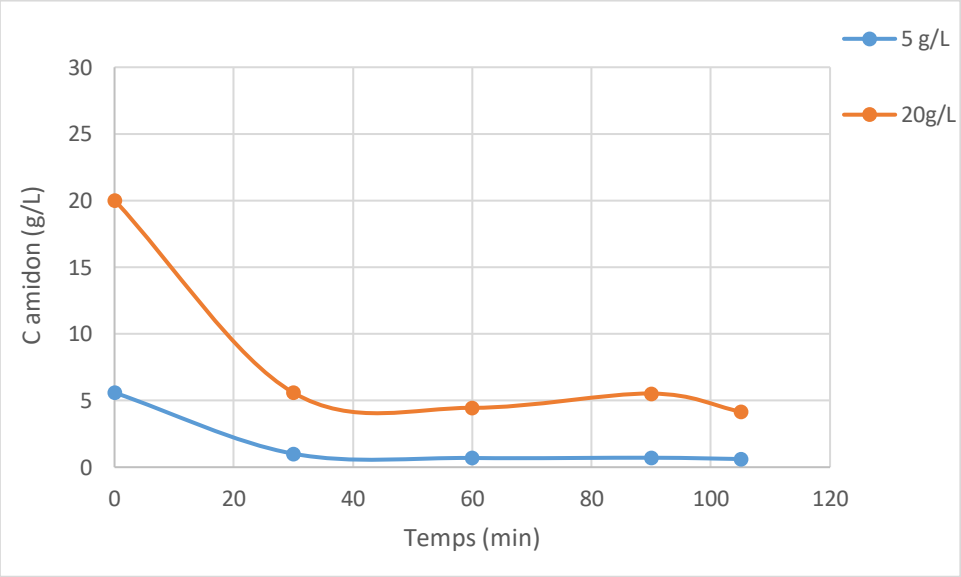



**Figure II-16 :** Cinétique d'hydrolyse de l'amidon par l'alpha-amylase au rapport E/S optimal

**En conclusion :** Nous pouvons préparer notre série d'amidon hydrolysé à différentes concentrations en respectant le rapport E/S optimal avec un temps d'hydrolyse dépassant 30min (donc à partir de 1H). Dans ce cas, il suffit de prendre les concentrations initiales et finales afin d'établir les taux de conversion de l'amidon ou les rendements d'hydrolyse.

**2/ Saccharification**

Les deux séries d'amidon liquéfié (rendement situé entre 80% et 90%) ont subi une saccharification à pH optimal (pH=5), à la température optimale (entre 60 et 65)°C, en ajoutant 0,01g de glucoamylase par 100ml. Des prélèvements de 0,5ml ont été effectués aux temps suivants : t0, 5min, 10min, 20min, 30min, 40min, 60min, 120min, 180min. Des dosages du glucose libéré ont été effectués en utilisant le kit de dosage enzymatique selon la méthode décrite dans l'**annexe 2**.

**Résultat :**

Sur la **Figure II-17**, nous présentons la cinétique de saccharification menée par la glucoamylase à différentes concentrations en amidon liquéfié. La courbe de saturation ainsi que les deux linéarisations (Lineweaver burk et Eadie Hofstee) sont représentées sur les **Figures II-18**, **II-19** et **II-20** respectivement. Ces courbes sont tracées à partir de la moyenne des résultats obtenus pour les deux séries.

La glucoamylase est une enzyme essentielle qui complète le travail de l'α-amylase en brisant les dextrines, sucres complexes issus de la liquéfaction, en sucres simples comme le glucose, facilement assimilables par les levures lors de la fermentation.

Nos résultats représentés sur la **Figure II-17** montrent une libération importante de glucose pour toutes les concentrations initiales testées (5g/L, 10g/L, 20g/L, 25g/L et 30g/L). La concentration en glucose est maximale à partir de 2 heures et elle varie entre 4g/L (pour une concentration en amidon liquéfié de 5g/L) et 28g/L (pour une concentration en amidon liquéfié de 30g/L).

La **Figure II-18** montre que la vitesse de la réaction (qui correspond à la pente de la partie linéaire) augmente avec la concentration en amidon liquéfie, jusqu'à un maximum (saturation de l'enzyme). Ce comportement correspond au modèle cinétique de Michaelis-Menten selon l'équation :

$$Vi = \frac{V\ \max[s]}{Km + [s]}$$

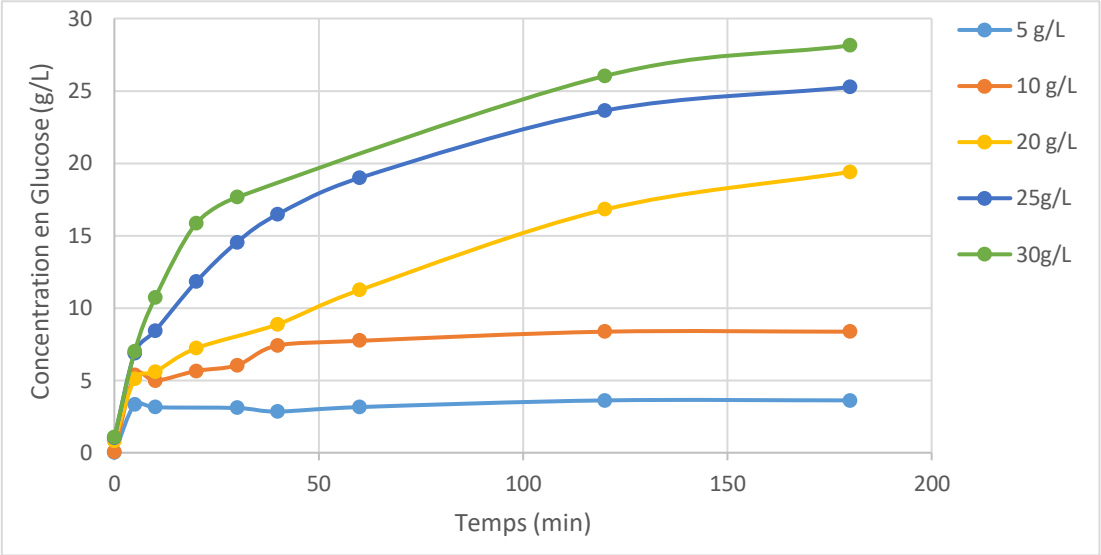



**Figure II-17 :** Cinétiques de saccharification des différentes concentrations d'amidon liquéfié par la glucoamylase.

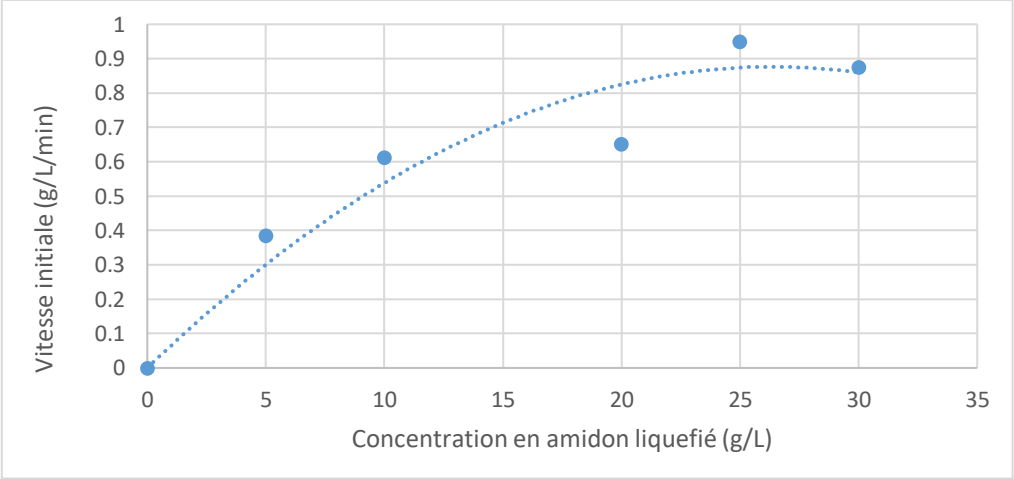



**Figure II-18 :** Courbe de saturation : Évolution la vitesse initiale (Vi) de la glucoamylase en fonction de la concentration initiale en amidon liquéfié.

A partir de la courbe de saturation de Michaelis-Menten, nous pouvons déterminer les constantes Km et Vmax. La vitesse maximale obtenue expérimentalement d'après la **Figure II-18** est située entre 0.87g/L/min et 0,94g/L/min (soit une moyenne de 0,90 g/L/min) avec un Km aux environ de 8 g/L, ce qui correspond à une affinité 1/Km de 0,125 L/g.

La courbe de saturation étant non linéaire, il est difficile d'évaluer précisément les valeurs de Km et Vmax. Pour cela, nous avons essayé d'appliquer la linéarisation de Lineweaver-burk (**Figure II-19**) selon l'équation :

$$\frac{1}{Vi} = \frac{Km}{V\,\max}\frac{1}{[s]} + \frac{1}{V\,\max}$$

et la linéarisation d'Eadie Hofstee (**Figure II-10**), selon l'équation :

$$Vi = V\,\max - Km\frac{Vi}{[s]}$$

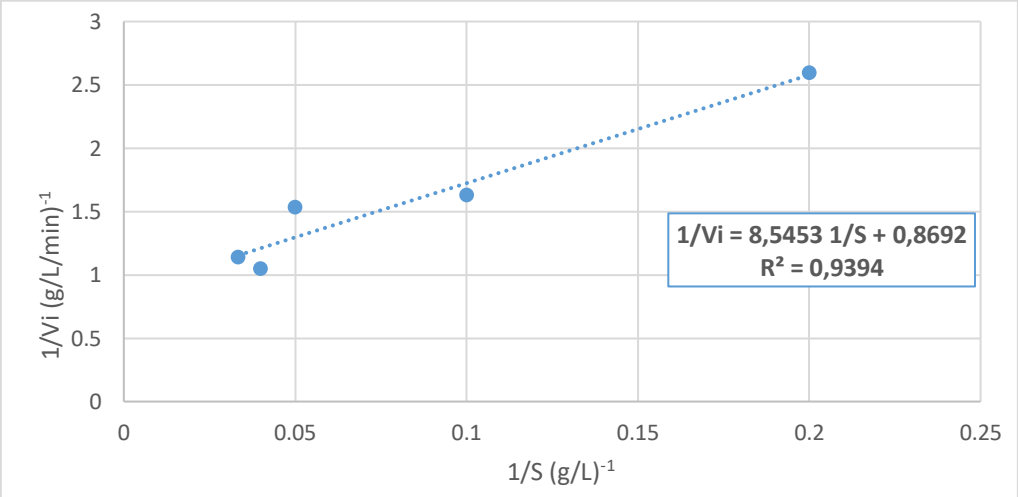



**Figure II-19 :** Linéarisation de Lineweaver-burk de la glucoamylase.

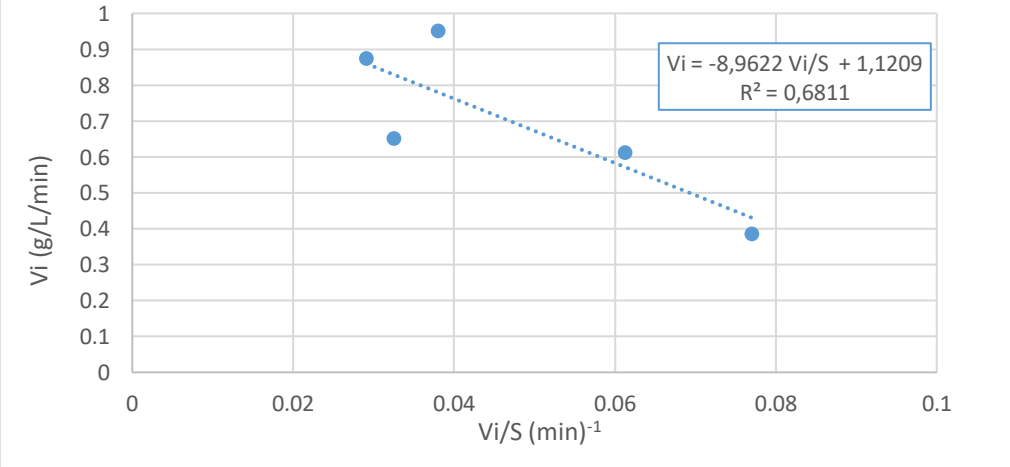



**Figure II-20 :** Linéarisation d'Eadie Hofstee de la glucoamylase.

D'après les équations des deux linéarisations, nous pouvons déterminer les constantes cinétiques avec précision et qui sont représentés sur le **Tableau II-2**.

**Tableau II-2 :** Constantes cinétiques tirés à partir des linéarisations de Lineweaver-burk et Eadie Hofstee : Comparaison avec ceux tirés à partir de la courbe de saturation

| | Km(g/L) | Vmax (g/L/min) | L'affinité 1/Km (L/g) |
|---|---|---|---|
| Lineweaver-Burk | 9.9 | 1.16 | 0.10 |
| Eadie Hofstee | 8.96 | 1.12 | 0.11 |
| Courbe de saturation | 8 | 0.90 | 0,125 |

Les Km et les Vmax tirés à partir de la courbe de saturation et à partir des deux modèles convergent vers les mêmes grandeurs, ce qui indique que les deux modèles décrivent bien la cinétique de la saccharification par la glucoamylase. Nous adoptons donc une vitesse maximale de 1,16 g/L/min tirée à partir du modèle le plus appropriée : modèle de Lineweaver-Burk. Dans ce cas, le calcul de l'activité glucoamylase par unité de masse (1g) se fait comme suit :

Vmax (modèle de LB) ($R^2$ =0,93) est de 1,16 g/L/min ce qui correspond à 0,116g/100ml/min. et donc 0,116g /0,01g de glucoamylase/min. Nous avons donc 11,6g de glucose libéré /min/g de glucoamylase ce qui correspond à 0,06444 moles de glucose libéré /min/g de glucoamylase càd 64444 µmoles de glucose libéré /min/g de glucoamylase (64444UI/g).

### II.2.3. Optimisation du rapport E/S dans les conditions optimales :

Nous optimisons le rapport E/S en variant la quantité d'enzyme pour une concentration saturante en amidon liquéfié (30g/L) : l'objectif est de fixer un rapport

optimal qui permet d'aboutir à une saccharification satisfaisante dans un délai adéquat en utilisant une quantité adéquate d'enzyme (sans gaspillage).

**Méthode :**

La liquéfaction a été réalisée pour une solution d'amidon à 30g/L, à pH6 pour une température de 55ºC en utilisant un rapport E/S optimale (30 CEIP /g d'amidon) pour une durée de temps de 2h, durée suffisante pour atteindre l'équilibre de la concentration. Un dosage des concentrations initiales et finales a été réalisé afin de quantifier la quantité d'amidon liquéfié.

La solution d'amidon liquéfié (Rendement= 87%) est divisée en aliquotes de 100ml. Ces derniers sont congelés pour servir à l'optimisation du rapport E/S dans les conditions optimisées (pH=5, T=(60-65)°C) en introduisons des masses variables de glucoamylase allant de 0,005g/100ml (0,05g/L) à 0,025 g/100ml (0,25g /L) ce qui correspond à un rapport E/S allant de 0,0017 g de glucoamylase/g d'amidon à 0,0083 g de glucoamylase/g d'amidon. La cinétique de libération du glucose a été suivie en réalisant des prélèvements de 0,5ml aux temps suivants : t0, 5min, 10min, 20min, 30min, 40min, 60min, 120min, 180min. Des dosages du glucose libéré ont été effectués en utilisant le kit de dosage enzymatique selon la méthode décrite dans l'**annexe 2**.

**Résultats et discussion :**

Nous observons d'après la **Figure II-21** que la vitesse de saccharification augmente avec la concentration de glucoamylase. Cela est dû au fait qu'une concentration plus élevée d'enzyme signifie qu'il y a plus de molécules d'enzyme disponibles pour catalyser la réaction de saccharification. La vitesse de saccharification atteint un maximum à une concentration de glucoamylase de 0,2 g/L (0.0067g/g). Au-delà de ce point, la concentration du glucose n'augmente pas avec l'augmentation de la concentration de la glucoamylase. Un rapport de 0,0067 g de glucoamylase /g d'amidon liquéfié est donc optimal ce qui correspond à 430 UI/g d'amidon liquéfié.

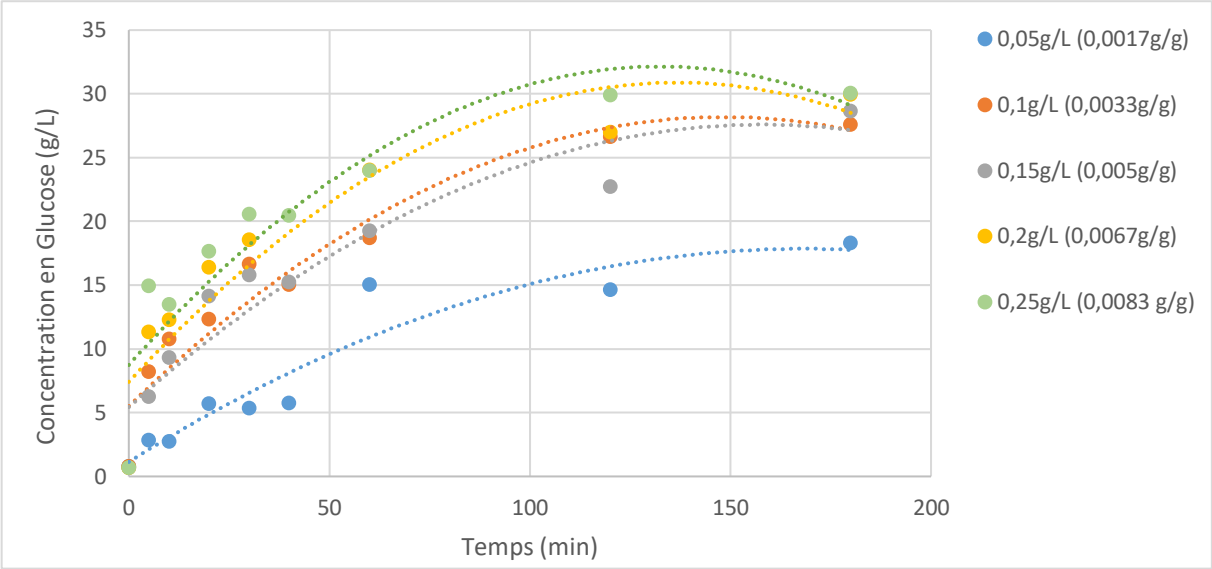



**Figure II-21 :** Cinétique de saccharification d'amidon liquéfié à 30g/L par la glucoamylase (aux différentes concentrations)

## II.3. Traitement enzymatique des épluchures de pommes de terre en vue de la production de bioéthanol :

Dans cette partie, nous allons appliquer les enzymes étudiées dans le traitement d'un déchet organique très abondant, puisqu'il est lié à un aliment d'une grande consommation : les épluchures de pommes de terre.

### II.3.1. Caractérisation d'épluchure de pomme de terre :

L'objectif de cette étape est la détermination des pourcentages relatifs à l'eau et à l'amidon dans les épluchures de la pomme de terre fraiche.

**Méthode :**

Les épluchures de pomme de terre collectées à partir des restaurants sont tout d'abord nettoyées à l'eau pour éliminer toutes les impuretés, égouttées puis séchées avec du papier absorbant.

Pour déterminer la quantité d'eau dans ces épluchures :

- découper 100g en lamelle fines puis sécher à **105°C** jusqu'à poids constant.
- le pourcentage d'eau est calculé selon l'équation suivante :

**T eau (%) = [(PF – PS) / PF] ×100 …… (1)**

Où :

**T eau (%)** : Teneur en eau, en pourcentage.

**PF** : Poids des épluchures de pomme de terre fraiches (avant séchage) en g (100g).

**PS** : Poids sec des épluchures de pomme de terre (après séchage) en g.

Pour déterminer la quantité d'amidon :

- broyer **100g** d'épluchure de pomme de terre avec une quantité d'eau.
- filtrer le broyat et reprendre le retentât dans un peu d'eau, re-broyer et refiltrer,
- collecter les filtrats, laisser l'amidon décanter ; enlever l'eau et sécher l'amidon à **105°**C jusqu'à poids constant (PS amidon).
- sécher le retentât à **105ºC** jusqu'à poids constant. Cette masse correspond aux résidus cellulosiques (fibres cellulosiques) insolubles dans l'eau (PS retentât).
- les pourcentages relatifs à l'amidon et aux résidus sont calculés comme suit :

**T amidon (%) = [(PS amidon) / PF] ×100 ……. (2)**

**T résidus (%) = [(PS retentât) / PF] ×100 ……..…… (3)**

**Résultats et Discussion :**

La teneur en eau des épluchures de pommes terres calculée selon l'équation (1) est de 85%. Selon l'équation (2) 6% représente l'amidon. La quantité des fibres est estimée de 9% selon l'équation (3) **(Figure II-22)**. Il faut dire qu'un pourcentage en amidon de 6% se répète beaucoup lorsqu'on travaille sur des échantillons moyens prélevés sur au moins trois sources. Ce pourcentage a été trouvé par **Cherifi et Benaissa, 2020 ; Khelil cherfi et Sadfi, 2021**. Cependant, il faut signaler que ce pourcentage peut aller jusqu'aux environs de 8-9% (**Figure II-23 B**), résultat similaire à celui trouvé par **Boumenir et Azzouzi, 2019** (8,5%). Il peut aussi être inférieur à 6% (aux environ de 4%) (**Figure II-23 A**).

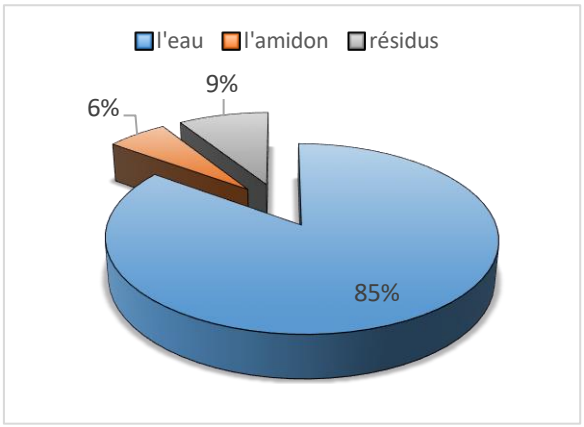
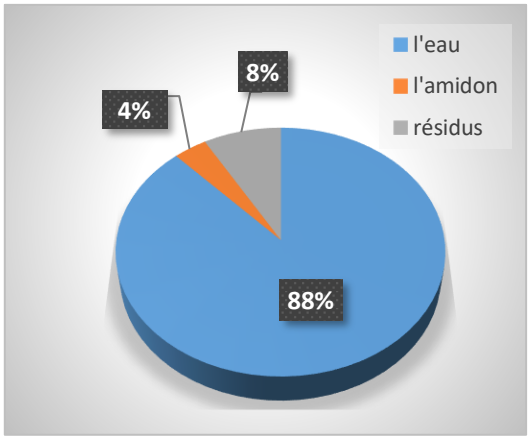
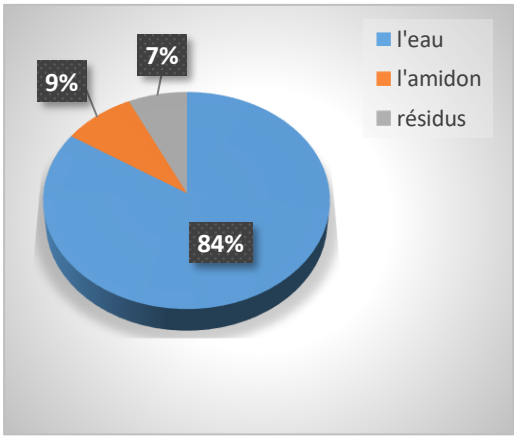



**Figure II-22 :** Composition moyenne des épluchures de pomme de terre.




**A : Limite minimale** **B : Limite maximale**

**Figure II-23 :** Limites de la Composition des épluchures de pomme de terre.

**En conclusion :** Afin de traiter un déchet de composition variable, la conduite à tenir pour évaluer la quantité d'enzymes à utiliser est :

**1/** Soit déterminer la composition en amidon pour chaque lot, avant de le traiter,

**2/** Soit tenir en considération la composition moyenne, et prolonger (en cas de nécessité) le temps du traitement enzymatique et se contenter des rendements d'hydrolyse obtenus, car nous pouvons tomber sur un échantillon supérieur à la moyenne.

**3/** Soit tenir en considération la composition maximale. Dans ce cas, nous travaillons avec des quantités suffisantes en enzymes quelques soit la composition du lot.

### II.3.2. Etapes de Prétraitement des épluchures de pomme de terre :

**1/Travaux antérieurs :**

Selon des travaux antérieurs, l'application de la catalyse enzymatique directement sur l'amidon non soluble pose des problèmes, car le substrat est inaccessible aux alpha amylases :

Selon **Absesslam et Bennia, 2016** la liquéfaction totale d'une solution d'amidon soluble à 30g/L s'effectue en 2h dans les conditions optimales : pH op=6, T°op=55°C, un rapport E/S≈ 30 CEIP/g d'amidon. Cependant, une liquéfaction totale d'une solution d'amidon non soluble (de maïs et de riz) à 30g/L n'a pas été obtenue qu'après trois cycles de « dispersion- liquéfaction ». Il faut rappeler que la dispersion est un traitement thermique à 130°C sous pression pendant 1h. Cette méthode a été utilisée pour solubiliser l'amidon lors des tests de l'activité alpha-amylase.

Selon **Boumenir et Azzouzi, 2019** l'essai de liquéfaction sur la pomme de terre fraiche broyée montre que son amidon à 30g/L résiste à l'hydrolyse enzymatique dans les conditions optimales (pH op=6, T°op=55°C, un rapport E/S≈ 30 CEIP/g d'amidon) à cause de son insolubilité. Le résultat est identique même en augmentant le rapport E/S jusqu'à 6000 CEIP/g d'amidon. Ces auteurs ont cédé au traitement thermique de l'amidon. La dispersion à 130°C avait un effet nettement positif sur la qualité de la liquéfaction. L'amidon est totalement hydrolysé au bout de 1H30min à 2H, dans les conditions optimales à un rapport E/S= 250CEIP/ g d'amidon quel que soit sa charge dans le milieu d'hydrolyse. L'optimisation du traitement thermique a montré que les faibles températures (100°C) sont adéquates aux faibles charges (15g/L) alors que les fortes températures (130°C) sont efficaces pour les grandes charges (60g/L).

Enfin, **Khelil cherfi et Sadfi, 2021** ont réussi à réduire le temps du traitement thermique à 15min : l'amidon est totalement hydrolysé par la BAN-alpha-amylase au bout de 1H30min à 2H, dans les conditions optimales suivantes à un rapport E/S= 300CEIP/ g d'amidon quel que soit sa charge dans le milieu d'hydrolyse (**30g/l, 60g/1, 120 g/L)** ce qui correspond à **(500, 1Kg, 2Kg MF/L)**.

En conclusion, nous adoptons dans notre travail les conditions déjà optimisés par ces travaux antérieurs :

-le traitement physique consiste à **une cuisson sous pression** pendant **15min**, suivie d'un **broyage** dans un tampon pH=6.

- la liquéfaction s'effectue à **pH=6**, à **55°C, pour un rapport alpha-amylase /amidon=300CEIP / g d'amidon.**

**2/ Objectif visé :**

Il faut dire que tous ces travaux ont abordé l'optimisation de la saccharification en fixant un rapport massique optimal (Glucoamylase/amidon). La quantité de glucoamylase qui permet d'aboutir à un rendement de saccharification appréciable à partir d'un amidon liquéfié de pomme de terre est importante par rapport à la quantité utilisée lors de la saccharification des amidons pures et solubles : Selon **Absesslam et Bennia, 2016** un rendement maximal de saccharification a été obtenu à partir d'une solution d'amidon à 30g/L liquéfiée et saccharifiée pendant 5h en utilisant un rapport (Glucoamylase/amidon) de 21,3mg/g, alors que **Khelil Cherfi et Sadfi, 2021** ; **Reghmite et boughazi, 2023** ont signalés des rapports beaucoup plus importants (830 mg/g et 1,16 g/g respectivement) pour l'amidon de pomme de terre traité thermiquement et liquéfié.

Le rapport massique (Glucoamylase /amidon de pomme de terre) a augmenté de 2021 (**Khelil Cherfi et Sadfi, 2021)** à 2023 (**Reghmite et boughazi, 2023)** et pourtant, l'amidon de pomme de terre a été traité thermiquement et liquéfié dans les mêmes conditions puis saccharifié avec le même lot de glucoamylase. Ceci est due à la diminution de l'activité spécifique de la glucoamylase avec la conservation.

L'objectif actuel de cette partie consiste à optimiser la saccharification des épluchures traitées thermiquement, broyées et liquéfiés en exprimant le rapport (Glucoamylase /amidon de pomme de terre) en UI/g d'amidon liquéfié. Ceci permet de mesurer la quantité qu'il faut de l'enzyme même si son activité spécifique diminue avec le la conservation : il suffit seulement de d'augmenter les masses avec la

diminution de l'activité spécifique. Ceci permet aussi de quantifier correctement la quantité des enzymes saccharifiantes quel que soit son origine (biologique et commerciale) et quelques soient ces conditions physicochimiques de la catalyse. Il suffit seulement d'évaluer l'activité Glucoamylase dans les conditions optimales par unité de masse et calculer la masse équivalente au rapport optimal en UI/g.

### II.3.3. Optimisation du rapport E/S de la glucoamylase :

**1/ Prétraitement physique et Liquéfaction :**

Les épluchures de pomme de terre collectées à partir des restaurants sont tout d'abord nettoyées à l'eau pour éliminer toutes les impuretés, égouttées puis séchées avec du papier absorbant. Pour préparer six suspensions de 100ml à 50 g de matière fraiche, il faut cuire, sous pression (à 130°C dans une cocotte-minute pendant 15min), une quantité de 50g × 6 càd 300g d'épluchures fraîches dans un volume suffisant d'eau. Filtrer les épluchures cuites. Diviser la masse obtenue par 6 et broyer chaque masse dans 100ml de tampon pH6 et transférer le broyât dans un erlenmeyer.

La liquéfaction suit le protocole suivant :

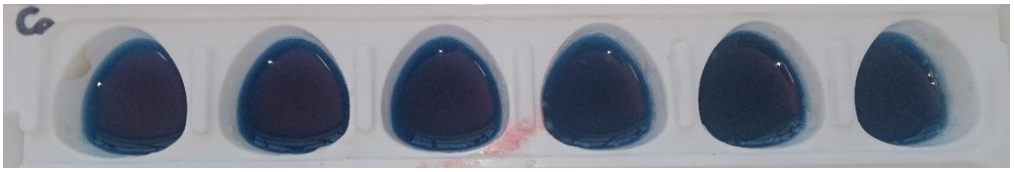
- Incuber les suspensions préparées à 55°C pendant 5 min dans un bain marie sous agitation afin de stabiliser la température à l'intérieur du milieu réactionnel.
- Commencer l'hydrolyse en ajoutant à chaque erlenmeyer 1,3ml d'alpha-amylase diluée (1/50) ce qui permet de réaliser cette hydrolyse à un rapport optimal 300CEIP/g d'amidon (18CEIP/g MF) en tenant en considération une composition moyenne de 6% en amidon.et une activité alpha amylase de 34300 CEIP/ml pur.
- Prélever 1ml du milieu réactionnel à t0, 1h et 2h. Ajouter 2ml de HCl (0.2N) pour arrêter la réaction puis 2 ml d'iodine (0,001N) afin de tester l'hydrolyse de l'amidon.

En parallèle, 100g (3 répétitions) d'épluchures prise à partir du même lot est broyée, filtrée afin de sécher l'amidon décanté et déterminer la charge réelle de ce lot.

**Résultat *:***

La **Figure II-24** illustre la révélation de l'amidon à l'iodine aux t0 et 2h

**T0**



**T=2h**

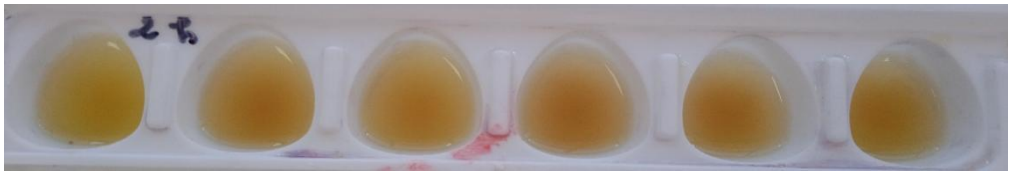


**Figure II-24 :** Révélation de l'amidon à l'iodine au cours de la liquéfaction.

Il faut signaler que l'hydrolyse était déjà terminée à 1H (apparition de la couleur jaune), ce qui nous laisse penser que ce lot contient une quantité d'amidon inférieur à 6%. Cette hypothèse est confirmée après séchage de la masse d'amidon contenue dans 100g de matière fraiche et qui était 3,05 g càd 3%. La concentration de l'amidon dans chaque suspension de 100ml contenant 50g de matière fraiche était de 15 g/L (1,5 g/100ml).

**2/ Saccharification :**

Des quantités de glucoamylase ont été ajoutées aux suspensions après rectification du pH à 5 et stabilisation de la température à (60-65) °C : 0,02 g/100ml (0,2 g/L), 0,2 g/100ml (2 g/L), 0,7 g/100ml (7 g/L), 1 g/100ml (10 g/L), 2 g/100ml (20 g/l) et 2,5 g/100ml (25 g/l). La saccharification a été réalisée au bain marie sous agitation à pH =5 à 60-65°C pour une durée de temps de 3H. Durant ce temps, des prélèvements ont été réalisés à des temps définis afin de doser le glucose libéré selon la méthode décrite en **Annexe 2**.

**Résultats :**

Selon le graphe de la **Figure II-25**, nous pouvons observer que pour toutes les concentrations de glucoamylase, la concentration de glucose augmente avec le temps jusqu'à atteinte d'un plateau. La concentration du glucose à l'équilibre dépend de la concentration de la glucoamylase : des teneurs de (10 g/L, 20 g/L, 25 g/L) conduisent

à des valeurs maximales de glucose plus élevées que celles obtenues avec des teneurs inférieures (0,2 g/L, 2 g/L, 7 g/L). Cependant, à partir de 7g/L, l'augmentation de la concentration de la glucoamylase n'aboutit pas à une amélioration significative de la concentration du glucose à l'équilibre.

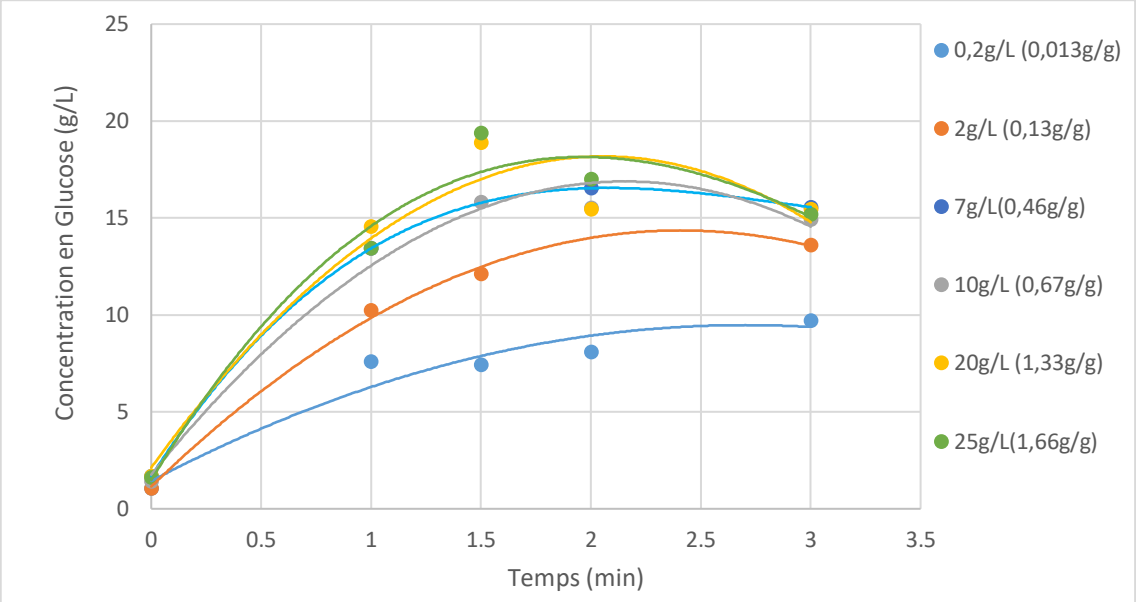



**Figure II-25 :** Cinétique de libération de glucose aux différentes concentrations de glucoamylase.

La **Figure II-26** que l'augmentation de la concentration de glucoamylase améliore le rendement de saccharification jusqu'à un plateau d'environ 91 % pour des concentrations comprises entre 7 g/L et 20 g/L. Une légère augmentation à 95 % est enregistrée à 25 g/L. Ceci indique que des augmentations supplémentaires de la concentration d'enzyme au-delà de 7g/L n'améliorent pas significativement le rendement. Ainsi, la concentration optimale choisie à des fins pratiques est de 10 g/L, (milieu du plateau), ce qui permet d'équilibrer l'efficacité et la rentabilité de l'utilisation de ces enzymes. ***En conclusion***, pour l'amidon des épluchures de pomme de terre, le rapport (Glucoamylase /amidon -liquéfié) est donc de 0,67 g/g, soit 43000 UI/g. Il est 100 fois plus élevé par comparaison au rapport trouvé pour l'amidon du laboratoire (0,0067g/g soit 430 UI/g).

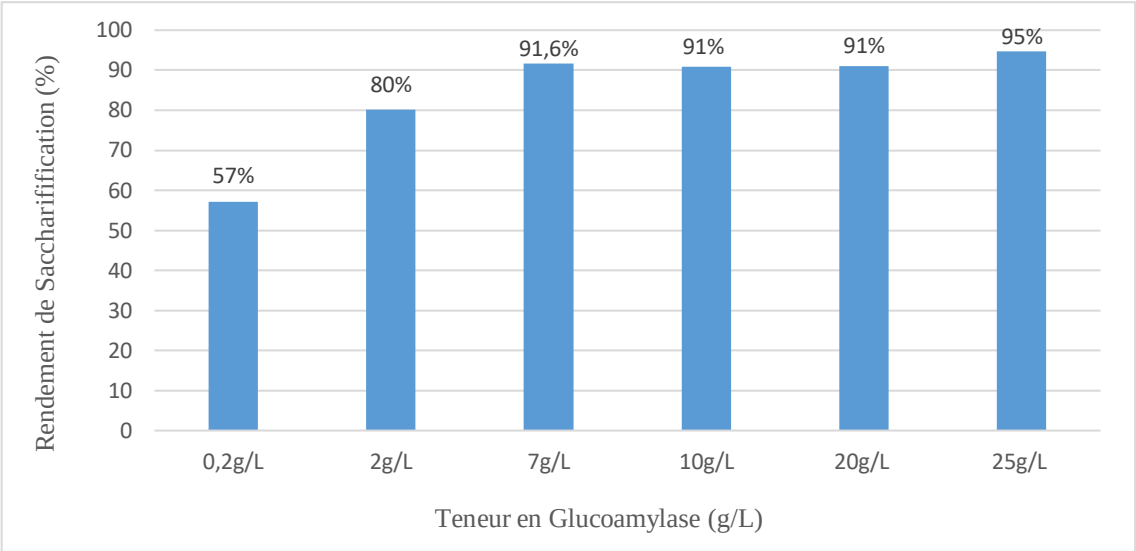



**Figure II-26 :** Rendement de saccharification avec des différents concentration de glucoamylase

### II.3.4. Application du rapport E/S en milieu concentré :

#### 1/ Prétraitement physique et Liquéfaction des épluchures de pommes de terre :

Dans ce cas, nous avons préparé 3 concentrations d'épluchures traités thermiquement :

- 2 suspensions de 100ml à **50g MF** ce qui correspond à **500g MF/L**,
- 2 suspensions de 100ml à **100g MF** ce qui correspond à **1Kg MF/L**
- 2 suspensions de 100ml à **200g MF** ce qui correspond à **2 Kg MF/L**

Les suspensions préparées sont incubées à 55°C pendant 5 min dans un bain marie sous agitation. Commencer l'hydrolyse en ajoutant aux suspensions **50gMF, 100g MF** et **200g MF** (V=100ml) 1,3ml ; 2,6ml ; 5,2ml d'alpha-amylase diluée (1/50) respectivement, ce qui permet de maintenir le même rapport optimal 300CEIP/g d'amidon (18CEIP/g MF) quel que soit la charge du milieu. Nous avons tenu en considération une composition moyenne de 6% en amidon.et une activité alpha amylase de 34300 CEIP/ml pur. Durant la liquéfaction, des prélèvements de 1ml ont étés réalisés aux t0, 1h et 2h. la révélation s'effectue avec 2 ml d'iodine (0,001N) après ajout du HCl (0.2N).

En parallèle, une masse de 100g (3 répétitions) d'épluchures prise à partir du même lot est broyée, filtrée afin de sécher l'amidon décanté et déterminer la charge réelle de ce lot.

**Résultats *:***

La **Figure II-27** Illustre la révélation de l'amidon à l'iodine aux t0, 1h et 2h pour les trois charges d'amidon.

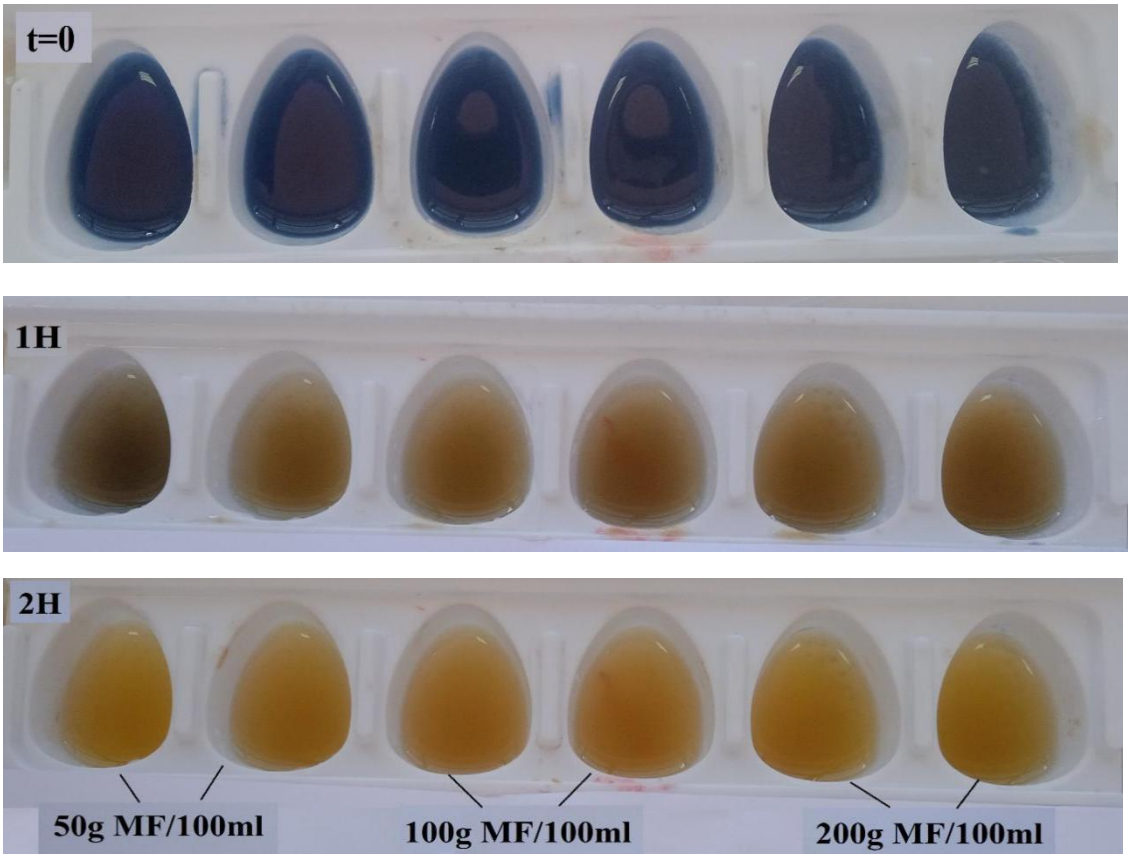



**Figure II-27 :** Révélation de l'amidon à l'iodine au cours de la liquéfaction.

Il faut signaler que l'hydrolyse s'est terminée à 2H (apparition de la couleur jaune), ce qui nous laisse penser que ce lot contient une quantité d'amidon plus importante que le lot précédant et peut être proche de 6%. Cette hypothèse est confirmée après séchage de la masse d'amidon contenue dans 100g de matière fraiche et qui était aux environs de 5,3%, càd 5,30 g/100g MF.

**2/ Saccharification :**

Des quantités de glucoamylase ont été ajoutées aux suspensions après rectification du pH à 5 et stabilisation de la température à (60-65) °C de telle sorte que le rapport E/S soit optimal **(E/S= 0,67g/g)** :

- 2 suspensions de 100ml à **50g MF liquéfiée (500g/L)**, à **2,65g amidon liquéfié (26,5g/L)** sont additionnée de **1,8 g de glucoamylase.**
- 2 suspensions de 100ml à **100g MF liquéfiée (1Kg/L)**, à **5,3g amidon liquéfié (53g/L)** sont additionnée de **3,6 g de glucoamylase.**
- 2 suspensions de 100ml à **200g MF liquéfiée (2Kg/L)**, à **10,6g amidon liquéfié (106g/L)** sont additionnée de **7,2 g de glucoamylase.**

Durant 2h de saccharification, des prélèvements ont été réalisés à des temps définis afin de doser le glucose libéré selon la méthode décrite en **Annexe 2**.

**Résultats *:***

Les résultats moyens de saccharification pour chaque charge sont représentés sur la **Figure II-28**

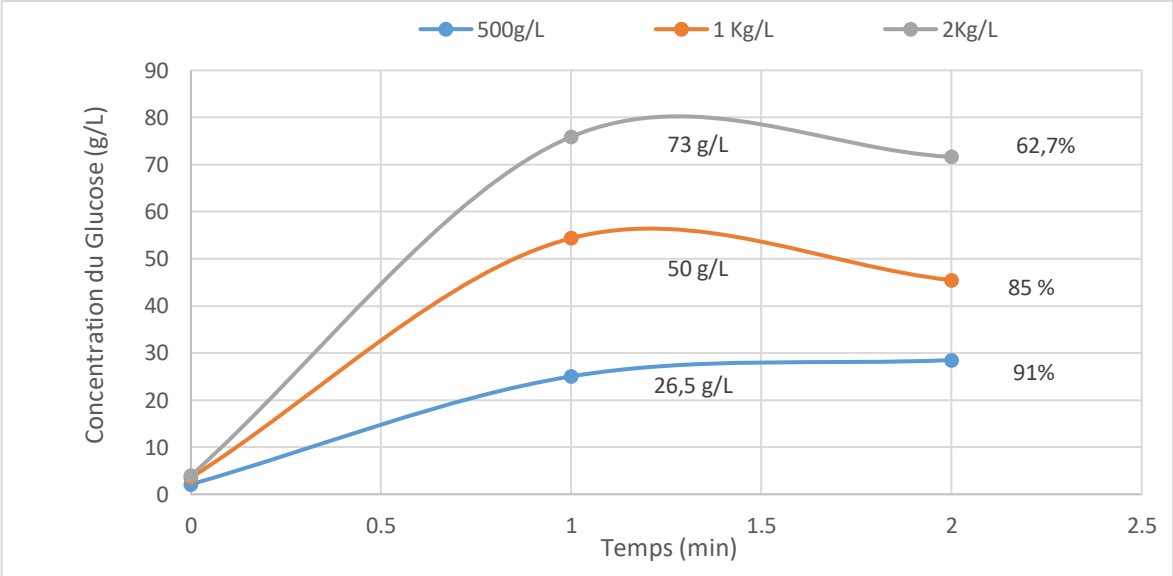



**Figure II-28 :** Saccharification des épluchures de pomme de terre (500 g/L, 1kg/L, 2kg/L) traitées thermiquement, broyées et liquéfiées en utilisant de la glucoamylase au rapport E/S optimal.

Pour les trois teneurs testées, la concentration du glucose augmente rapidement, atteignant un plateau à partir de 1h. Plus la teneur en épluchures est grande plus la concentration du glucose libérée est importante : elle est de

- ✓ 26,5 g/L pour 500 g MF/L aboutissant à un rendement de saccharification de 91%.
- ✓ 50 g/L pour 1Kg MF/L donnant un rendement de saccharification de 85%.
- ✓ 73 g/L pour 2Kg MF/L avec un rendement plus bas de 62,7%.

Des concentrations plus faibles en MF permettent une conversion plus efficace de l'amidon en glucose, probablement en raison d'une meilleure accessibilité des enzymes et d'une inhibition moins importante exercée par le substrat ou le produit. Le rendement est plus bas aux fortes charges à cause de la mauvaise agitation du milieu. De plus l'insolubilité de l'enzyme rend le milieu beaucoup plus onctueux et difficile à agiter. Des essais ayant pour objectif d'améliorer l'agitation (agrandissement des erlenmeyer, augmentation de la vitesse de secouage du bain marie) n'ont pas abouti à une amélioration de ce rendement. Ce problème pourrait être résolu en changeant le mode de l'agitation (agitation en hélice). L'agitation rotative homogénéise mieux le milieu, améliore le contact enzyme-substrat et limite l'inhibition exercée par le produit.

### II.3.5. Production du bioéthanol aux fortes charges :

Un procédé complet de production du bioéthanol a été exercée pour la charge maximale à 2Kg de MF/L afin de voir si l'amidon résiduel, liquéfié et non saccharifié aux fortes charges peut être utilisé (assimilé) par la levure. Nous avons aussi réalisé une fermentation sans autoclavage afin de voir si les températures exercées au cours des traitements enzymatiques (55-65)°C sont suffisantes pour éliminer les contaminants.

#### 1/ Traitement physique, liquéfaction et saccharification :

- Six suspensions de 100ml à 200g MF sont préparées par dispersion sous pression pendant 15min suivie d'un broyage.

- Liquéfier au rapport E/S optimale (300CEIP/g amidon) en ajoutant 5,2ml d'alpha-amylase diluée (1/50).
- Saccharifier au rapport E/S optimale (0,67g /g amidon liquéfié) en ajoutant 7,2 g de glucoamylase.

Le lot d'épluchure traité est le même que celui utilisé dans la partie précédente, il est donc à 5,3%.

**2/ Fermentation :**

La fermentation consiste à la production de bioéthanol en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* à partir des sucres fermentescibles libérés après liquéfaction et saccharification de l'amidon contenu dans les épluchures de pommes de terre.

La fermentation a été réalisée sur 2 cultures de 300ml qui constituent le mélange de 3 suspensions de 100ml à 200g MF liquéfiée et saccharifiée**.** Apres rectification du pH à 5 :

- La première suspension est directement ensemencée avec 3g de levure et mise sous agitation.
- La 2eme suspension est autoclavée puis ensemencée devant un bec bunsen par 3g de levure boulangère et mise sous agitation dans un agitateur secoueur.

Ces suspensions liquéfiées et saccharifiées sont considérées comme milieux de culture destinés à la fermentation : ils ne sont pas additionnés de sources d'azote, ni de source de phosphore, car les épluchures contiennent des éléments qui peuvent servir de sources alternatives.

Pendant la fermentation des prélèvements de (3ml) ont été réalisés afin de déterminer : le pH, la biomasse sèche, la concentration du substrat (Glucose). Lorsque le glucose est complètement consommé, nous jugeons que la fermentation est terminée.

**3/ Distillation :**

Lorsque la fermentation est terminée. Le moût est placé dans un ballon et chauffé aux environs de 78°C **(Figure II-29)** afin de le distiller l'éthanol et le séparer de l'eau (température d'ébullition ≈90°C). La quantité de l'éthanol dans le distillat est déterminée par réfractométrie (courbes d'étalonnage en **Annexe 02**).

Afin de déterminer l'efficacité de notre montage de distillation, nous avons commencé par l'établissement de son rendement de séparation en utilisant des solutions d'éthanol de masses et de titres massiques connus. Cette procédure permet d'estimer la grandeur des pertes. Le rendement était à 95%.



**Figure II-29 : Montage de distillation**

**Résultats *:***

Apres liquéfaction et saccharification, la concentration du glucose au démarrage de la fermentation est située entre 73g/L et 76 g/L car le rendement de la saccharification est situé entre 63% et 65% **(Tableau I1-3)**.

L'évolution des différentes grandeurs de la fermentation : pH, concentration en glucose et la masse sèche durant la fermentation des deux charges identiques liquéfiées et saccharifiées est représentés sur les **Figures II-30 et II-31.** Enfin, le

bilan global de chaque fermentation est représenté sur le **Tableau I1-3**. Les **Figure II-30 et II-31** montrent que durant la fermentation des deux charges :

- Le pH ne varie pas considérablement durant les deux fermentations (une moyenne de 5,2),
- La masse sèche (73 g/L à t0) diminue considérablement après 17 heures pour atteindre 40 g/L pour la fermentation sans autoclavage. Elle diminue rapidement durant les 5 premières heures aux environs de 43 g/L et se stabilise à 33 g/L à partir de 24H pour la fermentation avec autoclavage. Cette baisse significative indique que les microorganismes du milieu de fermentation ont consommé une quantité considérable de substrat insoluble, ce qui a entraîné une diminution de la quantité de la matière solide et a masqué la croissance microbienne.
- Le glucose (qui était à 73 g/L à t0) est complètement consommé après 17 h (Cf=0,086 g/L) pour la fermentation sans autoclavage. Pour la fermentation avec autoclavage, la concentration du glucose diminue considérablement durant les 5 premières heures de fermentation de 76 g/ à 6 g/L. Il est complétement consommé bien avant 24H. La diminution significative de la concentration en glucose témoigne d'une fermentation active où les micro-organismes consomment rapidement le glucose pour leur croissance et leur production de métabolites.

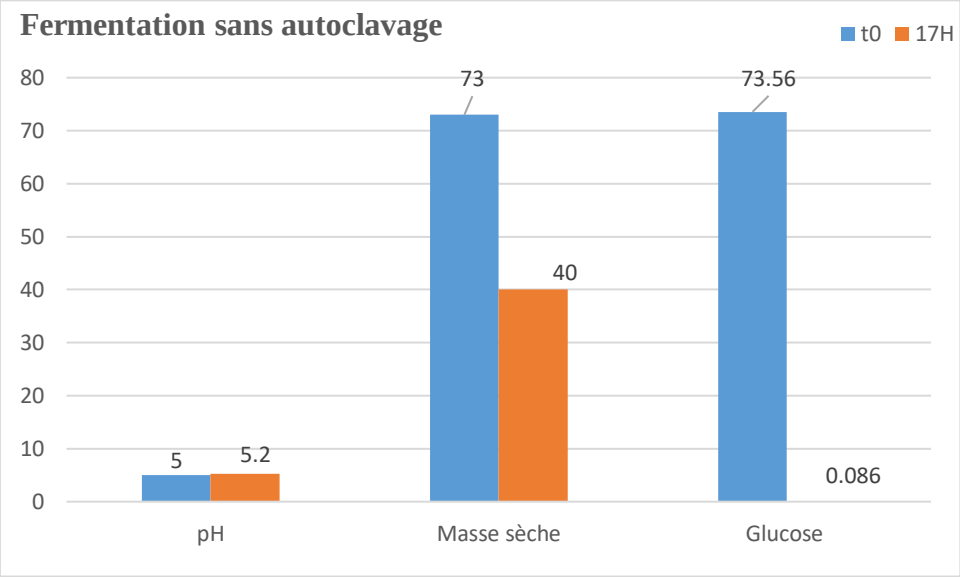



**Figure II-30 :** Evolution de (S, pH, X) durant la fermentation sans autoclavage.

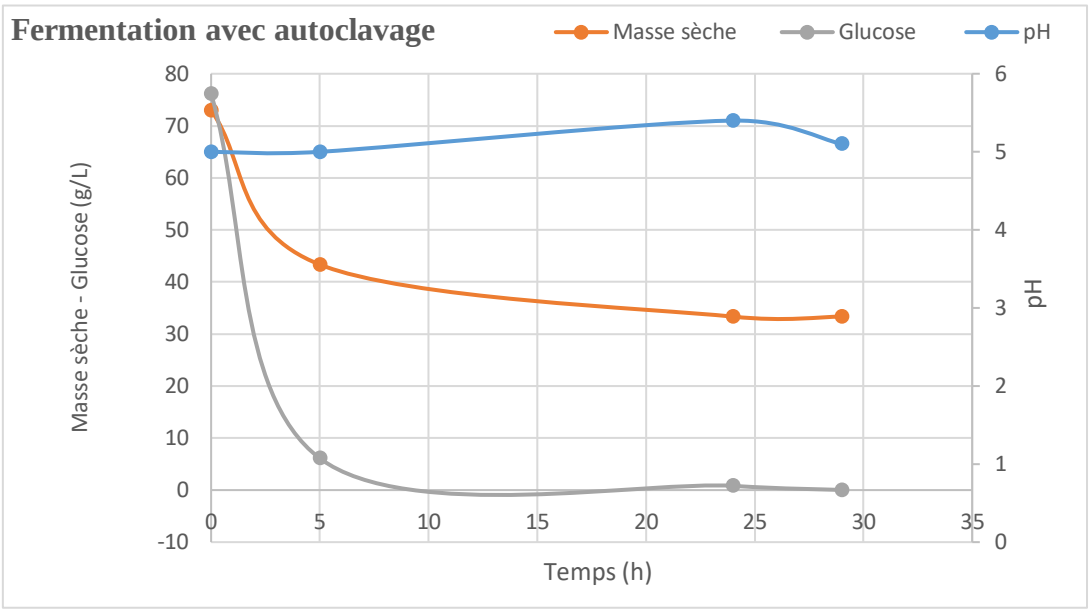



**Figure II-31 :** Evolution de (S, pH, X) durant la fermentation avec autoclavage.

Apres distillation des deux mouts de fermentation **(Tableau II-3)** :

***-Pour la fermentation avec autoclavage :*** La masse de l'éthanol récupéré est de 12,8g donnant une concentration finale de 42,67 g/L. Le rendement de la fermentation calculé par rapport à la quantité de glucose libérée lors de la saccharification est de 0,56 g Ethanol/g de glucose. Ce rendement est supérieur à 0,5 suggérant que la levure a utilisé une partie du glucose non hydrolysé dans la fermentation alcoolique : 42,67 g/L en éthanol est produite selon un rendement idéal à partir de 85,36 g/L de Glucose, alors qu'à t0, C0 Glucose était 76 g/L. cela veut dire que la levure a encore converti 9 g/L de glucose à partir de la fraction non saccharifiée. Il reste donc encore une concentration de 32 g/L qui n'a pas été exploité dans la production de bioéthanol, car elle est sous forme de dextrine non assimilables. La levure n'a donc pratiquement pas hydrolysé la fraction non saccharifiée, ce qui a donné un taux d'alcool inferieur par rapport à ce qui est attendu (58,5 g/L). Le rendement réel calculé à partir de la quantité totale du glucose dans la fraction amidon (117g/L) est de 0,364 g éthanol /g de glucose, ce qui es inferieur au rendement idéal. Nous avons donc perdu une concentration en éthanol de 16g/L **(Tableau II-3)**.

***-Pour la fermentation sans autoclavage :*** La masse de l'éthanol récupéré est de 7,69g donnant une concentration finale de 25,63 g/L. Le rendement de la fermentation calculé par rapport à la quantité de glucose libérée lors de la saccharification est de 0,34 g Ethanol/g de glucose. Ce rendement est inférieur à 0,5 suggérant que le milieu de fermentation a été contaminé par d'autres microorganismes qui ont nettement diminué le rendement de la fermentation. La phase du traitement enzymatiques aux températures 55-65°C, ne permet pas d'assurer une stérilité suffisante du milieu. L'autoclavage du milieu est donc obligatoire.

**En conclusion :**

***Si la saccharification était totale.***

- Pour des épluchures dont le taux en amidon de 5,3%. 2 Kg MF /L devrait produire 58,5 g éthanol /L (74ml/L) en moins de 24h,
- Un réacteur de 1$m^3$ avec une charge de 2 tonnes/$m^3$ produit 74 L/cycle en moins de 24h,
- Sur 300 jours (150 cycles), nous pouvons produire 11100 L/année. Soit 11$m^3$ éthanol /année.

***Avec 63-65% de saccharification :***

- Pour des épluchures dont le taux en amidon de 5,3%. 2 Kg MF /L produit 42,67 g éthanol /L (54ml/L) en moins de 24h,
- Un réacteur de 1m3 avec une charge de 2 tonnes/m3 produit 54 L/cycle en moins de 24h,
- Sur 300 jours (150 cycles), nous pouvons produire 8100L/année. Soit 8$m^3$/année.

***Nous avons donc une perte estimée 3$m^3$ éthanol /année.***

**Tableau II-3 : Bilan des fermentations.**

| | **Fermentation 2KgMF/L V=300ml sans autoclavage** | **Fermentation 2KgMF/L V=300ml avec autoclavage** |
|---|---|---|
| **Liquéfaction** | | |
| **C amidon initiale** | 106 g/L | 106 g/L |
| **Glucose total Contenu dans l'amidon** | 117g/L | 117g/L |
| **Saccharification** | | |
| **C glucose à $t_{f-}$ saccharification** | 73, 56g/L | 76,1 g/L |
| **Rendement de la saccharification** | **63%** | **65%** |
| **Fermentation** | | |
| **C glucose à t0 fermentation** | 73, 56 g/L | 76,1 g/L |
| **C glucose à tf fermentation** | 0,08 g/L | 0,03 g/L |
| **Distillation** | | |
| **Masse distillat (g)** | 21,59 g | 28,09 g |
| **Indice de réfraction** | 1,3520 | 1,3570 |
| **P (%) massique** | 35,6% | 45,6% |
| **Masse du bioéthanol (g)** | 7,69 g | 12,8 g |
| **Volume du bioéthanol (ml)** | 9,74 ml | 16,66 ml |
| **Bilan** | | |
| **Concentration finale dans le mout de fermentation V=300ml** | 25,63 g/L<br>24,35 ml/L<br>2,44% | 42,67 g/L<br>54,07 ml/L<br>5,4% |
| **Y (P/S)**<br>**(g $_{bioeth}$ /g de glucose disponible )** | 0,34 | 0,56 |
| **Y (P/S)**<br>**(g $_{bioeth}$ /g de glucose total )** | 0,22 | 0,36 |
| | | |

Une remarque très intéressante à signaler, c'est la récupération d'un sous-produit de ce process appelé la vinasse, un résidu de la distillation riche en métabolites de la fermentation et qui peut être valorisé comme biofertilisant (**Figure II-32**).

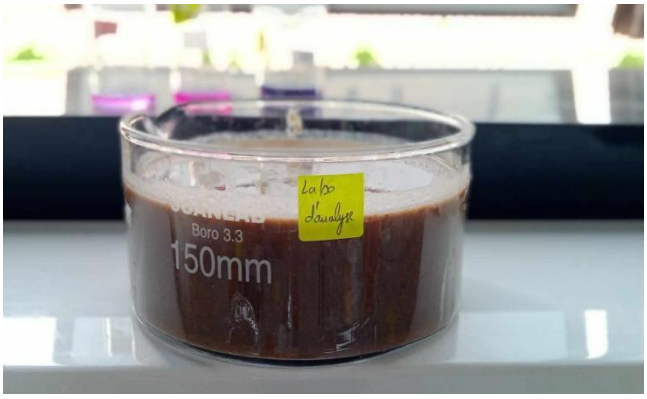



**Figure II-32 :** Vinasse, Résidu de la distillation qui sert de fertilisant.

### II.3.6. Analyse du distillat :

Les deux distillats sont mélangés et redistillés afin d'augmenter la concentration de l'éthanol. Nous avons obtenu un distillat global ayant les caractéristiques enregistrées sur le **Tableau II-4.**

Il faut signaler que la densité (0,845) confirme que le titre massique de notre distillat (86%) **(Courbe d'étalonnage Khelil Cherfi et Sadfi ,2021).** Ce distillat a fait objet de tests d'identification.

**Tableau II-4 :** Données relatives au distillat global

| | **Caractéristiques** |
|---|---|
| **Indice de réfraction** | 1,3630 **(à diluer)** |
| **P (%) massique selon la courbe IR** | **/ (dilution non effectuée)** |
| **Densité** | 0.845 |
| **P (%) massique selon la densité** | 86% |
| **Aspect** | Incolore, transparent par comparaison avec l'eau |
| **Odeur** | Caractéristique : Odeur de l'éthanol mélangé aux odeurs typiques de la glucoamylase. |
| **pH** | 6.5 |

## 1/ Tests d'identification :

### a/ Le test au dichromate de potassium :

En milieu acide, l'éthanol (CH3-CH2OH) est oxydé en Acide acétique (CH3-COOH) en présence de dichromates ($Cr_2O7^{-2}$). Ces derniers subissent une réduction en ions $Cr^{3+}$ responsables de la coloration vert foncé de la solution. S'il y a encore une réduction en ions $Cr^{2+}$, la couleur devient bleue.

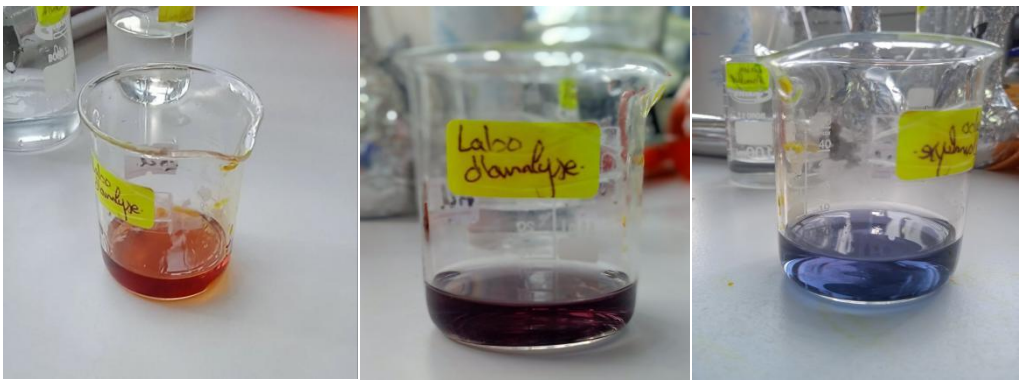
**Test** *:*

Dans un bécher, mélanger 10ml de distillat et 20ml d'une solution de dichromate (0.1M) avec 20ml d'acide sulfurique à 25%. Observer le changement de la couleur.

**Résultat :**

D'après la **Figure II-33,** après ajout du réactif de bichromate de potassium, nous avons un virage de la couleur de l'orange au (Brun-vert) qui commence avec l'ajout

de l'acide sulfurique. Cette couleur résulte du mélange des ions $Cr_2O7^{-2}$ (de couleur orange), des ions $Cr^{3+}$ (de couleur verte) et les ions $Cr^{2+}$ (de couleur bleu). Lorsque la réaction est terminée, la couleur devient bleue ce qui atteste une réduction jusqu'aux ions $Cr^{2+}$, car notre distillat est concentré en éthanol. Ce test nous montre bien que le distillat est de l'éthanol.



**(1)** **(2)** **(3)**

**Figure II-33 :** Résultat de la révélation de l'éthanol dans le distillat global au bichromate de potassium.

**b/ Le Flambage :**

On prend un volume de notre distillat dans un verre de montre et on flambe le contenu de ce dernier **(Figure II-34)**. La flamme bleue est un indicateur que l'éthanol est présent dans le distillat avec une concentration suffisante.

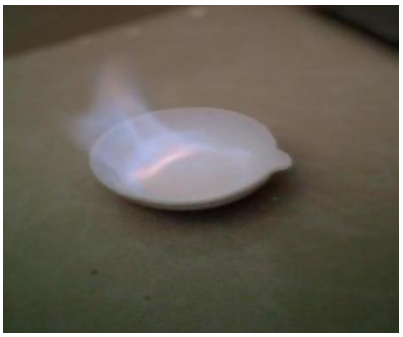


**Figure II-34 :** Résultat du flambage du distillat.

**c/ Test d'identification B (Selon USP):**

**Test*:***

- A 0.5ml de distillat, ajouter 5ml l'eau distillée bouillie et refroidie.
- Ajouter 2ml de NaOH (1N).
- Ajouter doucement 2ml de l'iodine (0.05N).
- Conserver la solution dans un tube, remarquer la formation d'un précipité jaune à partir de 30min.

**Résultat *:*** Après 30min nous avons obtenu un précipité jaune attestant la présence de l'éthanol (**Figure II-35**)



**Figure II-35 :** Résultat du test d'identification B

**D/ Le spectre Infrarouge :**

La **Figure II-36** représente le spectre de notre distillat avec comparaison par rapport à celui d'une molécule de référence : Éthanol 96% **(Figure II-37**)

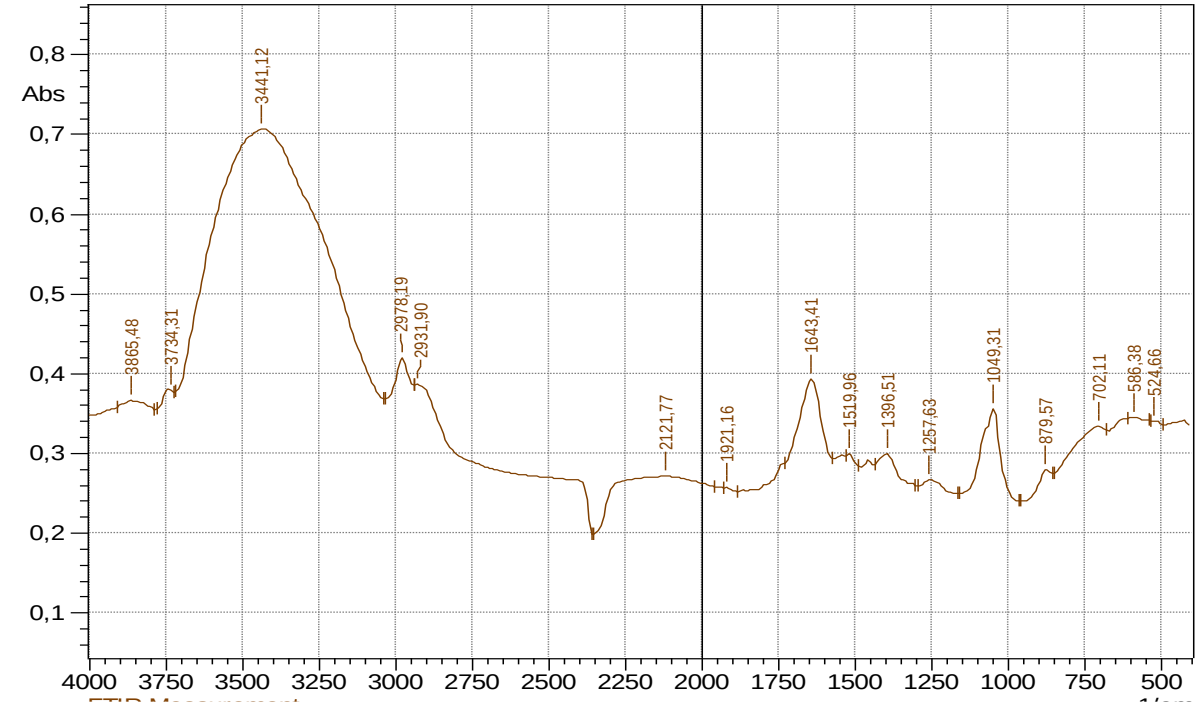



**Figure II-36 :** Spectre infrarouge du distillat.

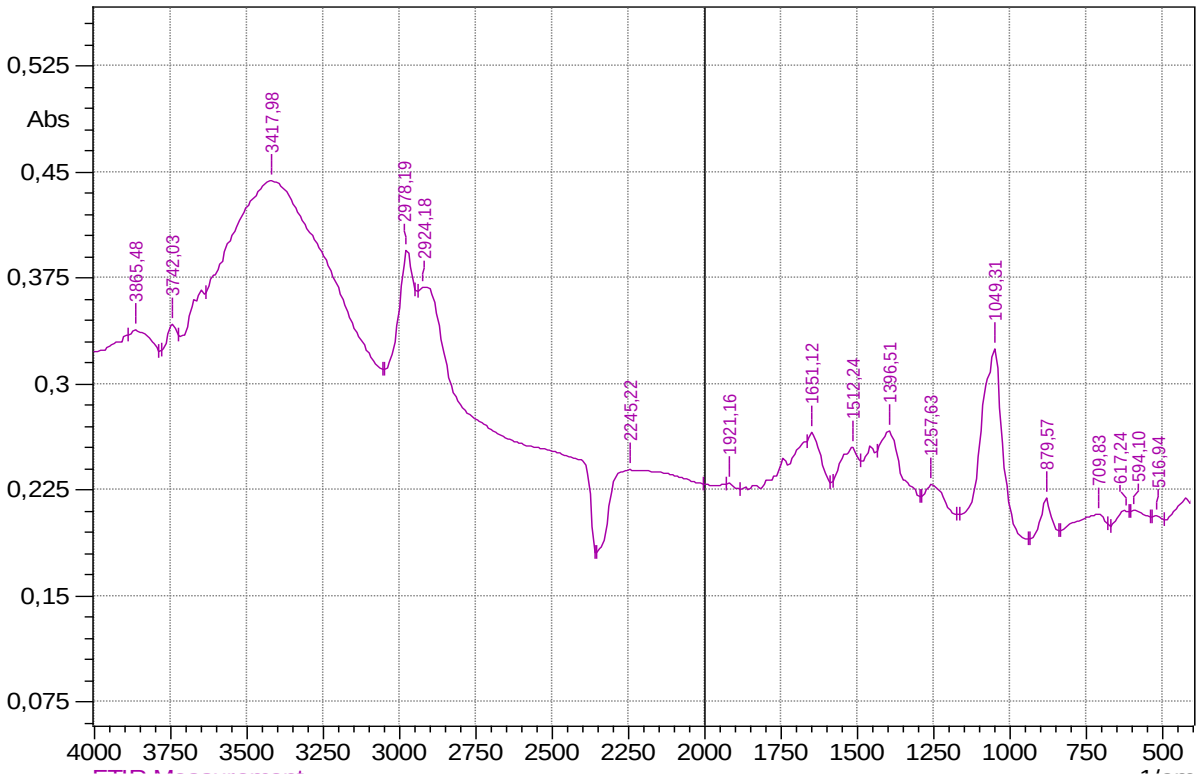



**Figure 1I-37** : Spectre Infrarouge d'un éthanol (96%).

Il s'agit bien du même produit (Éthanol) puisque nous avons obtenu des pics aux mêmes bandes dans les deux spectres. On parle de :

– La bande d'allongement caractéristique de la fonction OH située à 3441 $cm^{-1}$ présente dans les alcools (**O-H libre :** [3650-3590], **O-H lié (liaison H) :** bande large à [3500-3100]).

– La bande de déformation caractéristique de la fonction OH à 1396 $cm^{-1}$ présente dans les alcools primaires (**O-H (alcool primaire) :** [1350-1260]).

– La bande d'allongement caractéristique de la liaison C-H à (2931 et 2978) $cm^{-1}$. La bande située à 1396 $cm^{-1}$ peut être aussi celle de déformation correspondante à la liaison C-H. (**C-H des chaînes aliphatiques et des groupements CH3 :** [3000-2840] et [1450-1375]).

– La bande de la liaison –C-O présente dans les alcools primaires à 1049,31 $cm^{-1}$. **(C-O des alcools primaires :** [1085-1050]).

**2/ Tests de conformité**

**a/ Test de l'Acidité (selon USP) :**

Dans un bécher mélanger 2 ml de distillat, 2 ml d'eau distillée bouillie et refroidie et 0.1 ml de phénolphtaléine, Ajouter 0.1 ml de NaOH (0.01N). Observer le changement de la couleur. Nous jugeons que l'acidité est ≤ 30ppm exprimée en acide acétique si la couleur est rose.

**Résultat :**

La couleur est rose après addition de 0,1ml de NaOH (0.01N) (**Figure II-38),** notre distillat répond aux normes exigées par la pharmacopée européenne ainsi que l'USP, pour un éthanol (96% v/v) (92,6 % m/m).



**Figure II-38 : Résultat du Test de l'Acidité.**

# CONCLUSION GENERALE

Le bioéthanol a été fabriqué en utilisant l'amidon de pomme de terre provenant des déchets de la consommation quotidienne de la pomme de terre. L'abondance de la pomme de terre en Algérie justifie le choix de l'épluchât. Notre travail a débuté par une description des épluchures de pomme de terre. C'est une ressource extrêmement abondante en eau (85%). La proportion de matières sèches est de 9%, dont 6 % d'amidon. Cependant le pourcentage d'amidon peut varier d'un seuil minimal de 4% à un seuil maximal de 9%.

Pour être assimilable, l'amidon des épluchures de pomme de terre doit subir ;

- Un prétraitement thermique sous pression pendant 15min suivi d'un broyage, ….
- Une liquéfaction de 2H à pH 6, à 55°C, pour un rapport (Alpha-amylase /amidon) de 300CEIP/g. Afin de bien estimer l'activité de l'alpha-amylase, il faut utiliser un amidon d'une bonne solubilité ou d'une solubilité modérée avec une bonne dispersion au cours de sa préparation.
- Une saccharification, afin de libérer le glucose à partir des produits de la liquéfaction. Afin de bien mener cette partie, une optimisation de la catalyse enzymatique par la glucoamylase a été réalisée. Les conditions optimales de cette opération pour amidon d'une solubilité modérée-liquéfié sont : pH5, une température de 60-65°C et un rapport glucoamylase /amidon liquéfié de 0,0067 g/g soit 430 UI/g aboutissant à un rendement très satisfaisants de 91%. Cependant, ce rapport est 0,67 g de glucoamylase /g (43000 UI/g) pour l'amidon de pomme de terre liquéfié dans les mêmes conditions de pH et de température. A ce rapport optimal, la saccharification s'effectue avec des rendements de 85% à 91% pour les faibles charges (500g MF/L et 1Kg MF/L) ; cependant il est de 63% pour les fortes charges de 2Kg MF/L.

Finalement, notre bioéthanol a été fabriqué grâce à une fermentation moins de 24 heures. Ce processus se déroule à température ambiante, avec un pH égal à 5. Le bioéthanol est récupéré par distillation. Les résultats de cette étape se résument ainsi :

- Nous avons obtenu 42,67 g d'éthanol /L (54,07 ml/L) à une charge maximale de 2Kg/L, avec un rendement de 0,56 g d'éthanol par gramme de glucose libéré au cours de la saccharification. La productivité est de 42,67 g d'éthanol /L/Jour (soit 54,07 ml/L/Jour).
- Le rendement par rapport au glucose totale contenu dans l'amidon est de 0,36 g/g, ce qui indique que la levure n'a pas assimilé la fraction glucidique liquéfié et non saccharifiée. La concentration prévue en éthanol est de 58,5 g/L (74ml/L), indiquant une perte de 16g/L (20ml/L).
- Par extrapolation, sous agitation limitée, la saccharification des épluchures de pomme de terre à 5% d'amidon donne un rendement de 63-65%. Un réacteur de $1m^3$ avec une charge de 2 tonnes/$m^3$ produit 54 L d'éthanol sur une quantité prévue de 74L en moins de 24h. Nous pouvons produire $8m^3$/année au lieu $11m^3$/année, Nous avons donc une perte estimée $3m^3$ éthanol /année. La productivité calculée par rapport à 300 jours est de 27 L/$m^3$/Jour au lieu de 37 L/$m^3$/Jour. Soit une perte de 10L/$m^3$/Jour

Le taux d'éthanol obtenu est considérable mêmes sous des conditions d'agitation limitées, car il est obtenu à partir d'un déchet. Cependant, il faut penser réellement à résoudre ce problème afin d'améliorer la phase de saccharification et exploiter au maximum l'amidon contenu dans ce déchet.

L'utilisation des épluchures de pomme de terre pour produire du bioéthanol est intéressante, d'autant plus que notre pays est un consommateur de pomme de terre et que les ressources de ce déchet sont multiples : les ordures ménagères, les gargotiers, et les restaurants privés, les restaurants collectifs (hospitaliers et universitaires), les usines de fabrication de chips et de purées déshydratées. Dans cette optique, il est nécessaire de débuter l'étude à grandes échelles (au moins à l'échelle pilote) afin de démontrer la reproductibilité des résultats.

# Références Bibliographiques


- **Abada. S, Tebbouche. L, Bessah. R, Kechkar. M, Berrached. A, Saber. M, Aziza. M, Amrane. A, 2022**. Experimental study and kinetic modelling of bioethanol production from industrial potato waste. Biomass Conversion and Biorefinery. https://doi.org/10.1007/s13399-022-02927-x.
- **Abdesselam. I, Bennia. N, 2016**. Valorisation des sous-produits polysaccharidiques pour la production de bioéthanol. Mémoire de master. Université de Dr Yahia Farés de Médéa.
- **Abe. J., Nakajima. K., Nagano. H. and Hizukuri. S, 1988**. Properties of the raw-starch digesting amylase of Aspergillus sp. K-27: a synergistic action of glucoamylase and a-amylase. Carbohydr. Res. 175 (1) 85-92.
- **Aehle. W et Misset. O, 1999.** Enzymes for industrial applications. In: Rehm H.J., Reed G., editors. Biotechnology, 2nd ed. Germany: Wiley-VCH, 189-216.
- **Akbi A., 2013**. Les implications du développement des biocarburants. Thèse de doctorat, Ecole doctorale 513 Droit Et Sciences Politiques, Économiques et de Gestion Nice, paris, 229 pages
- **AND, 2014:**https://and.dz/site/wp-content/uploads/2016/04/etude-caracterisation-2014-1.pdf
- **AND, 2020:** https://and.dz/site/wp-content/uploads/rapport%20DMA.pdf
- **AND : Agence nationale des déchets**. https://and.dz/
- **Benassi. V. M, Pasin. T. M, Facchini. F. D. A, Jorge. J. A., & de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli .M, 2014**. A novel glucoamylase activated by manganese and calcium produced in submerged fermentation by Aspergillus phoenicis. Journal of basic microbiology, 54 (5) 333-339.
- **Bennett J.W, 1998.** Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. J. Biotechnol., 66 (2-3) 101-107.
- **Berrabah. A, 2019-2020**. Evaluation des propriétés physico-chimiques et sensorielles d'un yaourt à texture améliorée par l'extrait d'amidon de pomme de

terre blanche (***Solanum tuberosum***). Mémoire de master, université de Msila. Algerie.

- **Burhan. A, Nisa. U, Gokhan. C, C. Omer, Ashabil. A, Osman. G, 2003**. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. isolate ANT-6, Process. Biochem. 38, 1397–1403.
- **Cherifi. N et Benaissa. F, 2020.** Valorisation de sous-produits polysaccharidiques dans la production de bioéthanol par fermentation alcoolique. Mémoire de master. Université de Dr Yahia Farés de Médéa.
- **Davies G. J., Wilson K. S. et Henrissat B. 1999**. Nomenclature for sugar binding subsites in the glycosylhydrolases. Biochem. J, 321, 557-559.
- **De Souza. P. M., & de Oliveira Magalhães. P, 2010**. Application of microbial α-amylase in industry–A review. Brazilian journal of microbiology, *41*(4) 850-861.
- **Decruyenaere. V, Froidmont. E, Saive. P, Rondia. P, Bartiaux-Thill. N, Stilmant. D, 2005.** Valorisation des Co-produits de la pomme de terre en production animale. Journée d'étude Pomme de terre, 23 novembre 2005, CRA-W Gembloux, 76-87. https://www.fourragesmieux.be/Documents_telechargeables/Cuvelier_C_&_Dufrasne_I_Livret_alimentation_des_VL_3_Aliments_et_calculs.pdf
- **Delaplace Pierre, 2007 :** Caractérisation physiologique et biochimique du processus de vieillissement du tubercule de pomme de terre ***Solanum tuberosum*** L. Thèse de doctorat. Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques.
- **Delaplace, P., & Fauconnier, M.-L 2004.** Valorisation industrielle de la pomme de terre. Troupeaux et Cultures des Tropiques, 51-56.
- **Demirbas M.F, 2009**. Biorafinerie for biofuel up grading a critical review. Appl. Energy, 86, 151-161.
- **FAO, 2008 :** La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture. Les Biocarburants : perspectives, risques et opportunités Rapport 1,

Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, https://www.fao.org/4/i0100f/i0100f.pdf

- **Fogarty. W.M. and Senson. C.P, 1983**. Purification and properties of a thermophilie amyloglueosidase from ***Aspergillus niger***, Eur. J. Appl. Microbiol. Bioteehnol. 18, 271-275.
- **Food and agriculture Organization (FAO), 2008.** Année internationale de la Pomme de terre. 2008. Éclairage sur un trésor enfoui. https://www.fao.org/4/i0500f/i0500f.pdf
- **Fujii, M. and Kawamura, Y. 1985.** Synergistic action of a-amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch. Biotechnol. Bioeng. 27, 260-265.
- **Garcia. E, Aranda-Cañada. R. , Garcia. P, Fernández-Lorente. G, 2023.** Use of Potential Immobilized Enzymes for the Modification of Liquid Foods in the Food Industry. Processes, 11, 1840.
- **Ganghofner. D, Kellermann. J, Staudenbauer. W. L, Bronnenmeier. K, 1998.** Purification and properties of an amylopullulanase, a glucoamylase, and a glucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, Biosci. Biotechnol. Bio chem. 62, 302–308.
- **Ghosh. A., Chatterjee and Das, A. 1990.** Characterization of glucoamylase from ***Aspergillus terreus* 4**. FEMS. Microbiol. Lett, 66 (1-3) 345-349
- **Gupta. R., Gigras. P., Mohapatra. H., Goswami. V.K., Chauhan. B, 2003**. Microbial a-amylases : A biotechnological perspective, Process Biochem. 38, 1599–1616.
- **HATIK, C, 2015.** Proposition des scénarios de gestion raisonnée des déchets en vue de leur valorisation énergétique. Thèse de doctorat : Génie des procédés. Université de la Réunion, 402p.
- **Headon. D.R et Walsh. G, 1994**. The industrial production of enzymes. Biotechnology. Advances, 12 (4) 635-646.
- **Henrissat. B, 1991**. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. Biochem. J., 280, 309-316.

https://www.yumpu.com/fr/document/view/16626328/lamidon-et-le-pla-deux-biopolymeres-sur-le-marche-valbiom

- **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Nomenclature Committee (IUBM), 1992.** Enzyme Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBM) on the Nomenclature and Classification of Enzymes. Academic Press Inc., New York
- **Jeffrey Wilson. J et Michael Ingledew. W, 1982.** Isolation and characterisation of schwanniomyces alluvius amylolytic enzymes.Applied and Environmental Microbiology 44 (2) 301-307.
- **Keera. A. A, Mouafi. F. E, Kahil. T, Fadel. M, & Abedo. A. A, 2014**. Hyper production of glucoamylase by Aspergillus oryzae FK-923 under solid state fermentation. World Applied Sciences Journal, 30 (11) 1447-1461.
- **Khelifa Litamine, 2018**. Pomme de terre : L'Algérien consomme plus 110 kg de pommes de terre par an. Article de Presse, ALGERIE ECO. **https://www.algerie-eco.com/2018/07/23/pomme-de-terre-lalgerien-consomme-plus-110-kg-de-pommes-de-terre-par-an/**
- **Khelile chorfi zineb et sadfi Naima, 2020-2021.** Valorisation des épluchures de pomme de terre dans la production de bioéthanol par fermentation alcoolique. Mémoire de master. Université de Dr Yahia Farés de Médéa.
- **Kindle, K. L, 1983.** Characteristics and production of thermostable α-amylase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *8*, 153-170.
- **Koç. Ö., & Metin. K, 2010**. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase produced by Aspergillus flavus HBF34. African Journal of Biotechnology, *9* (23) 3414-3424.
- **Kuchin, S.V, Kartasheva, N.N. and Benevolensky, S.V, 1993.** Genes required for depression of an extracellular glucoamylase gene, STA2, in the yeast ***Saccharomyces***. Yeast, 9, 533-541.
- **Lee, S.H, 1991.** Bioconversion of starch wastes. ln Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products. A.M. Martin ed, New York. Ch. 8, pp. 265-291.

- **Lestari S. et al., 2009**.Transforming triglycerides and fatty acids into biofuel. Chem. Sus. Chem**,** 2 (12) 1109-1119.
- **Lim S.J., Oslan. S. N, 2021.** Native to designed: microbial α-amylases for industrial applications. Peer. J, 9, 11-15. http://doi.org/10.7717/peerj.1131.
- **Lorne. D, 2011.** Le point sur les biocarburants, progression des marchés nationaux et internationaux. IFPEN. https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/43/095/43095219.pdf
- **Mahajan, P.S. Kolhekar, S.R. Borkar, P.S, 1983.** Purification of amyloglucosidase. Analytical. Biochem. 133 (2) 482-485.
- **McCarter J.D and Withers S.G. 1996.** Unequivocal identification of Asp 214 as the catalytic nucleophile of Saccharomyces cerevisiae -glucosidase using 5 fluoro glycosyl fluorides. J. Biol. Chem. 271, 6889-6894.
- **McMahon E.M., Kelly C.T. et Fogarty W.M. 1999**. High maltose producing amylolytic system of a Streptomyces species. Biotechnology Letters. 21, 23-26.
- **Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S, 2014.** Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. Journal of Cleaner Production ; 65, 28-41.
- **MONNET. D, 2008.** Etude de l'évolution des propriétés mécaniques des matériaux amylacés par sélection et/ou modifications structurales dirigées, Thèse de Doctorat en chimie, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.
- **Natalia. D, Yuliani. Y, Ermayadhie. Y, Putra. R & Sindumarta. M, 2002**. Thermostable glucoamylase-type enzyme from *Bacillus acidocaldarius* RP1. Biochemistry and Molecular Biology Education, 30 (6) 398-400.
- **Nelson, N, 1944.** A Photometrie adaptation of the Somogi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380.
- **Nielson J-E., Borchert T-V et Vriend G. 2001.** The determinant of -amylase pH activity profiles. Protein Engineering. Oxford University Press, 14 (7) 505-512.
- **Olayinka, O. H, 2015**. Assessment of Sweet Potato Peel as a Potential Raw Material for Bioethanol Fuel. Assessment, 2 (12).

- **Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V. T., Singh D. et Mohan R, 2000.** AdvancesIn. Microbial amylases. Biotechnology. Appl. Biochem. 31, 135-152.
- **Pandey, A, 1995.** Glucoamylase research and overview. Starch/Starke, 47 (11), 439-445.
- **Riegal. E.R., Bissinger. H.G, 2003.** Industrial Fermentation: Principles, Processes and Products. In: Riegal's Handbook of Industrial Chemistry, J.A. Kent, (Ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, 963–1045. E1 : www.uarga.org.com 24/04/2017
- **Sadek. S, 2015.** Élaboration de nouveau système à base de polymère naturel pour la libération de l'aspirine : cas de L'amidon, Mémoire master. Université de Tiaret.
- **Saha, B.C. and Zeikus, J.G. 1989.** Microbial glucoamylases: biochemical and biotechnological features. Starch/Starke, 41 (2) 57-64.
- **Schomburg. D and Salzmann. M, 1991**. Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases. Springer-Verlag ed. Berlin Heidelberg. Germany. p 1-12.
- **Sepelev, I., & Galoburda, R, 2015**. Industrial potato peels waste application in food production: a review. In Research for Rural Development. International Scientific Conference Proceedings (Latvia)): Latvia University of Agriculture.
- **Seyed. A. B, 2012.** Modification des Propriétés Physico-Chimiques de l'Amidon par Procèdes Hydrothermiques : Contribution à l'étude des Transferts Couples Chaleur-Masse. Thèse de doctorat. Université de la rochelle. https://theses.hal.science/tel-00823904v1/preview/2012Bahrani29921.pdf
- **Silva. R. N**, **Asquieri. E. R, Fernandes. K. F, 2005.** Immobilization of Aspergillus niger glucoamylase onto a polyaniline polymer. Process Biochemistry, 40 (3-4) 1155-1159.
- **Sims, R., Taylor, M., Saddler, J., Mabee, W., 2008.** From 1st -to 2nd -generation biofuel technologies: An overview of current industry and RD&D activities, International Energy Agency. Paris, France, pp. 120. http://environmentportal.in/files/2nd_Biofuel_Gen.pdf

- **Solomon. B, 1978.** Starch hydrolysis by immobilized enzymes: Industrial Applications. Advances in Biochemical Engineering, 10, 131-177.
- **Thived. P, Mercier. C, Guilbot. A, 1965**. Dosage de l'amidon dans un milieu complexe. Annales de biologie animale, biochimie, biophysique, 5(4) 513-526.
- **Ueda. S, Zenin. C.T, Monteiro. D.A. and Park. Y.K, 1981.** Production of ethanol from raw cassava starch by a nonconventional fermentation method. Bioteehnol. Bioeng. 23, 291-299.
- **Uitdehaag. J, Mosi. R, Kalk. K. H, Vander Veen. B. A, Dijkuizen. L, Withers.S. G et Dijkstra B. W, 1999.** X-ray structure along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the amylase family. Nat. Struct. Biol. 6 (5) 432-436.
- **Van der Maarel. M.J.E.C, Van der Veen. B, Uitdehaag. J.C, Leemhuis. H, Dijkhuizen. L, 2002.** Properties and applications of starch-converting enzymes of the a-amylase family, J. Biotechnol, 94 (2) 137–155.
- **Vihinen. M., Mantasala. P, 1989**. Microbial amylolytic enzymes, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 24, 329–418.
- **Wertz Jean-Luc, 2011.** L'amidon et le PLA : deux biopolymères sur le marché. Document FARR-Wal : Note de synthèse. https://www.yumpu.com/fr/document/view/16626328/lamidon-et-le-pla-deux-biopolymeres-sur-le-marche-valbiom
- **Wu. D, 2016.** Recycle technology for potato peel waste processing: A review. Procedia Environmental Sciences ; 31, 103-10.

# ANNEXES

# Annexe 01

**Préparation des solutions :**

**A) Solution d'amidon**

Pour avoir une solution d'amidon d'une concentration donné, il faut suivre les étapes suivantes :

- peser la masse d'amidon sec (poudre) versé dans 10ml d'eau distillée, bouillir en mélangeant.
- Jeter ensuite ce mélange chaud dans 80 ml d'eau froid en remuant vivement.
- Remettez dans une fiole et ajuster le volume à 100 ml.

**B) Solution d'HCl (0.1N)**

Pour préparer une solution de (0.1N) d'un volume Vf, réaliser une dilution à partir d'une Solution mère pure (12N) selon la loi de dilution $NmVm=Nf\,Vf$

**C) Solution de stockage (0.1N) :**

- Dissoudre 3.17g d'iodine (I2) et 10g da KI dans une fiole de 250ml.
- Ajouter un petit volume d'eau distillée et mélanger jusqu'à la dissolution totale.
- Ajuster le volume à 250ml par l'eau distillée.
- Conserver la solution préparée dans un flacon en verre fumé sombre bien fermé.

**D) Solution de dosage (0.001N) :**

-Diluer 1ml de solution de stockage à 100 ml avec l'eau distillée (Dilution 1/100).

- Conserver la solution de dosage dans un flacon en verre fumé sombre bien fermé.

**E) Solution de tampon de (0.012N) pH (5.6-6) :**

–Dissoudre 12.8g d'acétate de sodium anhydre C2H3NaO2 avec 0.34ml d'Acide acétique

C2H4O2 dans une fiole de 1000 ml.

–Ajuster le volume à 1000ml par l'eau distillée.

**F) Solution d'iodine (0.05 N) :**

-Diluer 1ml de solution de stockage à 2ml avec l'eau distillée (Dilution 1/2).

**G) Solution de NaOH (1N)**

- **D**issoudre 1g d'hydroxyde de sodium dans un fiole de 25ml.

- Ajuster le volume à 25ml par l'eau distillée.

**H) Solution de NaOH (0.01N) :**

- Diluer 0.1ml de solution d'hydroxyde de sodium (1N) à10ml avec l'eau distillée (Dilution 0.1/10).

**I) Solution de phénolphtaléine :**

- Dissoudre 0.1g de phénolphtaléine avec 80ml d'éthanol (96%) dans une fiole de 100ml.
- Ajuster le volume à 100 ml par l'eau distillée

# Annexe 02

**Courbes d'étalonnages**

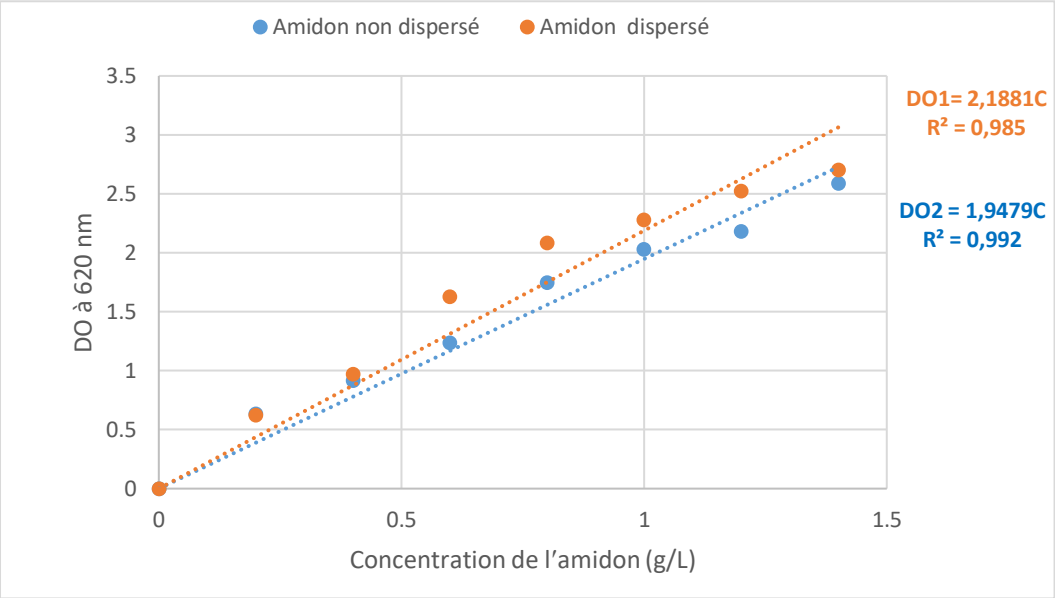
**A) Dosage d'amidon :**

- Préparer une solution d'amidon mère de 10g /l.

- Faire une gamme de dilutions allant de 0.2 à2 g/l en utilisant du HCl (0.1N).

- Faire un Dosage de 1ml de mélange avec 2.4ml d'iodine (0.001N).

- Mesurer l'absorbance à 620nm après une incubation à l'abri de lumière pendant 15 min




Courbe d'étalonnage destinée au dosage de l'amidon par Spectrophotométrie.

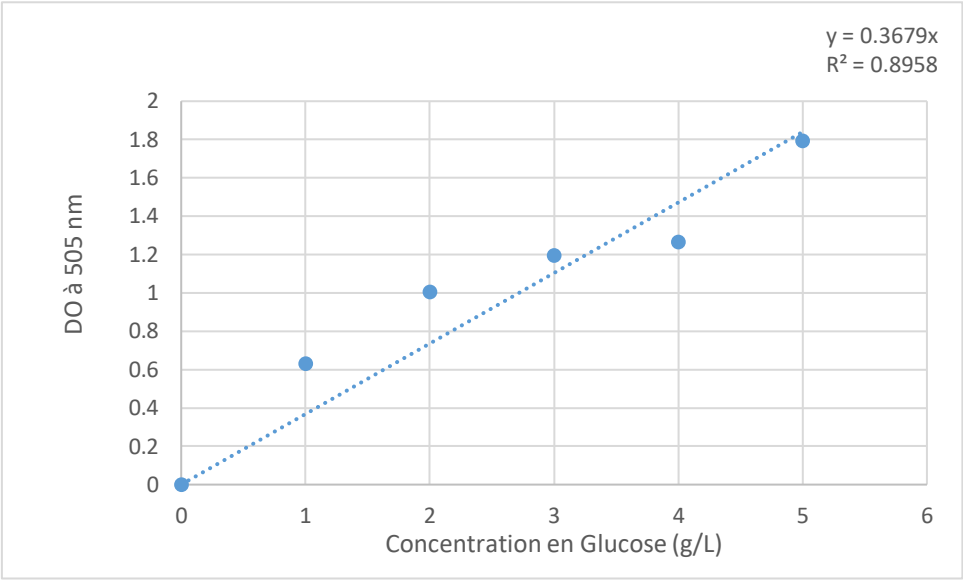
**B) Dosage de glucose :**

- Préparer une solution mère de 10g/l de glucose.

- Faire une gamme des dilutions allant de 1 à 5g/l à partir de la solution mère.

- Faire un dosage de 1 ml de réactif « QCA » +10 µl de chaque dilution.

- Mesurer l'absorbance à 505nm après une incubation à l'abri de la lumière pendant 25min à température ambiante.



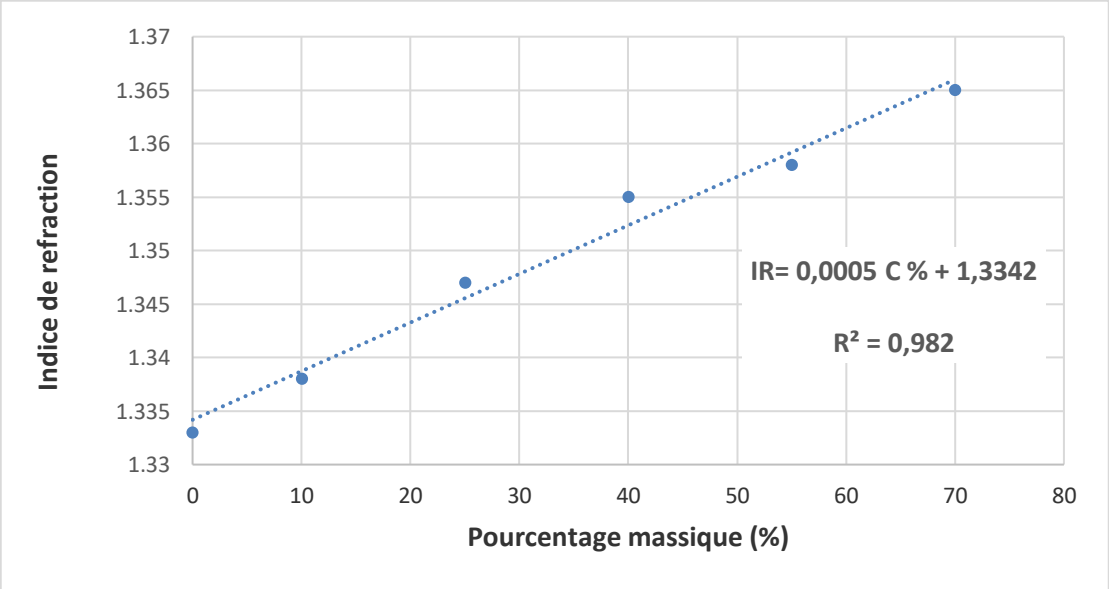

Courbe d'étalonnage destinée au dosage de glucose par spectrophotométrie

**C) Dosage de l'éthanol :**

- A partir d'un éthanol pur, préparer des solutions d'éthanol de titres massiques allant de 10% à 70% (w/w)

- Mesurer l'indice de réfraction de chaque solution en utilisant un refractomètre.

-Tracez la courbe IR en fonction du titre massique.




Courbe d'étalonnage destinée au dosage de l'éthanol par réfractométrie.