République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DR YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie
Département de Génie de Procédés
et Environnement

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de MASTER en Génie des Procédés

Option : Bio procédés pharmaceutique

Thème

Production de bioéthanol par fermentation alcoolique

Présenté par:

SALHI ABDELHAK

BOUCHHER SAADIA

Jury:

Pr. Abouseoud. M (Président)
Dr. Arbia. W (Examinateur)
Dr. Tassist. A (Promoteur)

Année universitaire: 2014/2015

Remerciements

***Dieu** merci pour la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.*

*Nous exprimons nos remerciements au **Dr. TASSIST. A**, maître de conférences au département de génie des procédés et environnement de l'université Dr. Yahia Farés de Médéa de nous avoir proposé le sujet de ce mémoire, pour la confiance qu'elle nous accordé. Nous lui exprimons notre reconnaissance pour la direction de ce travail.*

*Nous expriment notre gratitude et nos remerciements au **Pr. ABOUSEOUD. M**, professeurs au département génie des procédés et environnement à l'université de Médéa, et le responsable de la spécialité « Bioprocédés » d'avoir accepté la présidence du jury.*

*Tout le respecte et le remerciement pour Dr. **ARBIA Wassila**, maître de conférences au département de génie des procédés et environnement de l'université Dr. Yahia Farés de Médéa d'avoir accepté l'examination de notre manuscrit.*

Nous tenons à remercier sincèrement les ingénieurs du hall technologique de l'université de Médéa, principalement Mlle Fergani Radia et Mme Bouaissa nassima 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 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

Je dédie ce travail :

A mes chers et respectueux parents

Vraiment aucune dédicace ne saurait exprimer mon attachement, mon amour et mon affection, je vous offre ce modeste travail en témoignage de tous les sacrifices et l'immense tendresse dont vous m'avez toujours su me combler.

Puisse dieu tout puisant vous garder et vous procurer santé et bonheur, mon père « AMEUR »

Et ma mère « KHADIDJA »

Pour l'esprit qui a habité le spirituel mon marie « YOUCEF » et tous la famille « HADJOU »

A ma belle fille « ROUFAIDA »

A les Cœurs à le genre pur et âmes innocentes à mes basiles de ma vie (mes frères) : le persévérant » AMINE », leader « YACINE », mon poussin « YOUNES », la belle « HAYET », et la fleur « LINA ».

A mes belle soeure : HADDA, FAIROUZ,

A ma famille en témoignage de mon profond respect : A ma grande mère et mes oncles FAROUK, HAFIDA, NOURA, OMAR, AMEUR, MOUSSA, ABOUBAKER.

A tous les familles : NOUAR, BENRAMI, CHARFAOUI, CHANOUFI, FERRAH.

Je tiens à remercier tous les personnes qui travailler au laboratoire d'AIN BOUCIF surtout le chef service « CHIRIFI ABD ELKRIME » qui me donne plusieurs simplicités dans mon travail.

A tous mes amies et amis qui me sont chers, a tous ceux que j'aime et qui m'aiment : qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments les plus dévoués et mes vœux plus sincères ;

Que dieu le tout puissant vous préserve tous et vous procure sagesse et bonheur.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

La famille SALHI.

Les deux frères d'étude LICHANI ZAKARI et ROUBHI FISSA MOHAMED.

La promotion de Génie des procédés.

L'ingénieure de biologie : MARIAME AZIZI.

SALHI ABDELHAK.

الملخص :يعتبر الايثانول الحيوي كحول ايثيلي يصنع انطلاقا من مصادر نباتية و يستعمل اليوم كوقود حيوي وهو بديل للوقود الاحفوري. الهدف من هذه الدراسة هو انتاج الايثانول عن طريق التخمير الكحولي باستخدام السلالة الميكروبية خميرة الخبز, مرورا بمرحلتين أساسيتين وهما , التخمر و التقطير و جرت دراسة اثار مركبات الوسط و العوامل الفيزيائية و الكيميائية مثل سرعة الخلط. وجد ان النتائج التالية : تركيز الجلوكوز 20 جرام / لتر، تركيز كلوريد الأمونيوم 2 جرام/ لتر ، نسبة الكربون/ النيتروجين=19 ،التركيز الأولي للخميرة : 4 جرام/ لتر ، سرعة التحريك : 50دورة / الدقيقة ومدة التخمير : 46-48 ساعة هي أفضل شروط للحصول على افضل مردود من الايثانول :0.7 جرام / جرام الجلوكوز, المصدر الرئيسي للكربون والطاقة.

الكلمات الرئيسية: الإيثانول، خميرة الخبز ، التخمير.

RESUME : Le bioéthanol est un alcool éthylique produit à partir de sources végétales, utilisé actuellement comme biocarburant alternatif aux carburants fossiles. L'objectif de cette étude est la production de bioéthanol par fermentation alcoolique en batch agité en utilisant *Saccharomyces cerevisae*. Cette production se fait en deux étapes principales: la fermentation et la distillation. Les effets des composés du milieu et des agents physico-chimiques tels que l'agitation ont été étudiés. Les résultats montrent qu'une concentration en glucose de 20g /L, une concentration en chlorure d'ammonium de 2g/L, un rapport C/N= 19, un inoculum de 4g/L, une vitesse d'agitation de 50rpm ainsi qu'une durée de fermentation de 46 à 48 heures se sont avérés les meilleures conditions pour l'obtention d'un rendement maximal de 0,7g d'éthanol/g de glucose, source de carbone et d'énergie principale.

Mots clés : Bioéthanol, *Saccharomyces cerevisae,* Fermentation.

Abstract: Bioethanol is is an ethyle alcohol produced from plant sources, currently used as a biofuel alternative to fossil fuels. The objective of this study is bioethanol production by fermentation in batch stirred, using *Saccharomyces cerevisiae*. This production is done in two main steps: fermentation and distillation. The effects of medium compounds and physico-chemical agents such as agitation were studied. The results show that: a glucose concentration of 20 g/L, an ammonium chloride concentration of 2g /L, a ratio (C / N)= 19, an inoculum of 4g /L, stirring speed of 50rpm and a fermentation period of (46 to 48) hours, proved the best conditions for obtaining a maximum yield of 0.7 g of ethanol/g of glucose, the main carbon and power source.

Key words: Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Fermentation.

Sommaire :

Introduction générale ……. **01**

Partie théorique

I/Ethanol– Généralités

I-1/Définition…….. **03**

I-2/Formule……. **03**

I-3/Propriétés

I-3-1/Propriétés physico-chimiques ……. **04**

I-3-2/Propriétés comme solvant……..... **05**

I-3-3/Miscibilités avec l'eau ……..... **06**

I-4/Classification d'éthanol selon son utilisation …… **06**

II/Bioéthanol :

II-1/Historique …… **07**

II-2/Microorganisme producteur. Saccharomyces cerevisiae :…….. **08**

II-2-1/ Classification ……. **08**

II-2-2/ Morphologie et cytologie …….. **09**

II-2-3/Reproduction …….. **10**

A/Reproduction par bourgeonnement …….. **10**

B/Reproduction sexuée ……. **10**

II-2-4/Fermentation alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae*…… **12**

II-2-5/ Condition de culture de *Saccharomyces cerevisiae* ……... **12**

A/Besoins nutritionnels

- Source de carbone et énergie……..……. **13**
- L'azote……. **13**
- Source minérale……..... **13**
- Source vitaminique……..... **13**
- Facteur de croissance …….. **13**

B/Besoins physico-chimique

- L'hydratation …….. **13**
- La température……. **13**
- Le PH…….. **14**
- L'aération……. **14**

- La pression osmotique……. **14**
- La concentration en alcool…….. **14**

II-2-6/Déroulement de la fermentation alcoolique…….. **14**

II-3/Utilisation de bioéthanol

II-3-1/Utilisation historique ……. **16**

II-3-2/Carburant…… **16**

- L'incorporation directe…… **16**
- Le super éthanol E85…….. **17**
- L'ETBE…… **18**
- L'EEHV…….. **18**
- L'Estérol…….. **19**

II-3-3/Boissons alcoolisées ……..... **19**

II-3-4/Utilisation médicale ……. **20**

II-3-5/Matière première……. **20**

II-3-6/Solvant…… **20**

II-4/Le développement du bioéthanol dans le monde ……..... **20**

II-5/Avantage lies a l'utilisation du bioéthanol…… **20**

Partie expérimentale

I/ Matériel

I-1/ Equipement……... **23**

I-2/ Petits matériels et verreries……... **23**

I-3/ La levure de bière *Saccharomyces cerevisiae*……... **23**

II/ Méthode

II-1/ Essais de faisabilité……..… **23**

II-2/ Essais d'optimisations de la fermentation alcoolique **25**

II-2-1/ Effet de la concentration initiale en Source de Carbone ……. **26**

II-2-2/ Effet de la nature de la Source d'azote…… **26**

II-2-3/ Effet du rapport Carbone/Azote…….. **26**

II-2-4/ Effet de l'inoculum initial …….. **27**

II-2-5/ Effet de l'agitation ……. **27**

II-2-6/ Cinétique de croissance et de production …… **27**

II-3/ Méthode de séparation ……..... **27**
II-3-1/ Séparation de la biomasse par filtration sous vide …….. **27**
II-3-2/ Séparation de l'éthanol par distillation……. **28**
II-4/ Méthodes d'analyse ……..... **29**
II-4-1/ Etablissement de méthodes simples de dosage de l'éthanol……. **29**
II-4-2/ Dosage des sucres totaux par la Méthode de Dubois …….. **31**
II-4-3/ Évaluation de la biomasse par spectrophotométrie…… **32**
II-4-4/ Identification d'éthanol …… **33**

Résultat et discussion
I/ Essai de faisabilité ……..... **34**
II/ Essais d'optimisation …..... **36**
II-1/ Effet de la concentration initiale en source de carbone …… **36**
II-2/ Effet de la nature de la source d'azote …….. **38**
II-3 / Effet du rapport (Carbone / Azote) ……. **40**
II-4/ Effet de l'inoculum initial……. **42**
II-5/ Effet de l'agitation …… **43**
II-5-1/ En variant le rapport C/N…….. **44**
II-5-2/ En variant l'inoculum initial …… **46**
II-6/ Cinétique de croissance et de production …….. **48**
II-7/ Identification de l'éthanol ……. **51**
II-7-1/ Le Flambage…….. **51**
II-7-2/ Test au dichromate de potassium ……..... **51**
II-7-3/ Spectrophotométrie infrarouge…… **51**
Conclusion ……..... **53**

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
- **B_1 :**	- **T**hiamine
- **B6 :**	- **P**yridoxine
- **°C :**	- **D**egré **Celsius**
- **C_{Et} :**	- **C**oncentration d'éthanol (g/L)
- **Cm^{-1} :**	- **C**entimètre
C/N :	- **Rapport Carbone/A**zote
- **CPG :**	- **C**hromatographie **en phase** gaz**euse**
- **DO :**	- Densité optique
- **E :**	- **E**nergie
- **E85 :**	- **S**uper éthanol
- **FTIR :**	- **Spectroscopie** infrarouge
- **H :**	- **H**eure
- **IR :**	- **I**ndice de réfraction
- **M** :	- **la masse** molaire (g/mol)
- **m_{Et} :**	- **M**asse d**e l'**éthanol(g)
- **m_D :**	- **Masse du** distillat(g)
- **nm**	- nanomètre
- **T** :	- **T**empérature (°C)
- **P :**	- **P**roduit (g)
- **Pa :**	- **P**ression atmosphérique
- **PH :**	- **potentiel d'hydrogène**
- **rpm :**	- **Rotation** par minute
- **S :**	- **S**ubstrat(g)
- **S .C :**	- *Saccharomyces cerevisiea*
- **S_N1 :**	- **S**ubstitutions nucléophiles
- **t** :	- **T**emps
- **T% :**	- **Titre** massique **(g/g)**
- **UV**	- Ultra violet
- **V**	- **V**olume (L)
- **Y(P/S) :**	- **R**endement en éthanol(g/g)
- **% Vol**	- **F**raction volumique
- **« ° » :**	- **D**egré
- **µm :**	- micromètre
- **ρ :**	- **M**asse volumique (g/L)

Liste des tableaux

Tableau 01 : Propriétés physico-chimiques principales de l'éthanol……..…….…… **04**

Tableau 02 : Bilan de l'essai de faisabilité par réfractométrie……. **34**

Tableau 03 : Bilan de l'essai de faisabilité par mesure de la densité…… **35**

Tableau 04 : Conditions opératoires ainsi que les résultats trouvés par quelques auteurs……..… **50**

Liste des figures :

Figure 01 : Formule chimique de l'éthanol……..... **03**

Figure 02 : Morphologie de ***Saccharomyces cerevisiae*** au MEB…… **09**

Figure 03 : Structure cellulaire de levure……..... **10**

Figure 04 : Reproduction par bourgeonnement……..... **11**

Figure 05 : Cycle de reproduction de la levure……..… **11**

Figure 06 : Fermentation alcoolique chez ***Saccharomyces cerevisiae***……..... **12**

Figure 07 : Distributions du super éthanol E85 en France (Aout 2008)...…… **17**

Figure 08 : Consommation du bioéthanol en France (comparaison entre l'essence et le bioéthanol)……..... **18**

Figure 09 : Production d'éthanol en 2007 : répartition dans le monde……..... **21**

Figure 10 : Essais de faisabilité, procédée générale……..... **24**

Figure 11 : Séparation de la biomasse. (A): Montage de la filtration sous vide, (B) : Membrane de (47mm 0 ,45µm) après filtration……... **28**

Figure 12 : Montage de la distillation simple……. **28**

Figure 13 : Courbe d'étalonnage destinée au dosage de l'éthanol par réfractométrie……..... **29**

Figure 14 : Courbe d'étalonnage destinée de l'éthanol par mesure de la masse volumique….. **30**

Figure 15: Courbe d'étalonnage destinée au dosage de glucose par spectrométrie……... **31**

Figure 16: Courbe d'étalonnage destinée à l'évaluation de la biomasse……...… **32**

Figure 17: Teneures en biomasses enregistrées à chaque concentration initiale en glucose par spectrophotométrie et par mesure de la biomasse sèche……..... **36**

Figure 18: Bilan des fermentations aux différentes concentrations initiales en glucose: variations du pH, sucres consommés avec la biomasse seche. ……... **37**

Figure 19: Effet de la concentration initiale de glucose sur le rendement de production de l'éthanol……..... **38**

Figure 20: Teneurs en biomasses enregistrées pour chaque source d'azote……. **39**

Figure 21: Bilan des fermentations pour les différentes sources d'azote : pH final, concentration en sucres consommés et la biomasse seche……...… **40**

Figure 22: Effet de la nature de la source d'azote sur le rendement de production de l'éthanol…… **40**

Figure 23 : Données enregistrées des fermentations aux différentes concentrations de NH_4CL (Biomasse, Glucose consommé et concentration de l'éthanol produit)….. **41**

Figure 24 : Effet de la concentration en NH_4CL sur le rendement de production de l'éthanol……..……... **42**

Figure25 : Données enregistrées des fermentations aux différentes concentrations de l'inoculum (Biomasse sèche, Glucose consommé et concentration de l'éthanol produit)…….…… **43**

Figure 26 : Effet de la concentration de l'inoculum sur le rendement de production de l'éthanol……. **44**

Figure 27 : Effet de l'agitation sur la teneur en biomasse, la consommation du glucose, la concentration en éthanol et sur le rendement aux différentes concentrations de NH_4Cl……..……. **45**

Figure 28 : Effet de l'agitation sur la teneur en biomasse, la consommation du glucose, la concentration en éthanol et sur le rendement en fonction de taille de l'inoculum……..…….. **47**

Figure 29 : Cinétique de la fermentation dans les conditions optimale……..…….. **48**

Figure 30 : La flamme bleue de l'éthanol…….. **51**

Figure 31 : Résultat de la révélation au dichromate de potassium……. **51**

Figure 32 : Spectre de l'éthanol à 97%..... **52**

Figure 33 : Spectre du distillat……..……. **52**

Introduction Général

Introduction générale

La population mondiale ainsi que l'industrialisation sont actuellement en développement continu, ce qui augmente la demande en énergie. En parallèle, le cout des ressources énergétiques naturelles (pétrole et gaz) est de plus en plus élevé à cause de l'épuisement des réserves mondiales disponibles ***(Tesfaw. A et Assefa. F, 2014)***.

Le développement des technologies et des systèmes énergétiques durables pour le secteur de transports devient donc une priorité afin de diminuer la dépendance au pétrole et aux produits pétroliers et de réduire la pollution de l'environnement. Dans cet objectif, divers pays ont donc montré l´intérêt du développement de la production et de l´utilisation du bioéthanol. Outre de chercher à satisfaire leurs propres besoins énergétiques leur but est, dans beaucoup de cas, de participer à constituer un marché mondial pour ce biocarburant. Là également, l'idée d'utiliser ce liquide comme carburant n'est pas nouvelle. Henry Ford, au début du XXème siècle, avait imaginé utiliser de l'éthanol pour alimenter ses légendaires « Ford T ».

Bien que notre pays est l'un des producteurs du pétrole et du gaz naturel, ne nous sommes pas à l'abri de la crise mondiale qui peut s'installer avec l'épuisement totale de nos ressources naturelles. C'est la raison pour laquelle il faut penser réellement aux énergies renouvelables. Le bioéthanol est un exemple très intéressant de ces types d'énergies, car il est issu de la fermentation et la distillation des différentes matières premières végétales et leurs déchets (Canne à sucre, le maïs, les céréales, les dattes, les matières ligno-cellulosiques : bois et herbes). La production de ce biocarburant permet donc de réduire la pollution et ne dépond pas des conditions climatiques.

L'objectif de notre travail consiste à la production du bioéthanol par fermentation alcoolique à l'aide d'un champignon unicellulaire du type *Saccharomyces cerevisiae.* Nous nous somme intéressé à la détermination des conditions optimales qui permettent de donner un rendement maximale de production. Les principaux paramètres étudiés sont:

- La concentration en source de carbone,
- La nature de la source d'azote,
- Le rapport Carbone / Azote,
- La grandeur de l'inoculum initial,
- L'agitation.

A la fin de notre étude, nous avons réalisé une cinétique de croissance et de production dans les conditions optimisées afin de fixer la durée réelle de la fermentation. Le Bioéthanol produit a été révélé et analysé par spectrophotométrie infrarouge.

Notre manuscrit est composé de deux parties :

- une partie bibliographique où sont présentées des notions sur le bioéthanol (généralités, propriétés et usage), sur *Saccharomyces cerevisiae* (Classification, cycle de vie, métabolisme et son application dans l'industrie…).
- une partie expérimentale qui comporte deux volets. Dans le premier volet, nous avons présenté le matériel utilisé, les conditions expérimentales ainsi que les différentes méthodes d'analyse de notre étude. Le second volet est consacré à l'interprétation et la discussion des résultats obtenus.

Partie théorique

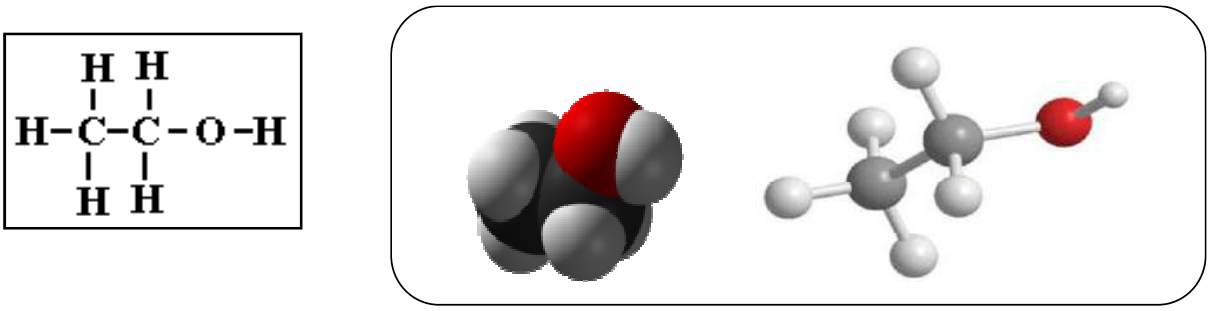
I/ Ethanol : Généralités :

I-1/ Définition :

Éthanol est le nom systématique défini par la nomenclature des composés organiques pour une molécule avec deux atomes de carbone (préfixe éthe-) ayant une liaison simple entre eux (suffixe -ane) et attachés à un groupe hydroxyle(suffixe –ol) ***(moss G.P.al 1996)***.

I-2/ Formule (Figure 1):

L'éthanol est un alcool primaire à deux carbones de formule brute C_2H_6OH et de formule semi-développée CH_3CH_2OH ou CH_3-CH_2-OH, indiquant que le carbone du groupe méthyle (CH_3-) est attaché au groupement méthylène (-CH_2-) lui même attaché au groupement hydroxyle (-OH). C'est un isomère de constitution de l'éthanol méthylique. L'éthanol est usuellement désigné par l'abréviation « Et OH », le groupement éthyle (C_2H_5-) étant communément abrégé « Et » en chimie organique ***((moss G.P.al 1996).)*** **(Figure 1)**.



M=48g/mol, d=0.795, Energie content : E=26.8 MJ/kg, Température d'ébullition : T=78C°

Figure 1 : Formule chimique de l'éthanol *(moss G.P.al 1996)*.

I-3/ Propriétés :

Le **tableau 1** résume les propriétés principales de l'éthanol

Tableau 01: Propriétés physicochimiques principales de l'éthanol.

(Pohorecky. L. A et Brick. J, 1988; L'arpent et al, 1992)

Propriétés physiques	T° fusion	117 °C[1]
	T° ébullition	79 °C[1]
	Solubilité	Solubilité dans l'eau : miscible, elle est complète dans les solvants polaires et apolaires (acétone, éther di éthylique).
	T° d'auto-inflammation	423 à 425 °C; 363 °C (selon les sources)
	Point d'éclair	coupelle fermée : 13 °C pur 17 °C 95 %vol. 21 °C 70 %vol. 49 °C 10 %vol. 62 °C 5 %vol
	Viscosité dynamique	$1{,}20\times10^{-3}$ Pas à 20 °C
Thermochimie	$S^0_{liquide,\ 1\ bar}$	159,86 $J\cdot mol^{-1}\cdot K$
	$\Delta_f H^0_{gaz}$	-235,3 $kJ\cdot mol^{-1}$
	$\Delta_f H^0_{liquide}$	-77,0 $kJ\cdot mol^{-1}$
	C_p	111 $J\cdot K^{-1}\cdot mol^{-1}$
Propriétés optiques	Indice de réfraction	n_D^{25} 1,3594
Propriétés chimiques	Formule brute	C_2H_6O [Isomères]
	Diamètre moléculaire	0,469 nm
	Moment dipolaire	1,66 D
	Masse molaire[4]	46,0684 ± 0,0023 g/mol C 52,14 %, H 13,13 %, O 34,73 %,

I-3-1/Propriété physico-chimiques (Tableau 1):

L'éthanol est un liquide volatil, incolore et qui a une odeur. Sa combustion est sans fumée et donne une flamme bleutée. Les propriétés physico-chimiques de l'éthanol proviennent principalement de la présence du groupement hydroxyle et de la courte chaîne carbonée. Le groupement hydroxyle peut former des liaisons hydrogène, rendant l'éthanol plus visqueux et moins volatil que des solvants organiques de masses moléculaires équivalentes. L'indice de réfraction de l'éthanol est légèrement plus élevé que l'eau (1,3594 à 25,0 °C). Le point triple de l'éthanol est observé à -123,15°C pour une pression de $4{,}3\times10^{-4}$ Pa ***(Reinhardt et Welton. T, 2010)***.

I-3-2/Propriétés comme solvant (Tableau 1)

L'éthanol est miscible avec de nombreux solvants organiques, comme les solvants chlorés (tétrachlorure de carbone, chloroforme, trichloroéthane, tétrachloroéthylène), les hydrocarbures aliphatiques (pentane, hexane), les solvants aromatiques (benzène, toluène, pyridine), l'acide acétique, l'acétone, l'éther diéthylique, l'éthylène glycol ou encore le nitrométhane. Néanmoins la miscibilité de l'éthanol avec les hydrocarbures aliphatiques tend à diminuer avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée de l'alcane et la diminution de la température, la limite de miscibilité étant par exemple de 13°C pour le dodécane ***(Dahlmannet et Schneider. G.M, 1989)***.

Du fait de la nature polaire du groupement hydroxyle, l'éthanol peut aussi dissoudre des composés ioniques, comme les hydroxydes de sodium et de potassium, les chlorures de magnésium, de calcium et d'ammonium ou encore les bromures d'ammonium et de sodium. Les chlorures de sodium et de potassium ne sont que légèrement solubles dans l'éthanol ***(Windholz. M, 1979)***.

La partie apolaire de l'éthanol lui permet de dissoudre des substances hydrophobes, et notamment des huiles essentielles et de nombreux composés odorants, colorants et médicinaux ***(Windholz. M, 1979)***.

L'éthanol peut être utilisé comme solvant dans de nombreuses réactions chimiques lors des synthèses, comme dans les substitutions nucléophiles S_N1, lors des hydrogénations catalytiques, lors des réactions d'alcoolisation, lors des réactions de Wittig, lors des réactions de Diels-Alder ou lors de réactions de diazotation ***(Reinhardt et Welton. T, 2010)***.

I-3-3/Miscibilité avec l'eau (Tableau 1) *(Logsdon. J. E, Kirk. O, 2004)*:

Les mélanges eau-éthanol occupent un volume inférieur à la somme des volumes des deux composants pris individuellement. Le mélange d'un volume d'eau et d'un volume d'éthanol donne par exemple un volume équivalent de 1,92. La réaction de mélange de l'eau et de l'éthanol est exothermique et peut libérer à 24,85 °C jusqu'à 777 J· mol^{-1}. Le caractère polaire de l'éthanol le rend hygroscopique, à tel point que pur il absorbe l'humidité de l'air.

Un azéotrope se forme avec l'eau à 89,47 % mol d'éthanol et 10,53 % mol d'eau à pression atmosphérique. Le point d'ébullition de l'éthanol est de 78,4°C et de 100 °C pour l'eau, mais l'azéotrope bout lui à 78,2 °C, ce qui est inférieur aux points d'ébullition de chacun des constituants. Les proportions du mélange azéotropique varient en fonction de la température et de la pression.

L'ajout de quelques pour cent d'éthanol dans l'eau diminue de façon drastique la tension superficielle de l'eau. Cette propriété permet d'expliquer le phénomène des larmes de vin. Lorsque l'on fait tournoyer le vin dans un verre, l'éthanol s'évapore plus rapidement dans le film mince le long des parois du verre. La proportion d'éthanol diminue, donc la tension de surface augmente et le film se transforme en gouttelettes. Ce phénomène est appelé effet Marangoni, et a été décrit et expliqué en 1855 par James Thomson.

Le titre alcoométrique volumique, aussi appelé degré alcoolique, est le rapport entre le volume d'alcool contenu dans le mélange et le volume total de ce mélange à 20 °C. On l'utilise pour déterminer la proportion d'alcool, c'est-à-dire d'éthanol, dans une boisson alcoolisée. L'unité utilisée pour exprimer le titre est la fraction volumique (% vol) ou degré (noté « ° »).

Les mélanges eau-éthanol contenant plus de 50 % d'éthanol sont inflammables à température ambiante, mais en chauffant un mélange contenant moins de 50 % d'éthanol peut s'enflammer. La technique de flambage en cuisine fait appel à cette propriété. L'alcool ajouté dans une poêle chaude se consume en flammes et donne une réaction complexe. La température de l'alcool qui brûle peut alors dépasser les 240 °C et conduit à la caramélisation des sucres présents.

I-4/Classification d'éthanol selon son utilisation *(Pohorecky. L.A, Brick. J, 1988)*:

Différentes qualités d'éthanol sont disponibles pour différents emplois :

- **l'alcool dénaturé *:*** est généralement de l'éthanol auquel est ajouté un dénaturant pour rendre le mélange impropre à la consommation alimentaire. Les dénaturants utilisés peuvent être le méthanol, le diéthylphtalate, le thiophène, le diéthyléther ou encore des

condensats de gaz naturels. Il est utilisé pour l'entretien ménager, le nettoyage, la désinfection et dans les réchauds à alcool.

- **l'alcool à brûler *:*** est un mélange composé d'éthanol et de méthanol. L'alcool à brûler est hautement toxique du fait de la présence de méthanol (en général 5 à 10 %vol). Il est utilisé pour nettoyer les vitres et les surfaces plastiques.

- **l'alcool rectifié *:*** est un distillat titrant de 70 à 96 %vol d'éthanol grâce au procédé de distillation fractionnée. La concentration maximale qui puisse être obtenue par distillation d'alcool brut est de 96 %vol du fait de la formation d'un azéotrope eau-éthanol. Il est utilisé pour la réalisation de liqueurs ou de vodka, mais également pour l'entretien ménager, le nettoyage, ou la désinfection.

- **L'alcool absolu** : est de l'éthanol pur, contenant un minimum d'eau allant d'un pour cent à quelques ppm. Il est employé comme solvant pour des applications dans les laboratoires et dans l'industrie, et comme combustible.

II/ Bioéthanol :

II-1/ Historique :

La fermentation des sucres en éthanol est l'une des plus anciennes biotechnologies employée par l'homme et a été utilisée depuis la Préhistoire pour obtenir des boissons alcoolisées. Des analyses chimiques de composés organiques absorbés dans des jarres datant du Néolithique trouvées dans un village de la province du Henan en Chine, ont révélé que des mélanges de boissons fermentées composés de riz, de miel et de fruits étaient produits dès le VIIe millénaire av. J.-C ***(Mc Govern. P. E, Zhang. J, 2004)***.

Bien que la distillation soit une technique bien connue dès le début de la Grèce antique, les premières traces écrites de production d'alcool à partir du vin ne remontent qu'au XIIe siècle avec les travaux des alchimistes de l'école de médecine de Salerne ***(Revuz. B.M., 1979)***. La première mention de la distinction entre alcool absolu et les mélanges eau-alcool est rapportée au XIIIe siècle par Raymond Lulle ***(Forbes. R. J, 1970)***.

En 1796, Johann Tobias Lowitz obtient de l'éthanol pur en filtrant sur du charbon actif de l'éthanol distillé. Antoine Lavoisier détermine que l'éthanol est composé de carbone, d'oxygène et d'hydrogène, et en 1808, Nicolas Théodore de Saussure détermine sa formule brute ***(Site 2 : Encyclopédia Britannica, 1911)***.

L'éthanol est pour la première fois préparé de façon synthétique en 1826 par les travaux indépendants de Georges Scrollas en France et de Henry Hennel au Royaume-Uni ***(Hennell. H, 1826)***.

En 1828, Michael Faraday synthétise de l'éthanol par l'hydratation en catalyse acide de l'éthylène, une synthèse similaire au procédé industriel utilisé de nos jours.

En1858, Archibald Scott Couper publie la structure chimique de l'éthanol, qui est l'une des premières structures déterminées ***(Couper. A.S., 1858)***.

L'éthanol a aussi été utilisé comme combustible dans les lampes, et comme carburant pour les automobiles dans les années 1930. Par exemple, la Ford T pouvait fonctionner jusqu'en 1908 avec de l'éthanol pur ***(Di Prado. J, 2012 ; Hunt. V. D, 1981)***.

II-2/ Microorganisme producteur : *Saccharomyces cerevisiae:*

C'est une levure utilisées depuis la Haute Antiquité par les Egyptiens, les Babyloniens, mais également les Celtes l'utilisaient pour la fabrication de boissons fermentées, du pain, du kéfir, du vin et de la bière. Elle a été découverte, isolée et identifiée au milieu du XIX^{e} siècle par des brasseurs hollandais à la demande des boulangers parisiens qui commençaient à industrialiser leur production et cherchaient, pour faire leur pain, un procédé de fermentation plus fiable et plus rapide que leur levain traditionnel. Ainsi, dans ces domaines, elle est appelée « levure de boulanger » ou « levure de bière ». Enfin, dû à son mode de reproduction, elle est également nommée « levure à bourgeon » (ou « levure bourgeonnante », budding yeast en anglais). L'addition de *Saccharomyces cerevisiae* est admise comme levure de panification par le Décret n°93-1074 en France **(*Site 4: wikipidia, 2011)***.

II-2-1/ Classification :

La classification de ***S. cerevisiae*** est la suivante ***(Larpent. G et Sanglier. J., 1992)*:**

Règne	**Protiste**
Embranchement	**Eucaryote**
Classe	**Ascomycètes**
Sous classe	**Hem ascomycètes**
Ordre	**Endomycetales.**
Famille	**Saccharomyce taceae.**
Sous famille	**Saccharomycetoideae.**
Genre	**Saccharomyces.**
Espèce	***Saccharomyces cerevisiae.***

II-2-2/ Morphologie et Cytologie :

S. cerevisiae est une cellule sphérique, ovoïde ou allongée d'une taille très variable (3-10 µm à 4-14µm), certaines cellules sont cylindriques et de grandes tailles jusqu'à 20 µm de longueur ou plus ***(Larpent J.P, 1991)*** **(Figure 2)**.

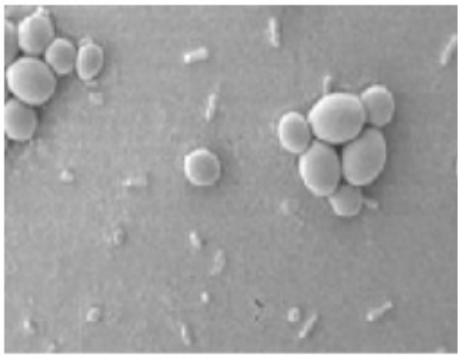


Figure 02 : Morphologie de *Saccharomyces cerevisiae* au MEB *(Revuz. B.M, 1979)*.

Les cellules observées au microscope sont unicellulaires avec ***(Boze. H et al, 2008)*** **(Figure 3) :**

- **Une paroi cellulaire** externe qui protège la cellule de certaines agressions du milieu extérieur et permet la conservation.
- **Une membrane cellulaire** qui double la paroi cellulaire intérieurement et qui joue un rôle prépondérant dans les échanges de la cellule avec le milieu extérieur. La membrane cellulaire n'est pas continue car des pores, à certains endroits contrôlent les entrées et les sorties. Le transport est assuré par des enzymes de type perméases.
- **Le cytoplasme** qui est le constituant intérieur de la cellule. Il renferme en suspension des éléments qui assurent la transformation des aliments : enzymes telles l'invertase, la maltase, des protéases…etc. La transformation-production est assurée par une chaîne métabolique de départ « la glycolyse » se déroulant dans le cytoplasme. On y trouve aussi des vacuoles contenant des réserves de tréhalose et des mitochondries qui sont les centres de respiration de la cellule et aussi des ribosomes qui assurent la synthèse des protéines.
- **le noyau** qui organise rigoureusement l'activité générale de la cellule. Il contient l'ADN, qui porte les gènes caractérisant précisément les qualités spécifiques d'une levure par rapport à une autre. C'est par ce noyau qu'est assurée la reproduction de la cellule. Les levures sont des organismes eucaryotes. Le noyau des cellules contient 16 chromosomes linéaires.

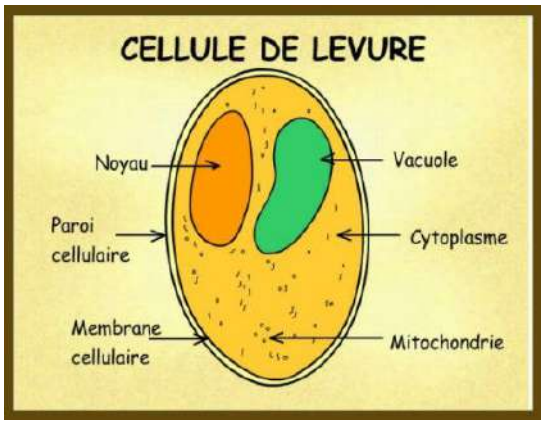


Figure 03: Structure cellulaire de la levure *(Boze H et al, 2008)*.

II-2-3/ Reproduction :

La reproduction végétative se fait généralement par bourgeonnement. Dans certaines conditions de culture, les levures peuvent se reproduire par voie sexuée ***(Bourgeois .C.M et Levreau. J.Y, 1991)***.

***A/* Reproduction par bourgeonnement**

Dans les cuves de fermentation, la multiplication de la levure se fait par bourgeonnement (reproduction asexuée). Les constituants de la cellule se dédoublent pour former un bourgeon qui augmente progressivement de volume. Le noyau se divise et le noyau fils migre dans l'excroissance (bourgeon). Le bourgeon arrivé à maturité se détache. Ainsi d'une cellule initiale, il résulte deux cellules identiques. A leur tour, chacune des deux cellules génère d'autres cellules et ainsi de suite, tant que les conditions du milieu restent satisfaisantes **(Figure 4)**.

***B/* Reproduction sexuée :**

Dans d'autres conditions, la cellule de levure forme des spores haploïdes. Après différenciation et méiose un asque à 4 ascospores haploïdes se forme **(Figure 5)**.Les spores sont très résistantes et peuvent être considérées comme des formes de survie de la levure (on a découvert des spores intactes, dans la banquise polaire, dont l'origine pourrait remonter au-delà de 100.000 années). Lorsque les conditions du milieu redeviennent favorables, les spores fusionnent et reconstituent la cellule **(Figure 5)**.

Les levuriers mettent à profit ces deux modes de reproduction pour la fabrication de la levure et la création de nouvelles souches plus élaborées ***(Oteng- Gyang. K, 1984)***.

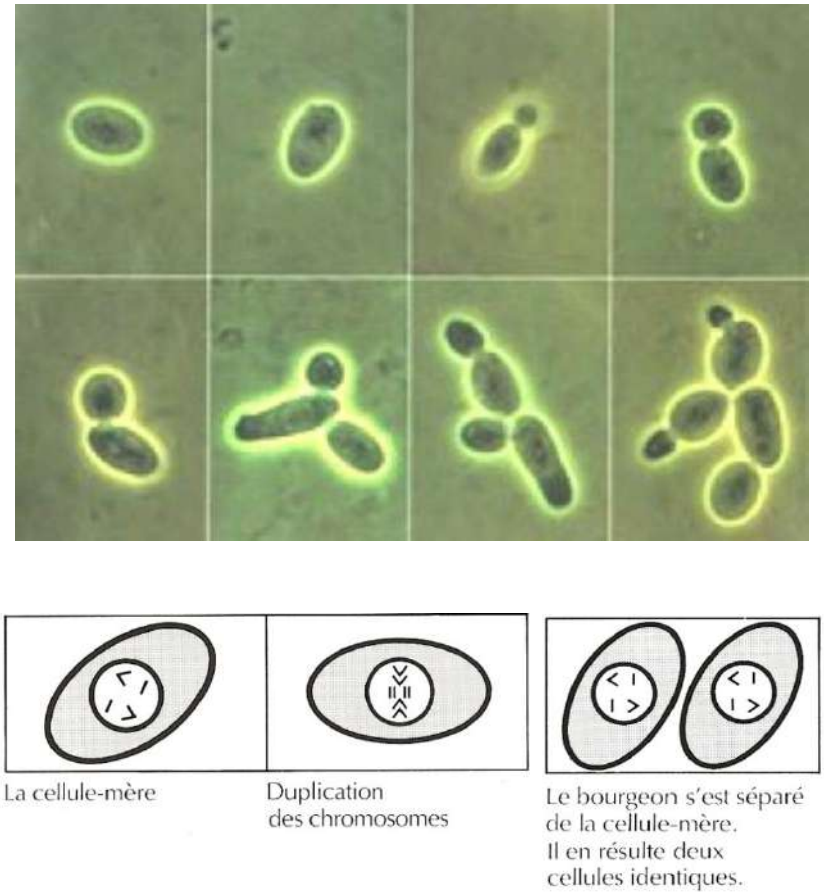


Figure 04 : Reproduction par bourgeonnement ***(Leclerc. H et al, 1995)*****.**

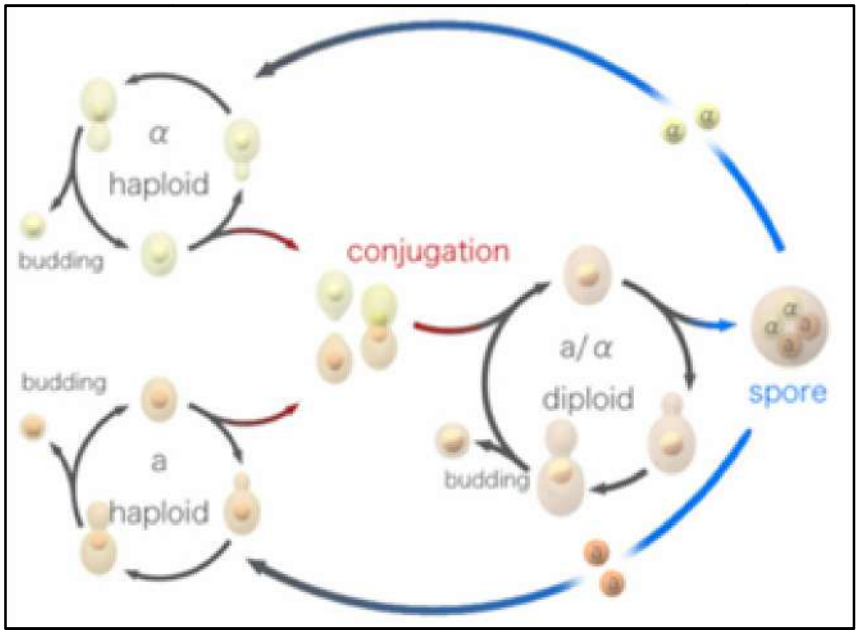


Figure 05: Cycle de reproduction de la levure ***(moss G.P.al 1996)***.

I-2-4/ Fermentation alcoolique chez *S. cerevisiae*: (Figure 6) *(Bai. F.W et al, 2008)*:

Beaucoup de travaux scientifiques ont étudié la fermentation alcoolique chez *S. cerevisiae.* La voie métabolique principale impliquée est la glycolyse , par laquelle une molécule de glucose est métabolisée, et deux molécules de pyruvate sont produites. Ces dernières sont encore réduites en éthanol avec le dégagement de CO_2 **(Figure 6)**.

Le glucose est facilement transformé en éthanol par la levure *S. cerevisiae*. Actuellement, aucun autre micro-organisme n'atteint ses performances sur glucose en conditions non stériles. Théoriquement, le rendement est 0.511 pour l'éthanol et 0.489 pour CO_2 sur une base de masse de glucose métabolisé. Deux molécules d'ATP produite dans la glycolyse sont utilisées pour piloter la biosynthèse des cellules de levure. Par conséquent, la production d'éthanol est étroitement associée à la croissance des cellules de levure, ce qui signifie que la levure doit être produite comme un coproduit.

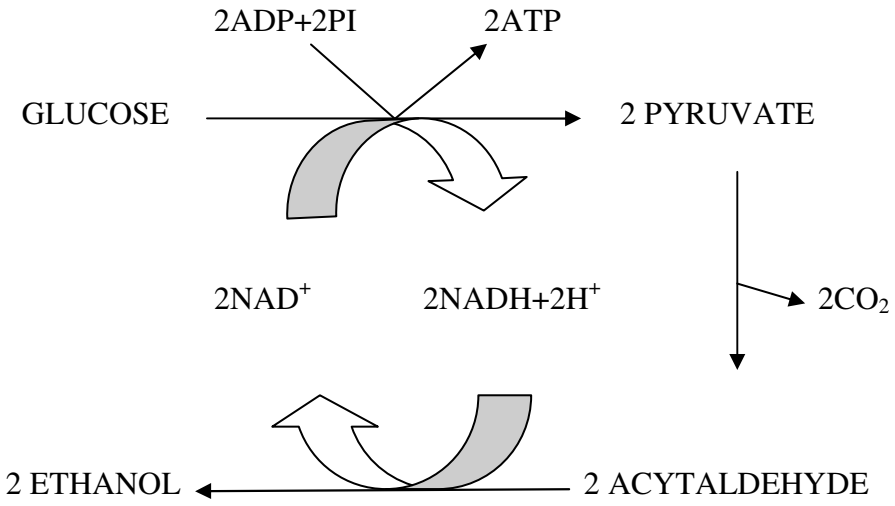


Figure 06 : Fermentation alcoolique chez *S. cerevisiae* (Wiertz. J. L, 2010)

II-2-5/ Conditions de culture de *Saccharomyces cerevisiae*:

La croissance d'un micro-organisme peut être considérée comme une série d'interaction entre les cellules et l'environnement pour cela le milieu de culture doit apporter tous les éléments nécessaires aux systèmes cellulaires et aux besoins énergétiques de la levure.

A/ Besoins nutritionnels*:*

Source de carbone et énergie : *Saccharomyces cerevisiae* est une espèce hétérotrophe. Elle exige pour sa croissance une source de carbone qui est également sa source d'énergie.

L'azote* :** quantitativement c'est le deuxième constituant apporté par le milieu de culture, il est utilisé par les cellules pour la constitution des acides aminés, des nucléotides et certaine vitamines. A coté des sources organiques de l'azote (acides aminés, peptides, amines, pyrimidines et purines), la levure est capable d'assimiler l'azote et le soufre minérales, ***S .cerevisiae assimile plus aisément les ions d'ammonium ***(Larpent .J P, 1990)***.

Source minérale : *S. cerevisiae* a besoin aussi du phosphore, du potassium, du magnésium et du calcium, des oligo-éléments (Fe, Na, Cu,..) sont nécessaire mais à l'état de trace

Source vitaminique (Facteurs de croissance) : l'apport des vitamines est indispensable pour assurer une bonne croissance, ses besoins sont surtout en thiamine (B1), biotine (H) et en pyridoxine (B6) ***(Sofiane-Khalil. S et Benhadj-Tahar. B, 1998)***.

B/ Besoins physico-chimiques :

L' hydratation: L'eau facilite l'activité de la levure en améliorant la mobilité des cellules de levure, en dissolvant les constituants fermentescibles et en assurant le contact entre les enzymes et les substrats ***(Revuz. B.M, 1979)***.

La température : L'augmentation de la température, jusqu'à 40°C accélère la fermentation des sucres par la levure. A partir de 50°C (début de la cuisson du pain), l'inactivation des levures commence. En boulangerie française, on considère que la température optimale de fermentation se situe aux environs de 27°C, permettant un compromis entre la vitesse de fermentation (production de gaz) et la qualité technologique des pates (texture). Aux températures basses, proches de 0°C, l'activité est quasiment nulle. La levure se conserve en congélation, à condition que la congélation soit rapide (surgélation). Une partie des levures congelées dans un produit de panification est cependant détruite en congélation (déshydratation létale des cellules par osmose : la concentration (donc la pression osmotique) du milieu hydraté et cristallisé augmente et l'eau migre de l'intérieur de la cellule a l'extérieur) ***(Larpent .J P, 1990).***

Le pH : *S. cerevisiae* représente l'avantage de croitre sur un milieu acide, dans lequel la plupart des bactéries ne se développent pas. Elle préfère un pH compris entre 4 et 4,5 ***(Noui. Y, 2001)***.

L'aération: la levure s'adapte à deux modes de vie en présence ou en absence d'oxygène. Dans un fermenteur, il est nécessaire d'apporter l'oxygène sous forme d'air filtré. Le mode aérobie est employé pour éviter la production de certains métabolites qui minimisent la production de biomasse ***(Noui. Y, 2001)***.

La pression osmotique: la levure *S. cerevisiae* est considérée parmi les levures qui tolèrent des pressions osmotiques élevées mais avec un métabolisme lent .Le sel et les sucres augmentent la pression osmotique et modifient (diminuent) de ce fait l'activité cellulaire. Cette augmentation de la pression osmotique conduit à la diffusion de l'eau intracellulaire vers l'extérieur de la cellule, donc à une déshydratation. Les sucres cependant à des doses inferieures à 10% activent la fermentation .D'autre part, la dissociation du sel dans l'eau (sous forme ionique) contribue à diminuer les activités enzymatiques, donc le fonctionnement de la levure ***(Bourgeois .C.M et Levreau. J.Y, 1991)***.

La concentration en alcool : *l*'augmentation de la concentration en alcool au cours de la fermentation freine progressivement l'activité des levures ***(Bourgeois .C.M et Levreau. J.Y, 1991)***.

II-2-6/ Déroulement de la fermentation alcoolique :

Dans des conditions standards de vinification, en phase liquide, avec ensemencement par une souche commerciale et régulation de la température à une valeur constante, la fermentation alcoolique peut être divisée en trois phases :

Phase de latence :

La phase de latence, qui a lieu en début de la fermentation, correspond à la saturation progressive du milieu en gaz carbonique (environ 1,5 g/L de CO2). A la fin de cette phase, lorsque le gaz carbonique (CO_2) commence à se dégager, la biomasse atteint environ 10^7cellules/ml, ce qui correspond à 2-3 générations dans les conditions habituelles d'ensemencement. Pendant cette phase, la composition du milieu est très peu modifiée, à l'exception de la consommation de la thiamine. En effet, ***Bataillon. M et al, 1996*** ont montré que, dans un moût inoculé à 10^6cellules/ml, la thiamine est épuisée en quelques heures. La

durée de la phase de latence peut varier de quelques heures à plusieurs jours. Elle est surtout fonction de la température, du taux d'inoculation et de la présence d'inhibiteurs, principalement le dioxyde de soufre (SO_2).

Phase de croissance

La phase de croissance dure jusqu'à l'obtention de la population maximale, soit généralement jusqu'à 20 à 30 % de la fermentation. C'est à la fin de cette phase qu'est atteinte la vitesse maximale de fermentation. C'est donc à cet instant que le dégagement de CO_2 ainsi que les besoins en refroidissement pour réguler la température de fermentation, sont maximums. Par contre, c'est dès le début de la phase de croissance qu'est atteint le maximum de la vitesse spécifique de la fermentation. La population atteinte est très variable suivant les moûts. D'après ***Belyï et al, 1990*****,** elle est comprise entre 50 et 250×10^6 cellules/ml. Dans la plupart des cas, la multiplication cellulaire prend fin suite à l'épuisement du moût en azote assimilable. De nombreux auteurs, notamment ***Hanschke. PA et Jiranek. V, 1993*** ont étudié l'assimilation de l'azote et montré la complexité du transport des différentes sources d'azote assimilable (principalement acides aminés et azote ammoniacal) à l'intérieur des levures. On peut cependant retenir que l'azote ammoniacal est assimilé rapidement et en même temps que les acides aminés. A noter que cette consommation d'azote conduit à une baisse du pH qui atteint sa valeur minimum à la fin de la phase de croissance.

Phase stationnaire

Pendant cette phase, les levures ne se multiplient plus et leur activité diminue régulièrement même si leur viabilité reste généralement supérieure à 80-90 %. Cette baisse d'activité correspond à une diminution régulière de la vitesse de transport des sucres ***(Salmon .J.M et al, 1993)***. Plusieurs mécanismes d'inhibition sont impliqués, mettant en jeu les acides gras à moyenne chaîne, les toxines killer, etc., mais c'est l'éthanol qui joue le rôle essentiel. ***Ansanay Galéote. V et al, 2001*** ont étudié l'effet d'additions d'éthanol pendant la phase stationnaire et ont montré que, pour les souches commerciales, il y avait généralement une corrélation directe entre la concentration en éthanol dans le milieu et la vitesse de la fermentation.

Tout au long de la phase stationnaire, la taille des levures augmente et donc leur poids sec, principalement à cause de la synthèse de tréhalose et glycogène. Le glycogène peut être considéré comme un sucre de réserve ***(Parrou . J.L et al. 1999)*** alors que le tréhalose joue un rôle plus complexe. Il est impliqué dans les mécanismes de réponse au stress, de résistance à

la pression osmotique (qui atteint plus de 2000 mOMS/kg selon **Roustan. J.L et Sablayrolles. J.M, 2004)** mais aussi dans la régulation de la glycolyse ***(Novo. M.T et al. 2003)***. Les fermentations « languissantes » et les arrêts de fermentation sont caractérisés par de très faibles vitesses finales causées par une forte mortalité des levures. ***Insa. G et al, 1995*** considèrent qu'il est important de les distinguer des fermentations « lentes » dont la vitesse est faible tout au long de la phase stationnaire mais pendant lesquelles la viabilité reste bonne.

II-3/ Utilisation du bioéthanol:

II-3-1/ Utilisations historiques:

Avant le développement des médecines modernes, le bioéthanol était utilisé pour différents usages médicaux, et il était notamment employé pour le traitement de la dépression et comme anesthésique . Il est aussi connu comme pouvant servir de sérum de vérité ***(Shvets. Y. B, 1995)***.

Comme carburant, il a été utilisé dans les moteurs de fusée combiné à de l'oxygène liquide. Durant la Seconde Guerre mondiale, la roquette « V2 » allemande utilisait de l'éthanol mélangé à 25 %vol d'eau pour diminuer la température de la chambre de combustion ***(Site 1, 2012)***. Le missile balistique « PGM-11 Restons » américain, inspiré par la conception du V2 allemand, utilisait lui aussi de l'éthanol mélangé à de l'oxygène liquide ***(Site 5, 2012)***. Les carburants à base d'alcool pour les fusées et les missiles sont par la suite tombés en désuétude alors que de nouveaux carburants étaient développés ***(Site 5, 2012)***.

II-3-2/ Carburant :

L'éthanol produit dans le monde est principalement utilisé comme carburant. La quantité d'éthanol peut varier de quelques pour cent dans l'essence en Europe de l'Ouest à 95 %vol dans l'eau au Brésil, où 90 % des nouveaux véhicules utilisent la technique *Flex fuel* et peuvent rouler avec ce mélange. Plus de 66 % de l'éthanol utilisé comme carburant provient de la fermentation alcoolique. Le carburant E85 distribué en France contient pour sa part 85 % d'éthanol et 15 % d'essence. En résumé, nous avons plusieurs protocoles d'utilisation ***(Mohan. D et al 2006)*** :

L'incorporation directe:

L'éthanol peut être incorporé pur directement à l'essence dans une Proportion pouvant aller jusqu'à 10% sans qu'il soit nécessaire de modifier les moteurs ni les installations de stockage, de transport et de distribution de l'essence. Il permet une meilleure combustion de

l'essence car il augmente l'indice d'octane du mélange. L'incorporation directe permet de bénéficier immédiatement et à grande échelle des avantages environnementaux du bioéthanol. Le taux réglementaire d'incorporation du bioéthanol dans l'essence en Europe est de 5% et devrait passer à 10%. Aujourd'hui, les français roulent à l'éthanol puisqu'il est déjà incorporé à l'essence à 5,75% en fin 2008. **E5, E10, E100** sont ces appellations qui désignent les niveaux d'incorporation de l'éthanol pur dans l'essence. En Autriche, toutes les stations services proposent depuis le 1er octobre 2007 un carburant à 5% d'éthanol baptisé E5. La Commission Européenne envisage d'autoriser un nouveau type d'essence, l'E10 pouvant contenir jusqu'à 10% d'éthanol. Des constructeurs automobiles comme Saab ont déjà développé des moteurs capables de fonctionner à l'E100, c'est-à-dire à l'éthanol pur en éliminant toute émission de carburant fossile ***(Balat. M et al, 2008)***.

Le Super éthanol E85: L'E85 est un carburant composé de 65 à 85% de bioéthanol, et d'essence SP 95. En France, Il a été reconnu comme carburant au Journal Officiel du 1er juin 2006, et la Commercialisation est autorisée depuis le 1er janvier 2007. La **Figure 7**donne un exemple de la distribution du super éthanol (E85) en France en Aout 2008 ***(Balat. M et al, 2008)***.

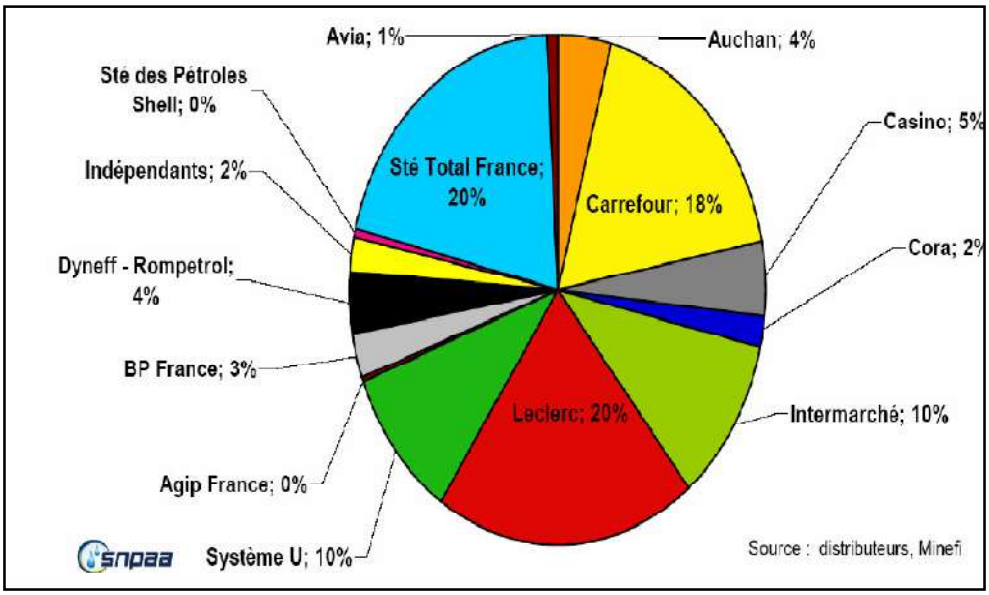


Figure07: Distributions de super éthanol (E85) en France (Aout 2008).

(Balat. M et al, 2008)

L'ETBE: (éther éthyle tertio butyle), L'ETBE est le résultat de la synthèse entre 47% de bioéthanol et 53% d'iso butylène en volume. Ce mélange est destiné être incorporé à de l'essence jusqu'à 15%. L'ETBE constitue la voie historique de l'utilisation de l'éthanol dans l'essence depuis 1992, mais son bilan environnemental est moins bon que celui de l'éthanol pur ou le Super éthanol ***(Cédric Malandain, 2007)***.

L'EEHV: L'EEHV (ester éthylique d'huiles végétales) est obtenu en remplaçant le **méthanol** par de l'**éthanol** dans le processus de fabrication des EMHV ou biodiesel. Il s'agit d'un procédé innovant qui présente l'avantage d'être à 100% d'origine végétale et renouvelable. Il constituera un débouché pour l'éthanol dans la filière gazole mais il est encore en phase d'expérimentations ***(Site 6 : SNPAA, 2007)***.

En fin, nous présentant comme exemple la consommation de bioéthanol en France entre (2000a2008) **(Figure 8)** :

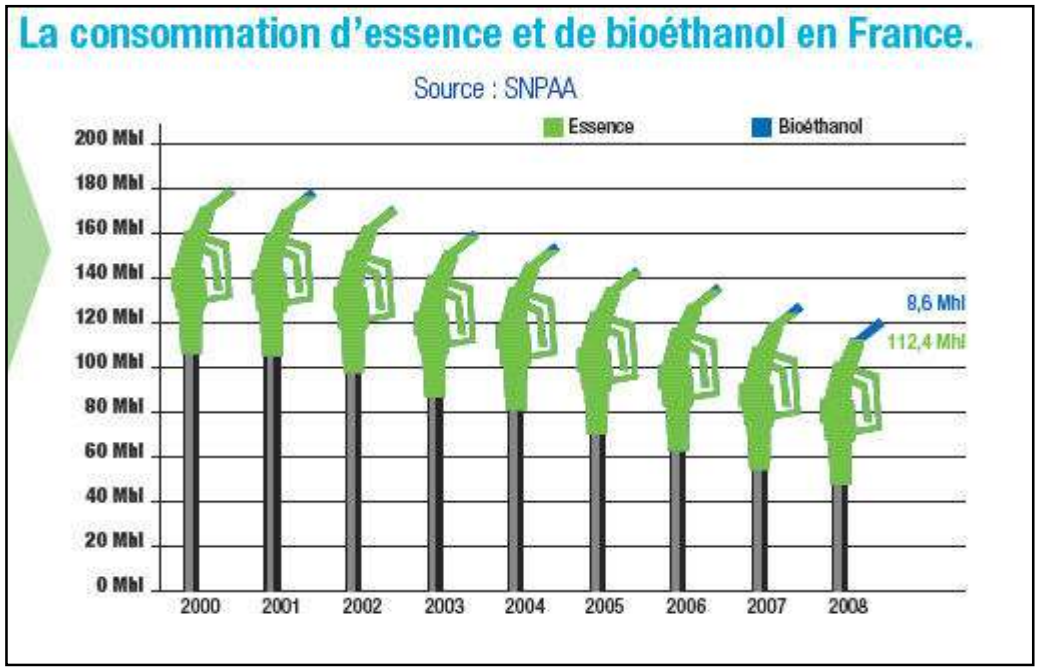


Figure 08 : Consommation du bioéthanol en France (comparaison entre l'essence et le bioéthanol) ***(Site 6 : SNPAA, 2007).***

L'Estérol : Il existe encore d'autres filières d'utilisation du bioéthanol comme carburant. L' une d'elle, en phase de test en Suède et aux USA est l'Estérel. Il s'agit d'un mélange de bioéthanol et de biodiesel. Ce carburant est prévu pour fonctionner dans des moteurs diesel. Il doit combiner les avantages du bioéthanol et du biodiesel ; moins d'émissions, réduction des gaz à effets de serre, meilleure densité énergétique que l'éthanol, prix compétitif, pas de modification du moteur ***(Mohan. D et al 2006)***.

II-3-3/ Boissons alcoolisées :

La contenance en éthanol (ou degré d'alcool) des boissons alcoolisées varie avec le mode de production et la matière première. La plupart des boissons alcoolisées peuvent être classées entre boissons fermentées et boissons spiritueuses. Les boissons fermentées principales sont les bières, produites à partir de céréales ou d'autres plantes produisant de l'amidon, les vins et les cidres, produits à partir de jus de fruits, et l'hydromel, produit à partir de miel. Les boissons spiritueuses sont produites par distillation de boissons fermentées. On peut distinguer différents types de boissons spiritueuses, comme le whisky, distillés à partir de graines de céréale fermentée, les eau-de-vie, distillées à partir de jus de fruits fermentés, ou le rhum, distillé à partir de mélasse ou de jus de canne à sucre. De nombreuses eau-de-vie et liqueurs sont aussi préparées par infusion de fruits, d'herbes et d'épices dans les boissons spiritueuses, comme le gin qui est créé en infusant des baies de genévrier dans de l'alcool rectifié.

D'autres méthodes peuvent être employées afin d'augmenter le degré d'alcool, comme la solidification fractionnée, qui est utilisée pour la préparation de l'apple jack à partir de jus de pomme. Le vin muté est lui préparé en ajoutant de l'eau-de-vie ou d'autres boissons spiritueuses à du vin partiellement fermenté, ce procédé tuant les levures tout en conservant une partie des sucres.

Les boissons alcoolisées sont utilisées en cuisine pour leurs parfums et du fait que l'alcool dissous les composés odorants hydrophobes. On utilise aussi l'éthanol de ces boissons pour produire du vinaigre, de la même manière que l'éthanol industriel est utilisé pour la production d'acide acétique (oxydation de l'alcool éthylique grâce à des microorganismes acétobacter) ***(Logsdon. J. E et Kirk. O, 2004)***.

II-3-4/ Utilisation médicale :

L'éthanol absolu est parfois injecté dans des tumeurs afin de provoquer leur nécrose. Il n'a toutefois pas une activité ciblée puisqu'il provoque indifféremment la nécrose des tissus sains et cancéreux.

L'éthanol est parfois utilisé pour traiter les intoxications au méthanol ou à l'éthylène glycol. Dans ces cas, l'éthanol entre en compétition avec les autres alcools pour être métabolisé par l'enzyme alcool déshydrogénase, diminue ainsi les dérivés toxiques résultant de leur métabolisation en aldéhydes et acides carboxyliques, et réduit les effets toxiques dus à la cristallisation de l'éthylène glycol dans les reins.

L'éthanol est utilisé dans les compresses comme antiseptique. Il est aussi employé dans les solutions hydro-alcooliques à une concentration d'environ 60 %vol. L'éthanol tue les organismes en dénaturant leurs protéines et en dissolvant leurs lipides. Il est efficace contre la plupart des bactéries et champignons, de nombreux virus, mais il est inefficace contre les spores ***(Barceloux. D.G, Bond. G. R. et al, 2002)***.

II-3-5/ Matière première :

L'éthanol est un intermédiaire de synthèse important dans l'industrie chimique. Il est notamment utilisé lors de la préparation des halogénures d'éthyle, des esters éthyliques, des amines éthyliques, du diéthyléther, de l'acide acétique, et dans une moindre mesure du butadiène ***(Logsdon. J. E et Kirk. O, 2004)***.

II-3-6/ Solvant

L'éthanol est miscible avec l'eau, et est un bon solvant. On peut le trouver dans les peintures, les alcoolature, les marqueurs, et dans les produits cosmétiques comme les parfums et les déodorants ***(Donnelly. G. Mc et Russell. A. D, 1999)***.

II-4/Le développement de bioéthanol dans le monde *(Site 3 : FAO, 2003)* :

Divers pays ont montré de l´intérêt pour le développement de la production et de l´utilisation du bioéthanol. Outre de chercher à satisfaire leurs propres besoins énergétiques. Leur but est, dans beaucoup de cas, de participer à constituer un marché mondial pour ce biocarburant.

Les données sur la production de bioéthanol révèlent d´importantes tendances d´expansion et de diversification. En 2006, la production totale de ce biocarburant fut de 51,3 milliards de litres et l´année suivante, elle atteignait 55,7 milliards de litres. En 2007, avec une

production de 26 milliards de litres d'éthanol à base de maïs, les Etats-Unis continuèrent comme leaders de la production globale de bioéthanol, et le Brésil, second producteur mondial, a produit cette même année près de 20 milliards de litres de bioéthanol dérivé de la canne à sucre. Comme leaders de la production de bioéthanol en Asie, la Chine et l´Inde ont produit 3,7 milliards et 2,3 milliards de litres en 2007, respectivement. En 2007 également, la production de tous les pays asiatiques atteignit 7,4 milliards de litres. Dans l´Union Européenne, la production de bioéthanol est passée de 1,6 milliard de litres en 2006 et 2,3 milliards de litres en 2007. Comme principal producteur européen de bioéthanol, la France a produit en 2007 aux alentours de 1,2 milliard de litres, suivie de l´Allemagne avec 850 millions de litres. La **Figure 9** résume la participation des principaux producteurs de bioéthanol dans l´offre totale, dans laquelle les pays en développement correspondent à environ la moitié de la production observée.

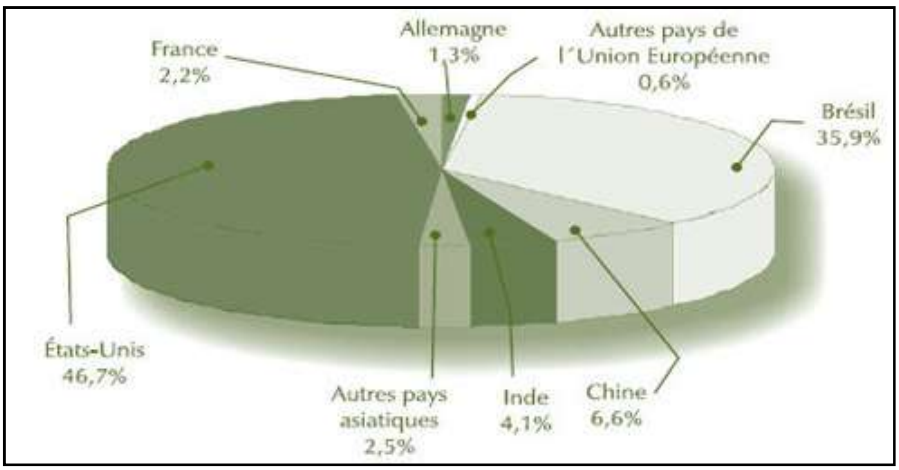


Figure 09: Production d'éthanol en 2007 : répartition dans le monde

(Chaibe. H, 2011)

II-5/ Avantages liés à l'utilisation du bioéthanol *(fodhel ben chaabane ,30 mars)* :

La production d'éthanol présente certains avantages dont notamment la réduction de la dépendance à l'égard des produits pétroliers ainsi que le développement de nouveaux marchés pour des produits agricoles. Les effets bénéfiques sur l'environnement ne sauraient être négligés: en effet, les rejets de CO_2 résultant du trafic continuent d'augmenter alors même que les autres émissions polluantes sont en constante diminution. Il est donc indispensable de diminuer le risque de catastrophes naturelles en réduisant les gaz à effet de serre liés au transport. Les biocarburants, au sens large, occupent dès lors une place de choix parmi les solutions que peuvent envisager les différents Etats. Parmi les biocarburants, le bioéthanol se

caractérise par sa propriété à se mélanger à l'essence ainsi que par sa simplicité d'utilisation, aucune modification ni adaptation des moteurs ou des installations de distribution n'étant nécessaire à faible concentration. Le Bioéthanol a permis aux pays importateurs du pétrole brut :

- de réduire la dépendance vis-à-vis des sources d'énergie étrangères,
- d'améliorer la balance des paiements du pétrole importé,
- de faire face aux embargos et les Chocs pétroliers (de 1974 et 1979 par exemple), ce qui a permis de surmonter les périodes des Guerres (Guerre du Golfe,…etc.).

De plus le Bioéthanol permet aussi :

- de promouvoir le développement social et économique durable,
- de diversifier les activités agricoles,
- de créer et maintenir des emplois
- de réduire l'impact environnemental.

En contre partie l'installation de projets de production du bioéthanol au niveau les pays producteurs du pétrole devient une nécessité pour le futur proche avec l'épuisement des sources pétrolières naturelles.

Matériel et Méthode

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

I/ Matériel

I-1/ Equipements

- Bain-marie,
- Agitateurs secoueurs,
- pH-mètre,
- Spectrophotomètre UV –Vis,
- Balance,
- Chauffe ballons,
- Pompe à eau,
- Pompe à vide,
- Autoclave,
- Réfrigérateur,
- Réfractomètre,

I-2/ Petits matériels et Verreries :

- Tubes à essai, fioles jaugées, pipettes, elenmeyers, éprouvettes, cristallisoir et béchers.
- Composants du montage de distillation (ballons, coudes en verre, réfrigérant, …),
- Chronomètre.
- Thermomètre.
- Rompe de filtration.
- Membrane de microfiltration 0,45µm,

I-3/ La levure de bière : *Saccharomyces cerevisiae* :

Cette étude a été réalisée en utilisant la levure de bière sous la forme sèche commercialisée comme levain (INSTENTE « France »).

II/Méthodes:

II-1/Essais de faisabilité:

Les objectifs de cette partie se résument comme suit :

- Apprendre la technique d'extraction de l'éthanol par distillation,
- Adapter cette méthode d'extraction à la récupération du bioéthanol à l'échelle laboratoire, c.à.d. avoir une idée approximative sur le volume du milieu à distiller et le temps de la fermentation nécessaire pour récupérer une quantité (ou un volume) mesurable d'éthanol par distillation.
- Cette étape est aussi essentielle pour voir l'efficacité des méthodes d'analyses choisies.

Pour cela, nous avons procédé comme suit :

- Préparer un milieu de culture simple: dissoudre 160g de Saccharose dans 1L d'eau minéral (milieu très concentré en saccharose), ajouter 4g de bicarbonate, autoclaver à 120ºC pendant 20min.
- Devant un bec bunsen, ensemencer ce milieu par 4g de levure boulangère.
- Laisser fermenter sans agitation, 1L pendant 24H et 1L pendant 4jours.
- A l'arrêt de la fermentation, séparer les cellules par décantation,
- A partir de la fermentation de 24H, distiller deux volumes différents : 160ml et 400ml. A partir de la fermentation de 4 jours, distiller un volume de 500ml.
- Mesurer les indices de réfractions, les masses ainsi que les volumes des distillats. Calculer leurs masses volumiques.
- Calculer les quantités d'éthanol produites dans chaque distillat par deux méthodes de dosage : une méthode réfractométrique et une densitométrique (Cf. section II-4).

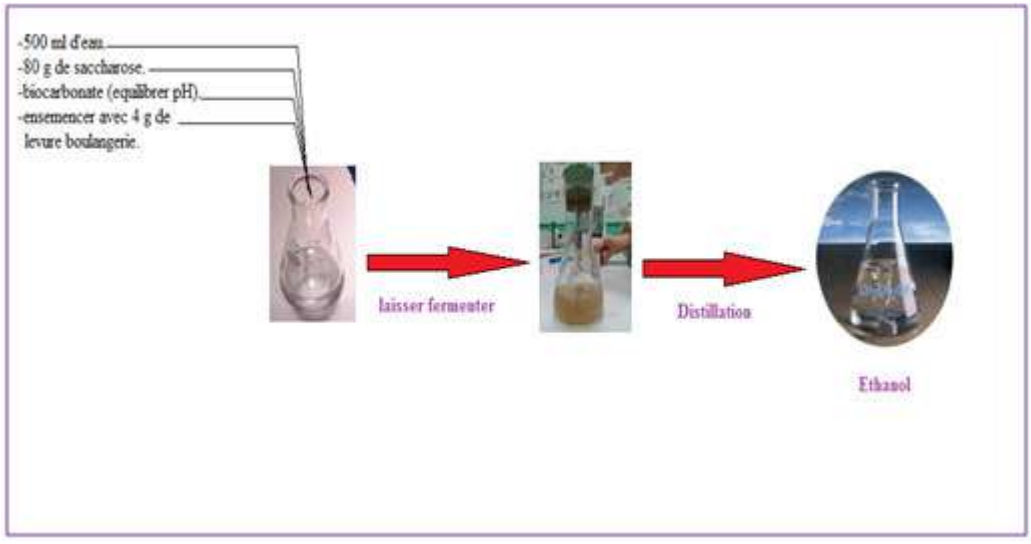


Figure10 : Essais de faisabilité: procédé général.

II-2/ Essais d'optimisations de la fermentation alcoolique :

Les fermentations ont été réalisées en utilisant une levure boulangère commerciale dans des erlenmeyers avec des volumes utiles de 250ml. Le milieu fermentatif de base est constitué :

- 1 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 0,5 g/l de KH_2PO_4.
- 1g/l d'extrait de levure.

A ces deux composants s'ajoutent la source de carbone et d'énergie ainsi que la source d'azote qui feront objet d'optimisation. Toutes les fermentations sont réalisées à la température ambiante sous une agitation estimée de 50rpm pendant 48H avec un pH initial libre (à mesurer).

Apres fermentation, l'observation d'un dégagement gazeux (production de CO2, voir équation de la réaction) à l'ouverture de l'erlenmeyers nous prouve bien qu'il y a eu production d'éthanol à partir de la source du Glucose.

$$\textbf{Glucose } (C_6H_{12}O_6) \rightarrow 2\,C0_2 + 2\,C_2H_5OH$$

En anaérobiose, la levure de bière métabolise le glucose en éthanol par fermentation indépendamment de sa concentration. En aérobiose, la respiration et la fermentation contribuent ensemble à la dégradation du glucose ; mais en aérobiose la respiration est inhibée par le glucose si la concentration est supérieure à 1 g/L. Cette répression catabolique est appelée effet "Crabtree" et elle conduit à une importante production d'éthanol.

Nous avons choisis le glucose comme source de carbone et d'énergie pour plusieurs raisons:

- Il s'agit d'une source simple et facilement métabolisable,
- Son dosage est facile par la méthode de Dubois, méthode opérable selon les moyens du Hall technologique,
- Le glucose constitue le résultat de l'hydrolyse de plusieurs polysaccharides qui peuvent faire objet de support de fermentation après un prétraitement hydrolytique (hydrolyse chimique ou enzymatique). Nous pouvons citer comme exemple : l'amidon de pomme de terre, l'amidon de blé, l'amidon de déchets de pain……

Différents facteurs physico-chimiques peuvent influencer le bioprocédé de production d'éthanol, à savoir la concentration en source de carbone et d'azote et la vitesse d'agitation…etc. l'objectif de cette partie est de fixer les conditions optimales nécessaires

pour avoir un rendement maximal de production d'éthanol. Pour cela différents essais d'optimisation ont été réalisés.

II-2-1/ Effet de la concentration initiale en Source de Carbone :

L'objectif de cette partie est de fixer la concentration en glucose qui donne un rendement maximal toute en étant pendant toute la phase de fermentation à un niveau supérieur à 1g/L (fermentation aérobie). Pour cela, nous avons préparé et autoclavé quatre milieux de 250ml contenant 1 g/L de $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, 0,2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ et 0,5 g/L de KH_2PO_4 et 1 g/L d'extrait de levure avec des concentrations en glucose de 20, 40, 80, 160 g/L. Ces milieux sont ensemencés avec un inoculum initial de : 4g/L puis agités à 50rpm pendant 48H.

II-2-2/ Effet de la nature de la Source d'azote

Apres avoir fixé la concentration optimale en glucose, nous avons varié la source d'azote afin de choisir la molécule qui donne un rendement maximal. Nous avons donc préparé et autoclavé quatre milieux contenant 1 g/L de $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, 0.5 g/L de KH_2PO_4 et 1g/L d'extrait de levure, avec la concentration optimale en glucose et en variant la source d'azote toute en gardant le même rapport C/N. Les molécules azotées choisies dans ce but sont :

- $(NH_4)_2 SO_4$ (132g/mol): 2g/L (0,42g/L d'azote).
- Na NO_2 (69g/mol): 2, 07 g/l.
- KNO3 (101g/mol): 3, 03 g/l.
- NH4Cl (53,5g/mol): 1, 6 g/l.

Ces milieux sont ensemencés avec un inoculum initial de 4g/L puis agité à 50rpm pendant 48H.

II-2-3/ Effet du rapport Carbone/Azote

L'objectif de cette partie est de choisir le rapport C/N qui donne le meilleur rendement de production, pour cela nous avons préparé quatre milieux contenant 1 g/L de $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, 0.5 g/L de KH_2PO_4 et 1g/L d'extrait de levure avec une concentration optimale en glucose tout en variant la concentration de la source d'azote optimale (1g/L, 2g/L, 4g/L, 6g/L); ce qui donne des rapports **C/N** différents. Ces milieux sont ensemencés avec un inoculum initial de 4g/L puis agités à 50rpm pendant 48H.

II-2-4/ Effet de l'inoculum initial :

La charge initiale du milieu en microorganisme producteur est aussi un paramètre à ne pas négliger, car elle a une influence sur la durée de la phase de latence. Pour cela, nous avons varié la charge de l'inoculum initial de 2g/L à 16g/l (2g/L, 4g/L, 8g/L, 16g/L) tout en retenant la même composition du milieu : 1 g/L de $MgSO_4 \bullet 7H_2O$, 0.5 g/L de KH_2PO_4, 1g/L d'extrait de levure, concentration en glucose optimale, source d'azote optimale à un rapport C/N optimum. Les milieux sont agités à 50rpm pendant 48H.

II-2-5/Effet de l'agitation :

Dans le cadre de l'optimisation du rapport C/N et de l'inoculum initial, nous avons eu une panne au niveau de l'agitateur avec lequel nous avons réalisé les deux premiers essais d'optimisation. Afin de régler ce problème, nous avons terminé notre travail avec un agitateur à plaque de faible agitation. Les rendements obtenus sont différents par rapport à ceux trouvés au niveau des deux premières parties. Nous avons été donc obligés de refaire tout le travail d'optimisation du rapport C/N et de l'inoculum initial avec un bain marie donnant une bonne agitation. La comparaison des résultats obtenus dans les deux cas traduisent l'effet de l'agitation.

II-2-6/ Cinétique de croissance et de production :

Après avoir fixé les conditions optimales donnant le meilleur rendement de production, nous avons réalisé une cinétique de fermentation en respectant la composition optimisée du milieu sous une agitation de 50 rpm pendant 48h. Des prélèvements ont été réalisés chaque 2h pour mesurer l'indice de réfraction, la densité, la concentration de glucose et la biomasse. Cet essai a pour but de fixer la durée de fermentation dans les conditions optimisées.

II-3/ Méthodes de séparation

II-3-1/ Séparation de la biomasse par filtration sous vide

A la fin de la fermentation, arrêter l'agitation, mesurer le pH final puis séparer la biomasse du milieu de fermentation en utilisant un montage de microfiltration **(Figure 11)**. Le principe de cette méthode repose sur le passage du bouillon de fermentation à travers une membrane de microfiltration (0,45µm), sous l'effet d'une dépression crée par une pompe qui aspire l'air dans un erlenmeyer placé en aval de la membrane. La biomasse est retenue sur le filtre, ce dernier est séché à 110ºC pendant 30 à 60min jusqu'à obtention d'un poids constant

d'une biomasse sèche. La différence de masse avant et après filtration ramenée au volume filtré permet de déterminer la biomasse sèche en (g/L).

(A) **(B)**



Figure11 : Séparation de la biomasse: (A) : Montage de la filtration sous vide, (B) : Membrane de (47mm*0.45µm) après filtration.

II-3-2/ Séparation de l'éthanol par distillation:

La distillation a été réalisée selon le montage décrit sur la **figure 12.** La distillation est une méthode de séparation basée sur la différence des températures d'ébullition des différents liquides qui composent la solution. Notre objectif était d'obtenir une solution d'éthanol la plus concentrée que possible toute en essayant de récupérer au maximum l'éthanol produit. La température d'ébullition de l'eau est de 100°C et celle de l'éthanol est de 78°C. Nous avons veillé à chauffer le milieu après filtration à une température située entre 78°C et 90°C pour que tout l'éthanol soit récupéré et que l'eau reste dans le ballon.

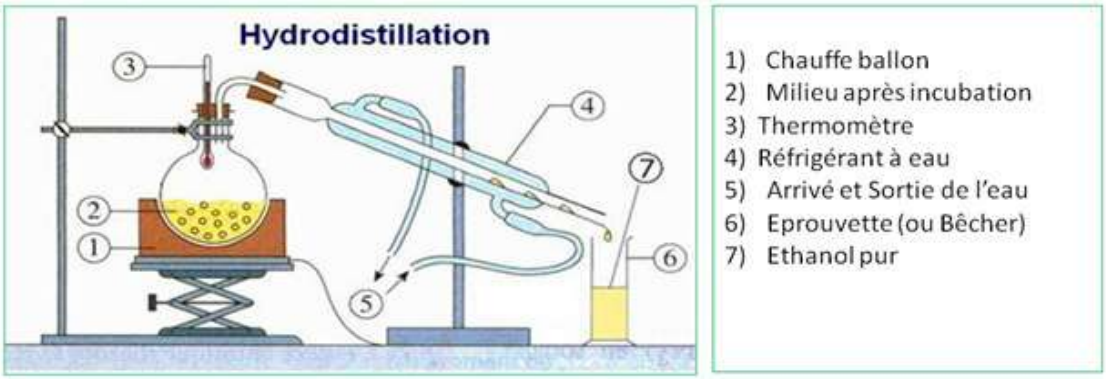


Figure12: Montage de la distillation simple.

II-4/ Méthodes d'analyse :

Le problème majeur rencontré dans cette étude est le dosage de l'éthanol produit. Plusieurs méthodes de dosage direct de l'éthanol sont communément utilisées pour le suivi d'une fermentation alcoolique (CPG, alcoomètres, ….). Vu la non disponibilité de ces méthode, la seule solution était d'extraire l'éthanol produit par distillation puis son dosage par des méthodes simples et disponibles.

II-4-1/ Etablissement de méthodes simples de dosage de l'éthanol :

Il faut signaler que 2 méthodes simples de dosages ont été établies une méthode densitométrique et une autre par mesure de l'indice de réfraction. Ces deux méthodes ont été établies pour la même gamme d'étalonnage. Le protocole se résume comme suit :

- Préparer des solutions d'éthanol-Eau distillée d'une masse égale à 100 g contenant respectivement 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 27.5%, 30%, 34%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 80%, 100%) (pourcentage massique).
- Mesurer l'indice de réfraction de chaque solution à l'aide réfractomètre en utilisant l'eau comme référence.
- Mesurer les masses et les volumes de mélanges à l'aide d'une éprouvette afin de déterminer la masse volumique. Cette opération devrait être réalisée par un pycnomètre; cependant vu la non disponibilité de ce dernier, elle a été réalisée par une éprouvette !
- Tracer le graphe : **IR=f ($T\%_{éthanol}$) et ρ=f ($T\%_{éthanol}$)** en utilisant l'Excel. Les deux courbes d'étalonnages sont représentées sur les figures suivantes :

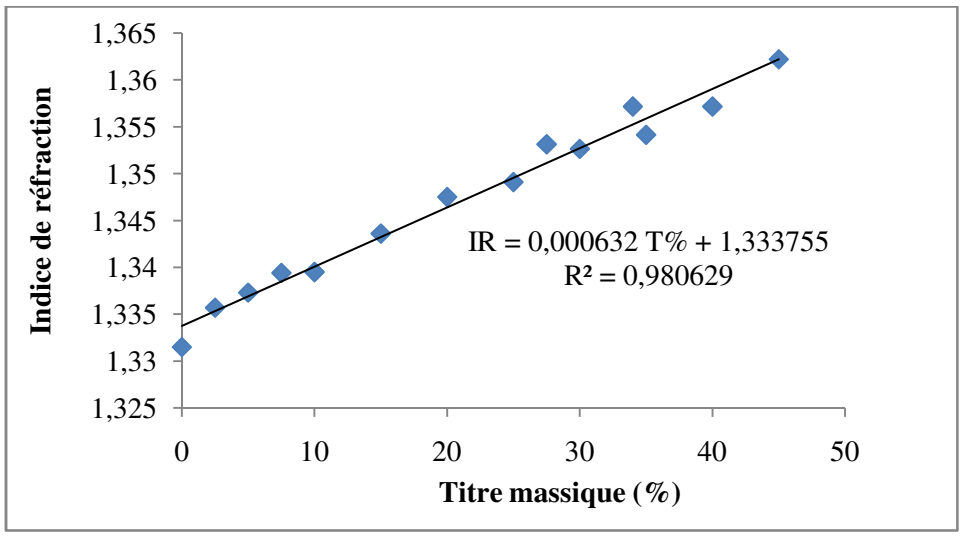


Figure13 : Courbe d'étalonnage destinée au dosage de l'éthanol par réfractométrie.

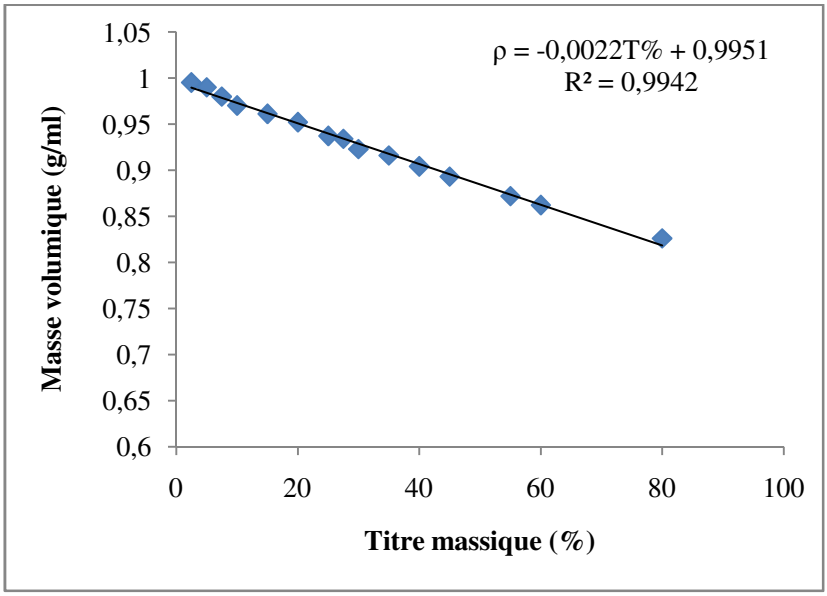


Figure14 : Courbe d'étalonnage destinée au dosage de l'éthanol par mesure de la masse volumique.

Apres distillation, les distillats récupérés sont analysés (prise du volume, de la masse et de l'indice de réfraction) afin de déterminer :

- Le titre massique **T%** en (g/100g) à partir des fonctions :
  - **IR= 0,000632 (T%) + 1,333755** . (01)
  - **ρ = -0,0022 (T%) + 0,9951** . (02)
- La masse de l'éthanol produit $\mathbf{m_{Et}}$ en (g) par la formule suivante :
  - $\mathbf{m_{Et} = (m_D * T\%)/100}$ (03)

Concentration de l'éthanol $\mathbf{C_{Et}}$ **(g/L)** par la formule suivante: $C_{Et} = \frac{m_{Et}}{V}$ (04)

V : le volume du milieu de fermentation en **L** (250ml=0,25L).

- Le rendement : $\mathbf{Y(P/S) = m_{Et} / m_{Glu}}$ en (g d'éthanol/g de glucose). (05)

  $\mathbf{m_{Glu}}$ est la masse du glucose consommée au cours de la fermentation, calculée comme suit: $\mathbf{m_{Glu} = m_i - m_f = (C_i - C_f) / 4.}$ (06)

  où $\mathbf{m_i}$, $\mathbf{m_f}$, $\mathbf{C_i}$, $\mathbf{C_f}$ sont les masses ainsi que les concentrations du Glucose dans le milieu au début et à la fin de la fermentation. Le rendement peut être aussi calculé par le rapport de la concentration de l'éthanol produit $\mathbf{(C_{Et})}$ et la concentration du glucose consommé.

Bien que la courbe densitométrique manque de précision par rapport à la courbe réfractométrique, nous avons dosé les distillats avec les deux méthodes afin de fixer l'optimum de chaque paramètre étudié. Cependant les résultats définitifs tenus en considération sont ceux qui découlent de la méthode du dosage par réfractométrie.

II-4-2/ Dosage des sucres totaux par la Méthode de Dubois *(Dubois et al, 1956; Herbert et al, 1971):*

Le principe de cette méthode est basé sur la formation d'une coloration jaune-brune en présence d'acide sulfurique concentré et de phénol, qui est mesurée au spectrophotomètre à 490 nm.

Cette méthode est utilisée pour le dosage de la concentration en glucose à la fin de la fermentation. Elle est exercée sur le bouillon fermenté et filtré.

Mode opératoire :

-Préparer une gamme de solutions étalons allant de 0 à 0,9 $g.l^{-1}$ de glucose,

-Déposer 0.1 ml de chaque solution étalon.

- Ajouter 1 ml d'une solution de phénol à 5%

- Homogénéiser

- Ajouter délicatement 5 ml d'H_2SO_4 concentré (95%): Attention au dégagement fort de la chaleur.

- Laisser 5 min dans un bain marie bouillant.

- Attendre 30 min à température ambiante.

- Lire la DO à 492nm. La couleur est stable pendant plusieurs heures. La courbe d'étalonnage obtenue est représentée sur la figure suivante :

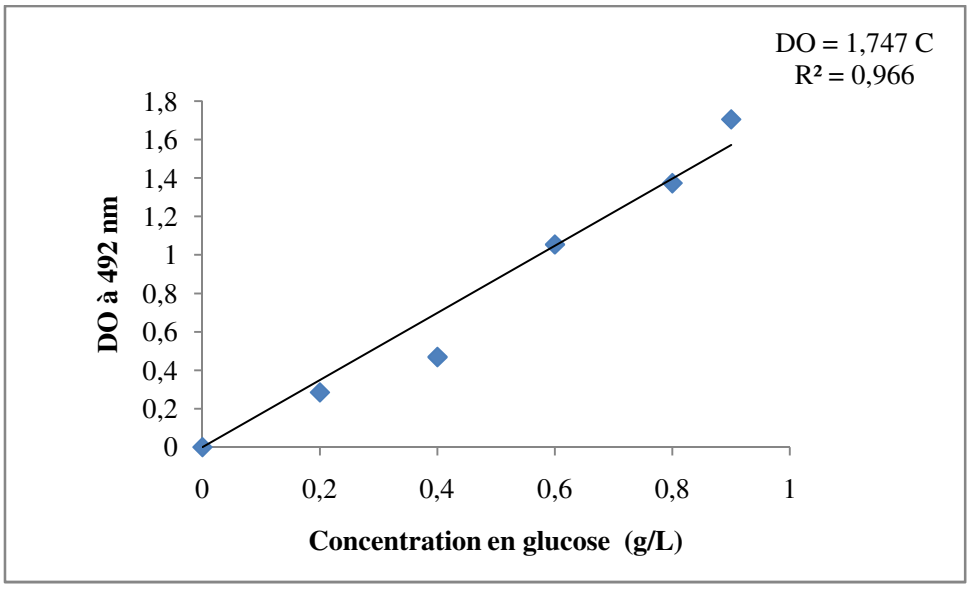


Figure15 : Courbe d'étalonnage destinée au dosage de glucose par spectrométrie.

A la fin de chaque fermentation, les concentrations finales en glucoses sont déterminées en suivant le même protocole de dosage selon la formule suivante : **DO = 1,747 C**. (07)

II-4-3/ Évaluation de la biomasse par spectrophotométrie:

La croissance cellulaire est aussi suivie par mesure de la densité cellulaire par spectrophotométrie à 600 nm, dans une cuve en verre de 1cm de trajet optique. La suspension cellulaire (le milieu à la fin de la fermentation) est diluée de façon à obtenir une densité optique située entre 0,8 et 1 unité d'absorbance, de manière à toujours se situer dans la zone de linéarité de la méthode. La courbe d'étalonnage est préparée comme suit:

-Préparer les suspensions de levure suivantes : **0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%** et **1%**.

-Bien agiter puis diluer chaque suspension au (1/50) afin d'obtenir des suspensions filles de **0,004%, 0,008%, 0,012%, 0,016%, 0,02%.**

-Faire une lecture de densité optique en utilisant un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 600 nm.

-Tracer la courbe DO (à 600nm) en fonction de la charge microbienne (% ou g/100ml).

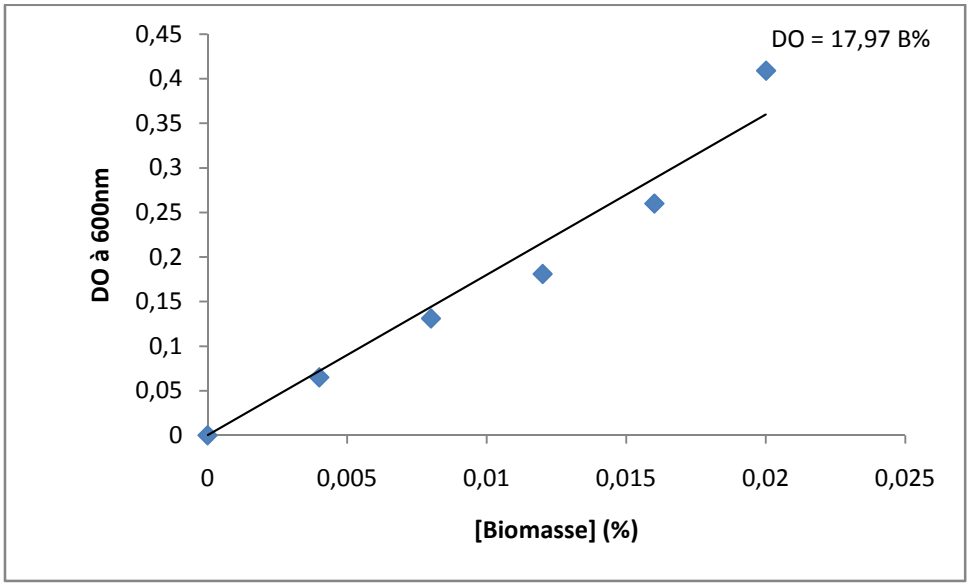


Figure15 : Courbe d'étalonnage destinée à l'évaluation de la biomasse.

A la fin de chaque fermentation, la biomasse finale est estimée par prise de DO à 600nm sur un échantillon dilué au 1/50. La teneur en biomasse est calculée selon la formule suivante : **DO = 17,97 (B%).** (08)

en tenant en considération le facteur de dilution (1/50).

II-4-4/ Identification d'éthanol :

Deux méthodes principales d'identification de l'éthanol ont été utilisées:

Le Flambage : La flamme bleue c'est un indicateur que l'éthanol est présent dans le distillat avec une concentration élevé. On prend un volume de notre distillat dans un verre de montre et on flambe le contenue de ce dernier.

Test au dichromate de potassium : En milieu acide l'éthanol (CH3-CH2OH) est oxydé en acide acétique (CH3-COOH) par les ions dichromates ($Cr_2O_7^{2-}$). Ces derniers subissent une réduction en ions Cr^{3+} responsables de la coloration vert foncé de la solution, selon la Réaction d'oxydoréduction suivante :

$$\mathbf{Cr_2O_7^{2-} + 14\,H^+ + 6e^- \rightarrow 2Cr^{3+} + 7H_2O \quad (x2)}$$

$$\mathbf{CH_3\text{-}CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3\text{-}COOH + 4H^+ + 4e^- \quad (x3)}$$

$$\mathbf{2Cr_2O_7^{2-} + 3CH_3\text{-}CH_2OH + 16H^+ \dashrightarrow 4Cr^{3+} + 3CH_3\text{-}COOH + 11H_2O.}$$

Dans un bécher, mélanger 10 ml de distillat dilué + 20 ml de solution de dichromate (0,1 M) + 20 ml d'acide sulfurique à 25 %. Observer le changement de la couleur.

Spectrophotométrie infrarouge : Afin de confirmer plus amplement la structure de la molécule produite, une analyse spectroscopique à infrarouge (FTIR) a été réalisée pour le distillat obtenu dans les conditions optimales permettant de mettre en évidence les groupements chimiques de l'éthanol produit, elle consiste à préparer des pastilles par compression du bromure de potassium (KBr) broyé et imbibé par une goute du distillat. Une pastille transparente est ainsi obtenue puis fixée délicatement sur un support placé sur le trajet du faisceau infrarouge. Les spectres obtenus sont enregistrés entre 4000 et 500 cm^{-1}.

Résulta et discussion

Il faut rappeler que l'objectif de cette étude est la production de l'éthanol par ***Saccharomyces cerevisiae*** ainsi que l'optimisation des conditions permettant l'obtention d'un rendement maximale en éthanol. Pour cela, la stratégie expérimentale adoptée consiste à étudier l'effet de plusieurs facteur (Concentration de la source de carbone, source d'azote, rapport C/N …etc.) en déterminant la valeur optimale pour chaque paramètre puis l'appliquer pour la suite de l'étude. Un essai de faisabilité a été introduit avant l'étude proprement dite afin de s'adapter aux différentes étapes de la production : la fermentation ainsi que la séparation par distillation.

I/ Essai de faisabilité :

Afin d'éviter le gaspillage du glucose (source de carbone utilisée pour nos essais d'optimisation), cet essai a été réalisé en utilisant du saccharose. Il s'agit d'un disaccharide facilement métabolisable par les levures puis elles possèdent l'invertase. Ce dernier a été utilisé à 160g/L, concentration maximale en source de carbone visée au cours des essais d'optimisation. Le bilan obtenu par réfractométrie, est indiqué sur le **tableau 2**

Tableau 2: Bilan de l'essai de faisabilité par réfractométrie.

Durée de la fermentation (H)	**24H**	**24H**	**4 jours**
Volume distillé (ml)	160	400	500
Volume du distillat (ml)	18	60	30
Masse du distillat (m_D) (g)	16,265	55,714	28,392
Indice de réfraction (IR)	1,35112	1,3458	1,36219
T%	27,4762658	19,0585443	44,9920886
m_{Et} (g)	4,46901464	10,6182774	12,7741538
C_{Et} (g/L)	27,9	26,5	25,5

Il faut donc signaler les points suivants :

- Pour une durée de fermentation de 24H :
  - ✓ Nous avons obtenu un volume mesurable du distillat quelque soit le volume distillé (160ml, 400ml),

- ✓ les dosages effectués sur les deux distillats ont aboutis à la même concentration d'éthanol (g par litre du milieu) (27,9 g/L≈ 26,5g/L), ce qui indique que la distillation est bien métrisée et la méthode de dosage est reproductible.
- ✓ Le volume restant dans le ballon après distillation est complètement caramélisé, ce qui indique que le sucre n'est pas entièrement consommé en 24H.

- Pour une durée de fermentation de 4 jours, nous avons choisis un volume à distiller plus grand à titre de précaution, car nous avons un risque que la levure peut dégrader l'éthanol suite à l'épuisement du saccharose. Nous avons obtenu une concentration d'éthanol proche (25,5 g/L). Ce qui indique que la concentration en éthanol est maximale au bout de 24H. Le volume restant dans le ballon n'est pas caramélisé, ce qui indique que les sucres sont plus consommés par rapport que la culture de 24H alors que la concentration en éthanol est identique. Nous avons donc un rendement de production plus bas.

En conclusion, afin de tester des concentrations en source de carbone plus basses tout en ayant un volume du distillat mesurable, nous avons donc opté pour un volume de fermentation de 250ml (entre 160 et 400ml), ce volume sera entièrement distillé. Pour des raisons similaires nous avons aussi choisis une durée de fermentation de 48 heures pour nos essais (entre 24H et 4jours).

Une méthode densitométrique moins précise a été utilisée pour estimer la quantité d'éthanol produite, cette dernière a donné les résultats suivants **(Tableau 3)**:

Tableau 3: Bilan de l'essai de faisabilité par mesure de la densité.

Durée d'incubation (H)	**24H**	**24H**	**4 jours**
Volume distillé (ml)	160	400	500
Volume du distillat (ml)	18	60	30
Masse du distillat (m_D) (g)	16,265	55,714	28,392
Masse volumique ρ (g/ml)	0,903	0,928	0,946
T%	41,8636364	30,5	22,3181818
m_{Et} (g)	6,80912045	16,99277	6,33657818
C_{Et} (g/L)	42,557	42,48193	12,67316

Pour les cultures de 24H, la méthode densitométrique donne des concentrations similaires en éthanol, cependant elles sont surestimées par rapport à celles trouvées par la méthode réfractométrique. Il faut rappeler que la courbe d'étalonnage de cette méthode ainsi que les masses volumiques des distillats ont été réalisés sans pycnomètre, ce qui confère à cette méthode une grande incertitude. Cette méthode a donné un résultat contradictoire concernant le distillat de 4jours de fermentation par rapport à la méthode réfractométrique, signalant qu'une partie de l'éthanol a été consommé au bout de quatre jours.

En conclusion, en tenant compte des deux méthodes, une culture de quatre jours est à éviter. Dans la limite de nos moyens d'analyse, nous optons pour la réfractométrie. Ce ci n'exclue pas que la mesure de la densité (ou masse volumique) est utilisée à titre comparative pour localiser les optima au cours de nos expériences d'optimisations.

II/ Essais d'optimisation :

II-1/ Effet de la concentration initiale en source de carbone :

Les teneurs en biomasse obtenues aux différentes concentrations initiales en glucose sont illustrées sur la **figure17**.

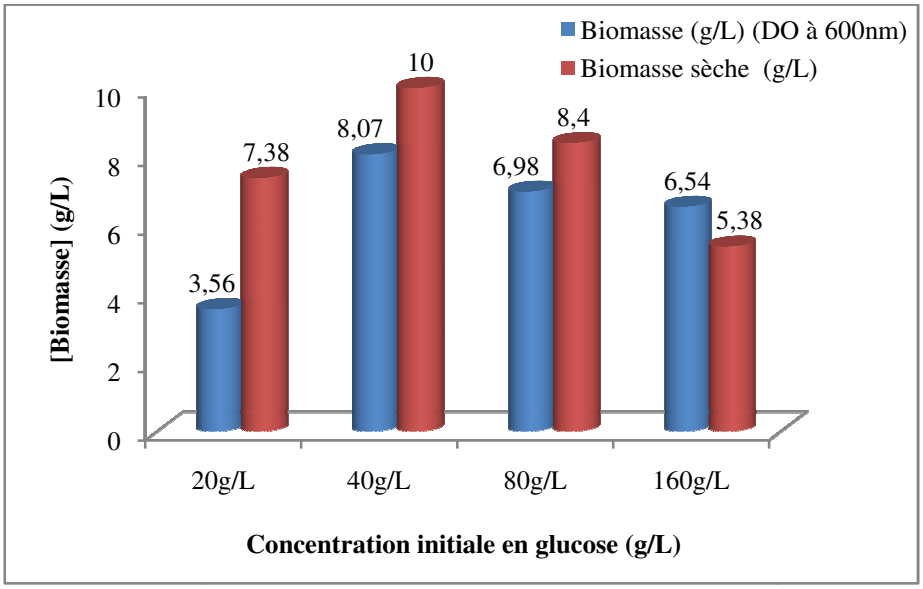


Figure 17: Teneures en biomasses enregistrées à chaque concentration initiale en glucose par spectrophotométrie et par mesure de la biomasse sèche.

D'une façon générale, les deux méthodes donnent des résultats proches à l'exception du grand écart enregistré à 20g/L. Ce ci est due à la mauvaise prise de DO à 600nm donnant une biomasse sous estimée (3,56 g/L< l'inoculum initial de 4g/L). Une mauvaise agitation au

cours de l'échantillonnage ainsi que le manque de rapidité au cours de la prise des densités optiques sont les causes principales d'erreurs. Il s'agit de suspensions dont la densité optique peut varier avec la décantation.

A partir d'un inoculum initial de 4g/L, nous avons obtenu des teneures finales en biomasse très sensible aux variations de la concentration initiale en source de carbone. Une concentration initiale de 40 g/L donne une meilleure croissance. Le déclin de la croissance à partir de 40g/L est du probablement à la détérioration des conditions du milieu (notamment le pH) ou à une mauvaise assimilation du glucose avec les grandes concentrations. Cependant, le bilan de nos fermentations montre que **(Figure 18)** :

- toutes les fermentations ont aboutis à un même pH final (3,1 ; 2,8 ; 2,6 ; 2,7 pour 20, 40, 80 et 160g/L respectivement).
- les concentrations consommées en glucose au cours de la fermentation sont de plus en plus importante avec l'augmentation de la concentration initiale.

Ceci indique que le glucose consommé est transformé principalement en éthanol (Effet crabtree). Ce dernier a un effet négatif en grande concentration sur la croissance du microorganisme producteur.

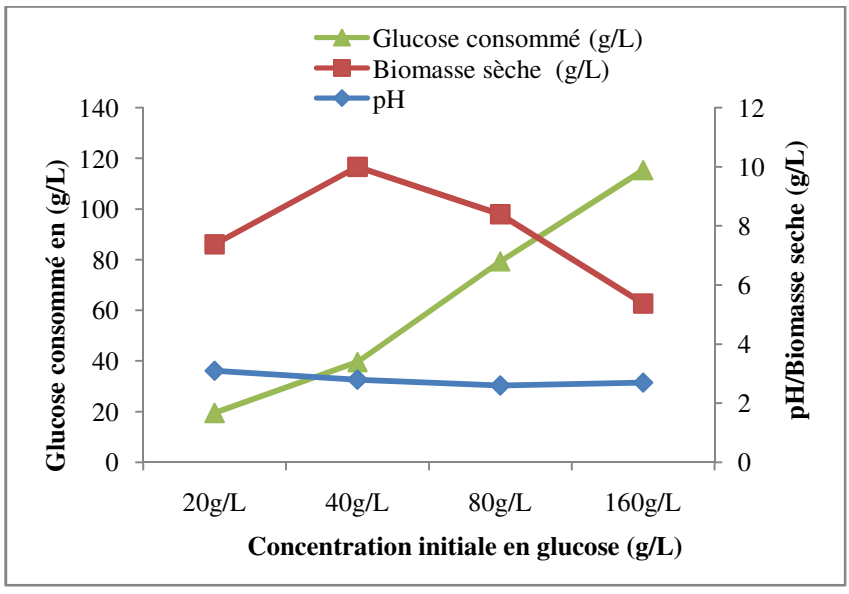


Figure 18 : Bilan des fermentations aux différentes concentrations initiales en glucose: variations du pH, sucres consommés avec la biomasse seche.

Enfin, le dosage de l'éthanol extrait à partir de chaque fermentation, nous confirme bien l'hypothèse émise (Figure19) : la consommation du substrat carboné s'accompagne de la

production d'éthanol, car les teneurs de ce dernier sont de plus en plus importantes avec l'augmentation de la concentration initiale en glucose. Le calcul des rendements nous donne un optimum enregistré pour une concentration initiale en glucose de (20g/L). Les concentrations (40g/L, 80g/L, 160g/L) donnent des rendements convergents.

Il faut noter que la méthode densitométrique a convergé vers le même optimum, cependant les rendements enregistrés sont nettement surestimés (1,53 ; 0,65 ; 0,78 ; 0,87g/g pour 20 ; 40 ; 80 ; 160 g/L respectivement).

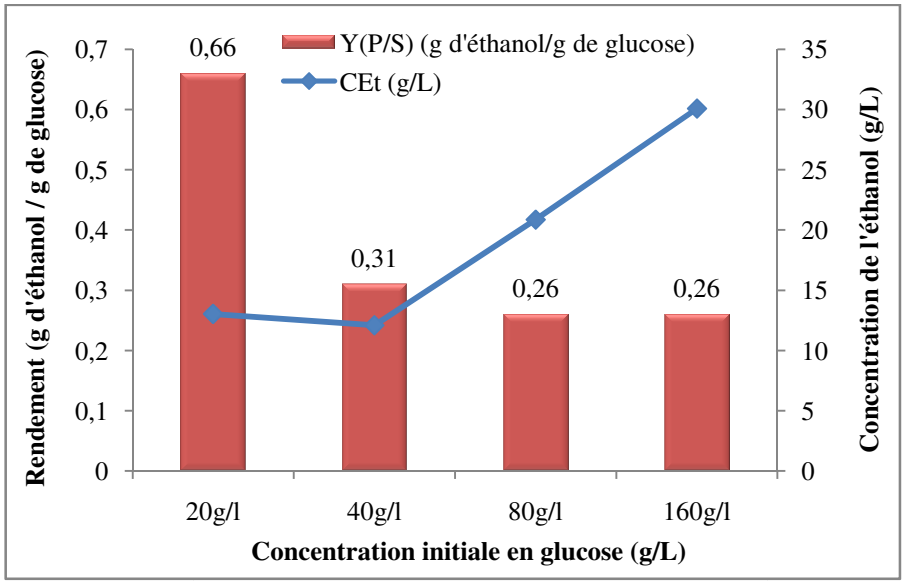


Figure 19: Effet de la concentration initiale du glucose sur le rendement de production de l'éthanol.

II-2/ Effet de la nature de la source d'azote :

Il faut rappeler que ce paramètre a été testé en utilisant du glucose à 20g/L. Nous avons utilisé plusieurs molécules azotées de telle sorte qu'on garde la même concentration d'azote dans le milieu (0,42g/L) et donc le même rapport C/N (8/0,42=19). (09)

Les teneurs en biomasse obtenues pour les différentes sources d'azote sont montrées sur la **figure 20**.

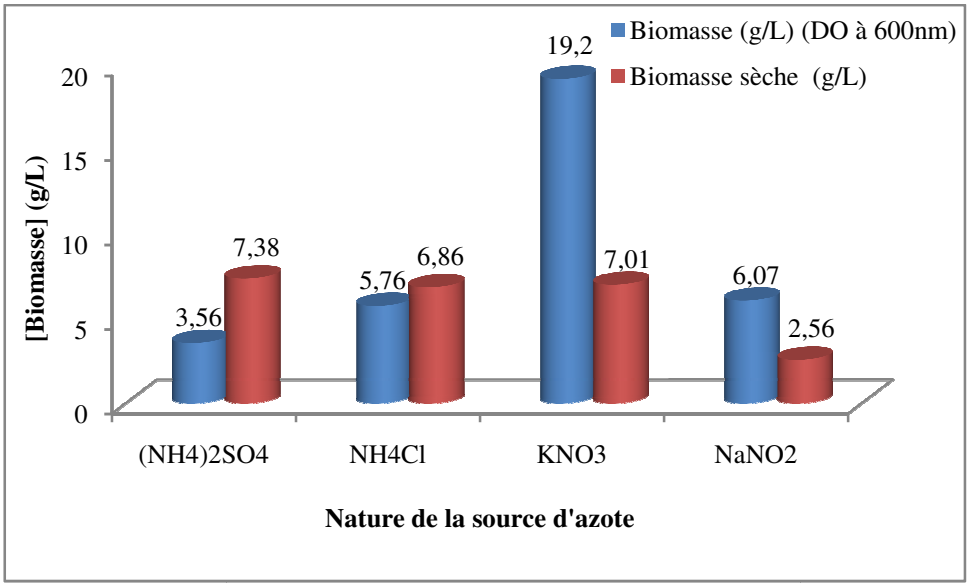


Figure 20: Teneurs en biomasses enregistrées pour chaque source d'azote.

A cause de l'incertitude de la méthode spectrophotométrique, nous retenons les teneurs en biomasse obtenue par séchage pour $(NH_4)_2SO_4$, NH_4CL et KNO_3 c.à.d. 7,38 g/L; 6,86g/L et 7,01g/L respectivement. Cependant, pour $NaNO_2$, la biomasse est estimée à 6,07 (par spectrophotométrie), car la méthode de séchage a donné une teneur inférieur à l'inoculum initial (4g/L). Ceci pourrait être du à une perte de la biomasse lors de la filtration **(Figure 20)**.

A l'exception du $NaNO_2$ qui donne une biomasse légèrement faible, les teneurs enregistrées pour les autres sources d'azote sont du même ordre **(Figure 20)**. En parallèle, la quantité du glucose consommé est presque identique aboutissant à des pH situés entre 3 et 5 **(Figure 21)**. Cependant, En présence de la forme ammonium (NH4Cl et $(NH_4)_2SO_4$), la biomasse produit plus d'éthanol (14 g/L et 13 g/L respectivement) par rapport à la forme nitrate (11,67g/L) et nitrite (12,52 g/L), ce qui donne un rendement maximum enregistré pour le chlorure d'ammonium « NH4Cl » (0,72) **(Figure 22)**.

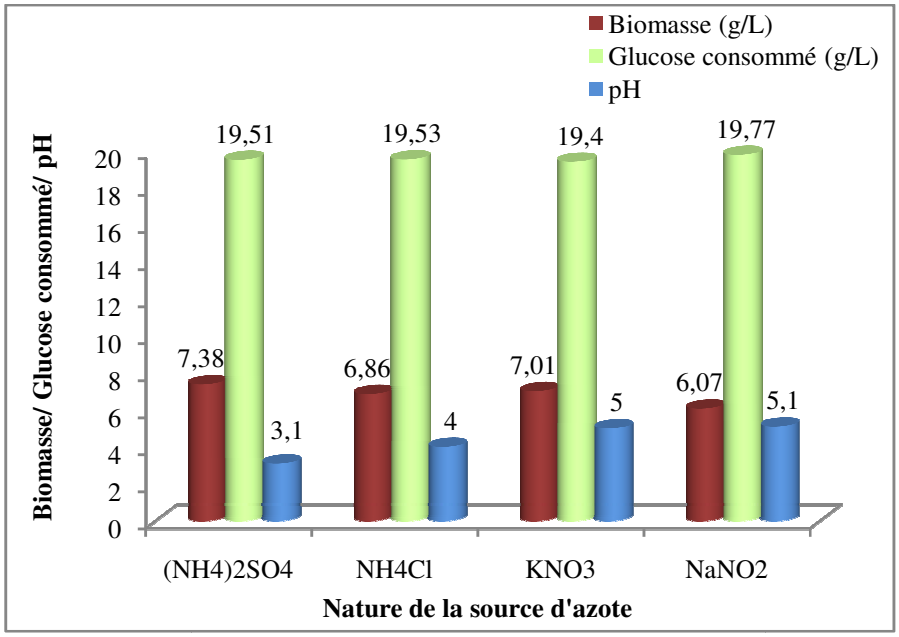


Figure 21 : Bilan des fermentations pour les différentes sources d'azote : pH final, concentration en sucres consommés et la biomasse seche.

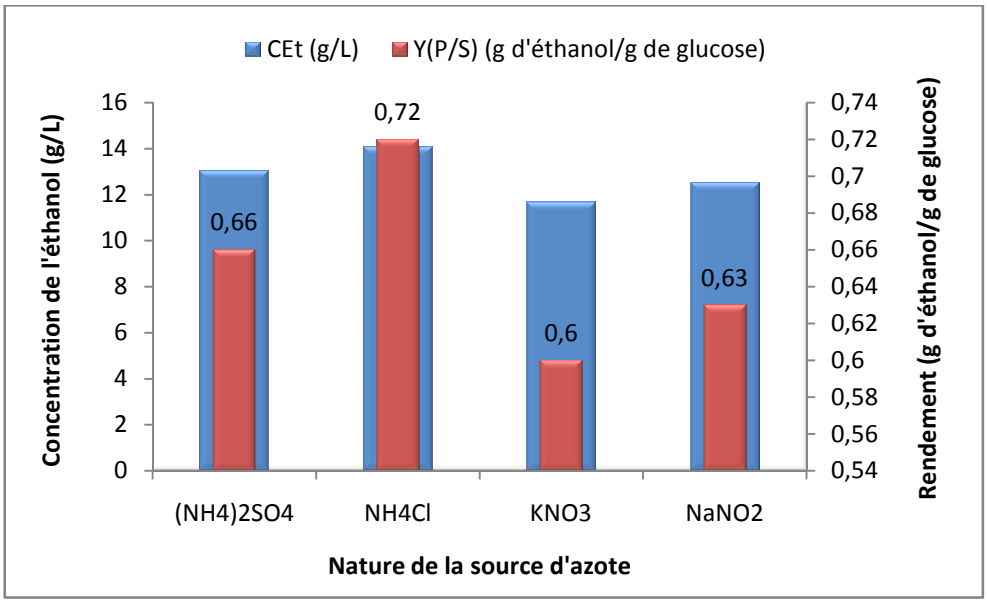


Figure 22 : Effet de la nature de la source d'azote sur le rendement de production de l'éthanol.

II-3/ Effet du rapport (Carbone / Azote):

La **figure 23** présente les teneurs en biomasse obtenues avec une concentration en glucose égale à 20g/L, aux différentes concentrations initiales de NH_4Cl : 1, 2, 4, 6 g/L, ce qui correspond aux rapports C/N suivants : 38 ; 19 ; 9,5 ; 6,34.

Vu les différences enregistrées dans les méthodes d'estimation de la biomasse, nous avons représenté en **figure 23** les teneurs moyennes en biomasse en fonction de la concentration initiale en NH_4CL.

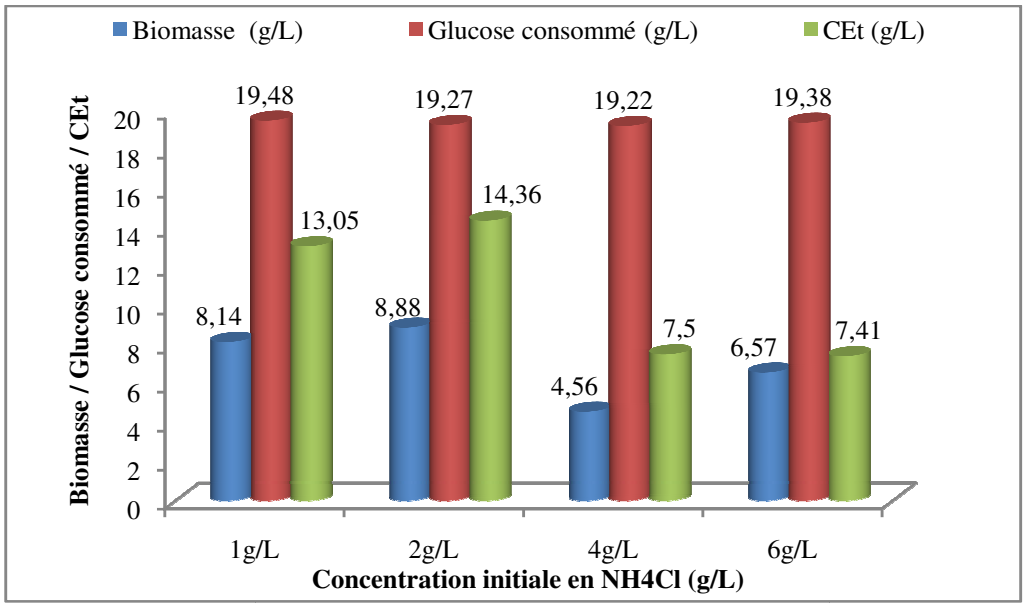


Figure 23: Données enregistrées des fermentations aux différentes concentrations de NH_4Cl (Biomasse, Glucose consommé et concentration de l'éthanol produit).

Nous remarquons que l'utilisation de concentrations différentes en azote donne des taux de consommation en glucose très proches. Cependant, plus le rapport C/N est faible (c.à.d. plus la concentration en source d'azote est importante), plus la teneur en biomasse est faible. Ceci est du soit à une mauvaise croissance en présence des concentrations élevées en NH_4Cl (effet toxique aux fortes concentrations), soit à une croissance rapide aboutissant à une phase de déclin avant 48H (durée fixée pour la fermentation). Le déclin de la biomasse se répercute clairement sur la quantité d'éthanol produit (puisqu'il s'agit d'un métabolite primaire). En effet, les plus fortes concentrations en éthanol (13-14g/L) sont enregistrées avec les teneurs en biomasse les plus élevées (à 1g/L et 2g/L de NH4Cl). En contre partie, des concentrations en éthanol faibles (aux environs de 7g/L) sont enregistrées pour les fortes concentrations en NH_4Cl (4g/L et 6g/L) où nous avons les teneurs en biomasses les plus faibles **(Figure 23)**. Les rendements d'éthanol obtenus aux différentes concentrations de NH_4Cl **(Figure 24)** montrent bien qu'une concentration initiale en NH4Cl de 2g/L (équivalente à rapport C/N de 19) est optimale (Y(P/S)=0,74) **(Figure 24)** .

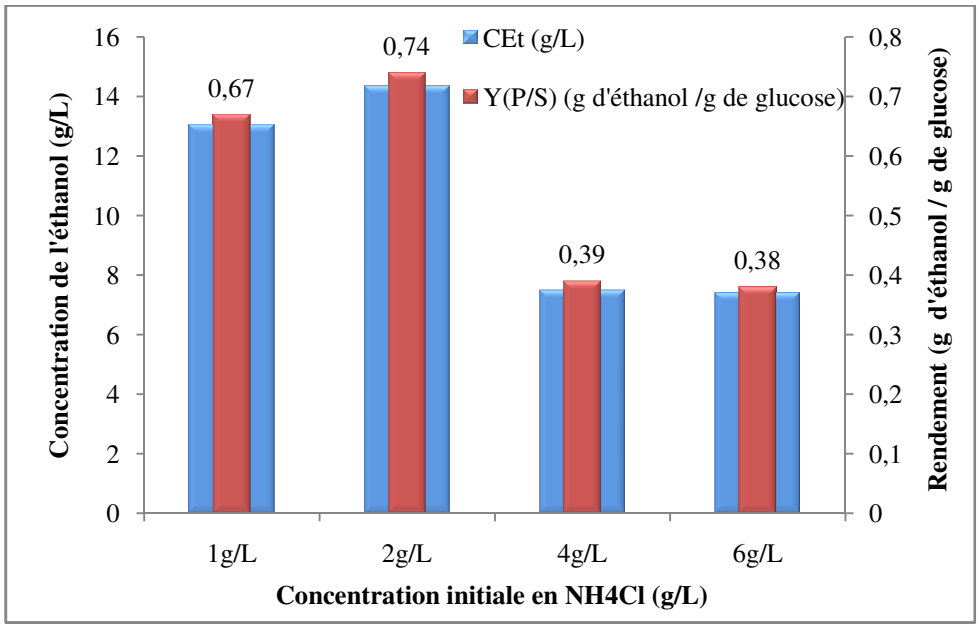


Figure 24 : Effet de la concentration en NH_4Cl (le rapport C/N) sur le rendement de production de l'éthanol.

Il faut signaler que la méthode densitométrique donne le même optimum mais aussi avec des rendements sur-exagérés.

II-4/ Effet de l'inoculum initial :

La **figure 25** présente les teneurs en biomasse obtenues avec une concentration en glucose égale à 20g/L, de NH4Cl à 2g/L (rapport C/N=19) aux différentes concentrations de l'inoculum : 2, 4, 8, 16 g/L. Dans ce cas, la biomasse sèche est prise en considération.

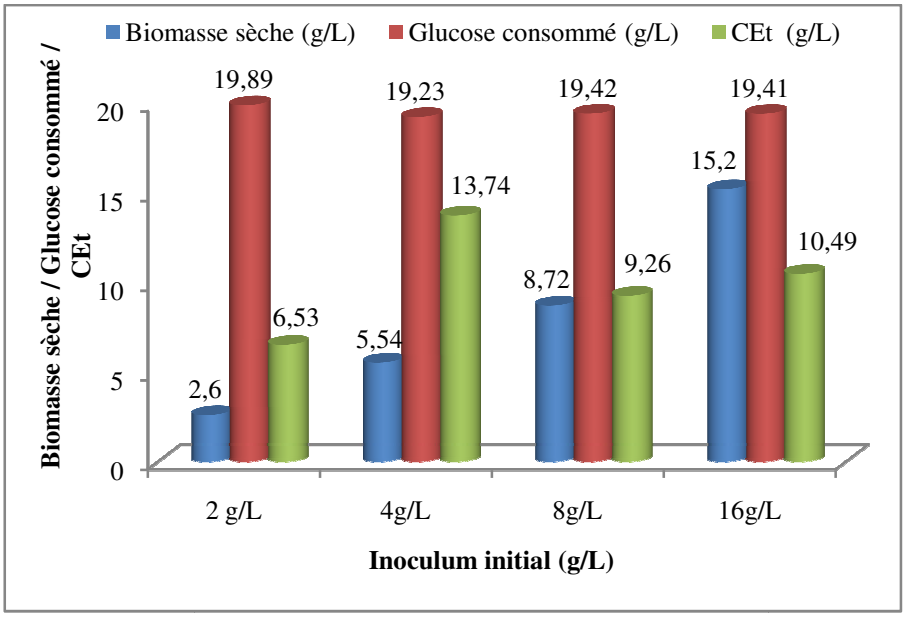


Figure 25: Données enregistrées des fermentations aux différentes concentrations de l'inoculum (Biomasse sèche, Glucose consommé et concentration de l'éthanol produit).

Nous remarquons que pour toutes les grandeurs de l'inoculum initial donnent des taux de consommation du glucose convergents. En calculant les différences des teneurs en biomasse entre l'état initial et final, nous avons : 0,6g/L, 1,54g/L, 0,72g/L pour un inoculum initial de 2g/l, 4g/L et 8g/L respectivement. Cependant, nous enregistrons une diminution de la biomasse de 0,8g/L pour un inoculum initial de 16g/L. L'effet de la taille de l'inoculum apparait nettement en passant de 2g/L à 4g/L, nous avons une meilleure croissance qui pourrait être due à un raccourcissement de la phase de latence. Pour un inoculum de 4g/L, La biomasse finale est double (5,54g/L) donnant une concentration double en éthanol (13,74g/L) (par comparaison aux résultats trouvés pour un inoculum de 2g/L). A partir de 4g/L, la grandeur de la biomasse devient incompatible avec la composition du milieu. Avec l'épuisement du glucose, les levures dégradent l'éthanol produit, ce qui donne une mauvaise production de l'éthanol : 9,26g/L et 10,49g/L pour des tailles d'inoculum de 8g/L et 16g/L respectivement. Il faut souligner que la charge du milieu en biomasse ainsi que le déclin du niveau énergétique sont tellement importants que la biomasse atteint sa phase de déclin rapidement à 16g/L **(Figure 25)**.

Les résultats révèlent donc qu'une meilleure concentration d'éthanol (13.74g/l) est enregistrée pour un inoculum de 4g/l donnant un rendement optimal de 0,72g éthanol/g glucose **(Figure 26)**.

La même remarque est à signaler quand à la convergence des deux méthodes d'estimation de l'éthanol avec des rendements surestimés pour la méthode densitométrique.

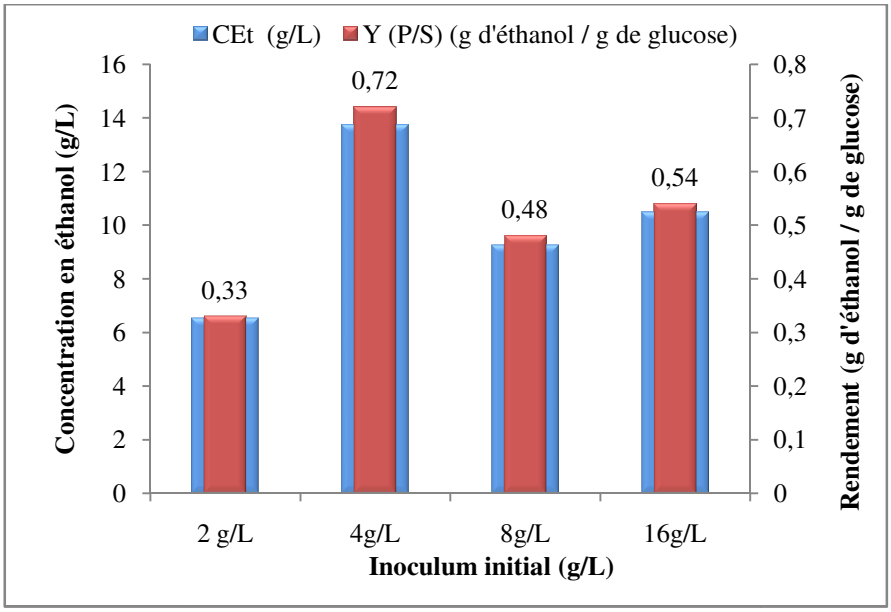


Figure 26 : Effet de la concentration de l'inoculum sur le rendement de production de l'éthanol

II-5/ Effet de l'agitation :

II-5-1/ En variant le rapport C/N :

La figure 27 présente une comparaison des différents résultats trouvés en variant le rapport C/N pour une bonne agitation (50rpm) et une mauvaise agitation.

Nous signalant les remarques suivantes :

- d'une façon générale, nous signalant une meilleure croissance à la bonne agitation. Dans la majorité des cas le taux de biomasse passe du simple (à la mauvaise agitation) au double (à la bonne agitation). Une bonne agitation homogénéise le milieu et améliore les échanges cellulaires des levures (consommation de la source de carbone et d'énergie et sortie des déchets métaboliques) ce qui donne un meilleur taux de croissance.
- la consommation du glucose dans les deux cas (mauvaise et bonne agitation) est très proche,

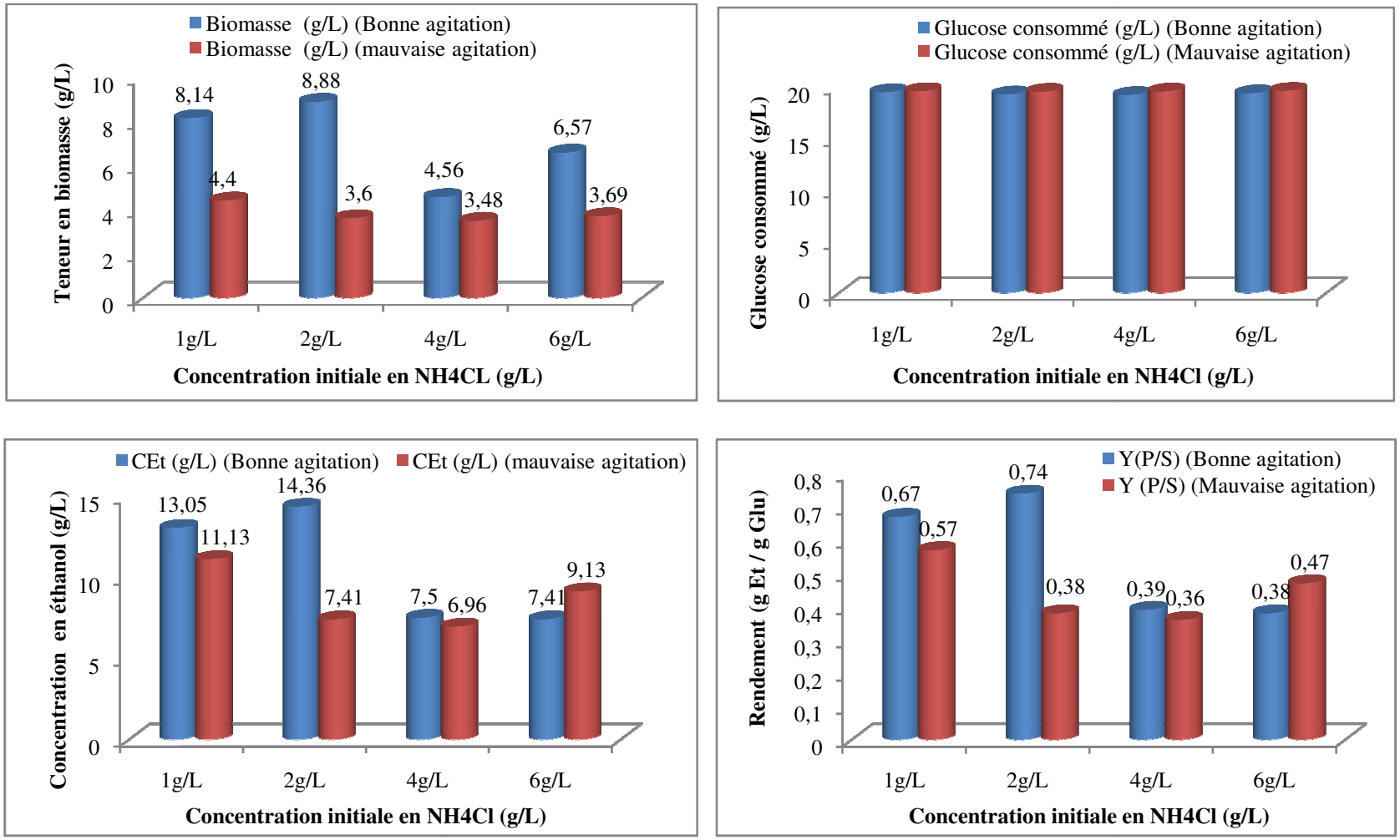


Figure 27 Effet de l'agitation sur la teneur en biomasse, la consommation du glucose, la concentration en éthanol et sur le rendement aux différentes concentrations de NH_4Cl.

- la production d'éthanol pour des concentrations en NH_4CL de (4g/L, 6g/L) sont presque similaire pour une bonne et une mauvaise agitation, ce ci est du à la prédominance de l'influence des concentrations élevées de la source d'azote sur le rendement de la fermentation. Cependant pour des concentrations favorables en NH_4Cl (1g/L et 2g/L) l'effet de l'agitation est très clair.
- L'incidence de la mauvaise agitation sur les paramètres sur-cités, nous a désorienté l'optimum : un meilleur rendement est obtenu à une concentration en NH4Cl de 1g/L. De plus les résultats obtenus sont difficiles à interpréter du faite que les meilleurs rendements sont obtenues avec les concentrations (minimale et maximale) en source d'azote !!. Cependant pour une bonne agitation, les meilleurs rendements sont obtenus à 1g/L et 2g/L de NH4Cl (0,67 et 0.74 g d'éthanol/g glucose respectivement). Le rendement décroit avec l'augmentation de la concentration en source d'azote (avec la diminution du rapport C/N).

II-5-2/ En variant l'inoculum initial :

La figure 28 présente une comparaison des différents résultats trouvés en variant l'inoculum initial pour une bonne agitation (50rpm) et une mauvaise agitation

Nous observons que :

- Le milieu bien agité donne une croissance plus importante. La diminution en biomasse est claire lorsque l'agitation est mauvaise. Ceci peut être interprété par la mauvaise distribution des nutriments et la mauvaise homogénéisation du milieu qui provoque une détérioration rapide des conditions de la culture et par conséquent la lyse des levures.
- Les valeurs de glucose consommé sont très proches pour une bonne et une mauvaise agitation,
- les meilleures concentrations en éthanol sont enregistrées pour la bonne agitation, l'écart est plus important est dans les conditions optimum (à 4g/L) où nous n'avons pas une consommation de l'éthanol produit. Les rendements obtenus dans ces conditions sont complètement différents : 0.72 (g d'éthanol/g glucose) pour une bonne agitation et 0.45 (g d'éthanol/g glucose) pour une mauvaise agitation.

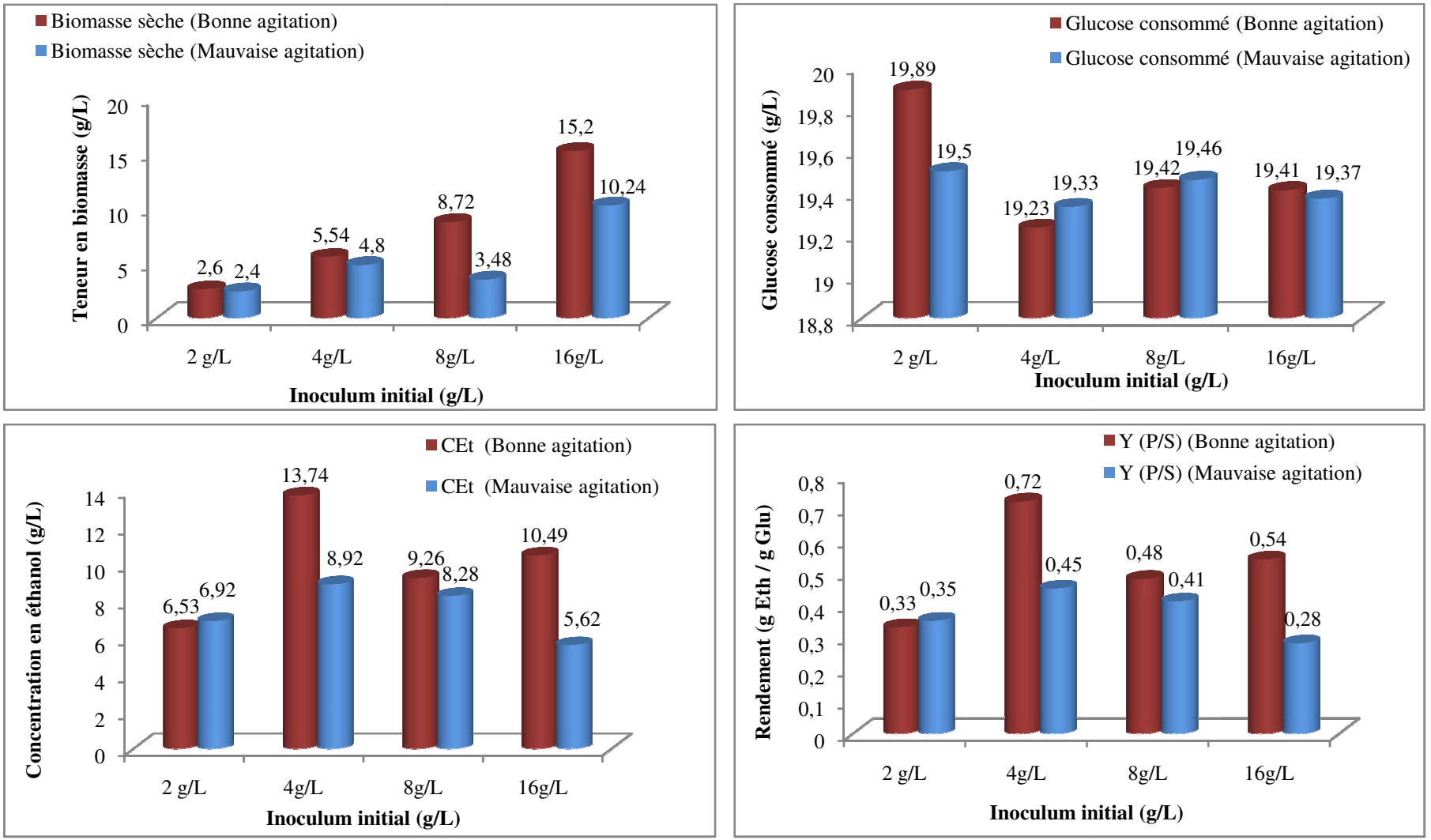


Figure 28 Effet de l'agitation sur la teneur en biomasse, la consommation du glucose, la concentration en éthanol et sur le rendement en fonction de taille de l'inoculum.

II-6/ Cinétique de croissance et de production :

La figure 29 présente une cinétique de fermentation dans les conditions optimisées afin de déterminer la durée de la fermentation.

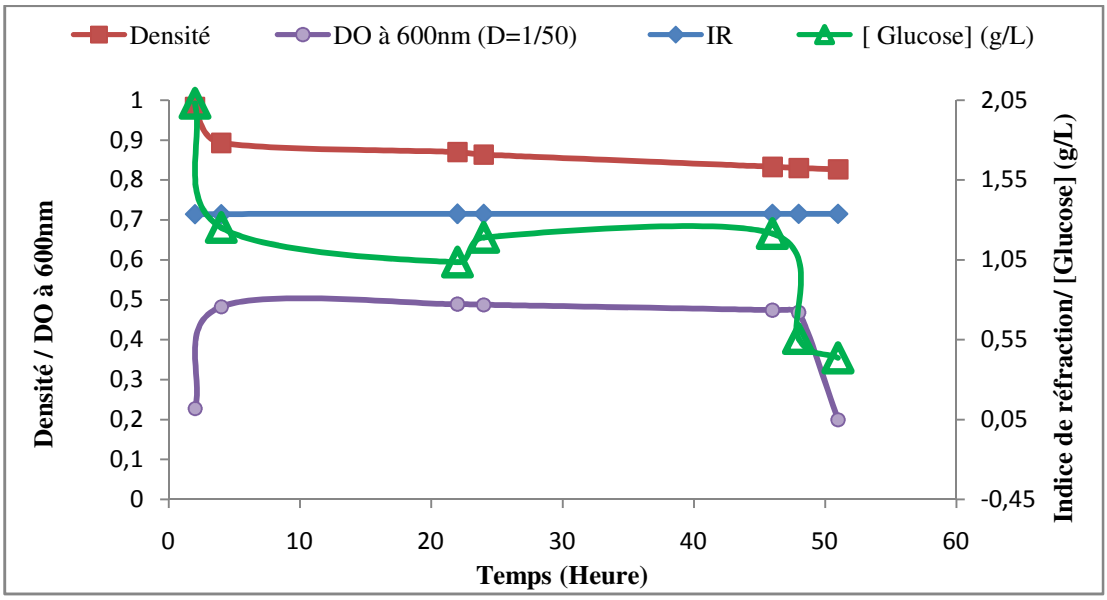


Figure 29 : Cinétique de la fermentation dans les conditions optimale.

Il est à enregistrer que :

- le Glucose diminue significativement au cours des premières heures, Il atteint 1,25 g/L au bout de 4h.
- En parallèle, nous avons une augmentation exponentielle de la biomasse pendant les premières heures.
- Pendant la même durée, nous signalons une bonne diminution de la densité (de 0,988 à 0,893) accompagnée d'une augmentation de l'indice de réfraction (de 1,3362 à 1,3372) indiquant une production de l'éthanol.
- Une phase stationnaire s'installe par la suite (A partir de 4h jusqu'à 48h) au cours de laquelle, nous avons un ralentissement de la consommation du glucose. Cependant la densité diminue encore indiquant une bonne viabilité des cellules productrices (0,86 à 24H et 0,83 à 46H et 48H). Il est de même pour l'indice de réfraction qui augmente (1,3383 à 24H et 1,33835 à 46H et 48H).
- A partir de 48H, la biomasse est en phase de déclin, pendant laquelle nous avons une stabilisation de la densité et de l'indice de réfraction.

En conclusion, une durée de fermentation de 46 à 48 Heure est suffisante pour un maximum de production et donc pour avoir un rendement maximal.

Notre rendement finale est donc estimé de 0,7 g d'éthanol/ g de glucose métabolisé. Il faut signaler que ce rendement a été calculé selon la source de carbone principale et prédominante qui est le glucose sans tenir en considération l'extrait de levure présent dans le milieu et qui constitue lui-même une source de carbone supplémentaire. De plus, il ne faut pas oublier aussi le monostéarate de sorbitane, un émulsifiant contenue dans la levure sèche utilisée comme inoculum et qui peut être lui aussi une source de carbone supplémentaire. C'est la raison pour laquelle, nous avons obtenu des rendements supérieurs au rendement théorique, normalement obtenu pour le glucose pure (0,51g d'éthanol/g de glucose). D'un autre coté, le faite de travailler avec une levure sèche non isolée, nous n'avons pas d'information sur sa viabilité : elle peut être un mélange de biomasse viable avec une partie non viable qui peut aussi servir comme source de carbone pour les cellules viables.

Bien qu'elles soient minoritaires, ces sources de carbones secondaires peuvent avoir un retentissement sur le rendement expérimental.

Il ne faut pas aussi négliger les incertitudes expérimentales à différents niveaux :

- Au niveau de l'extraction par distillation,
- Au niveau de la méthode disponible pour analyser l'éthanol,
- Au niveau de la méthode d'analyse du glucose.

Ces incertitudes pourraient être évitées si des moyens d'analyse plus précis sont disponibles (Chromatographie gaz sans extraction de l'éthanol).

En tenant compte de toutes ces influences, une comparaison avec la bibliographie disponible **(Tableau 4)** nous montre bien des rendements inférieurs à notre rendement en utilisant S*accharomyces cerevisiae* cultivé sur le même substrat (glucose), dans des conditions expérimentales proches.

Tableau 04: Conditions opératoires ainsi que les résultats trouvés par quelques auteurs.

Auteurs	Conditions expérimentales	Rendement	Autres résultats
Ylitervo. P	T= 30-40 PH=4 -5 *S .Cerevisiae* (CBS 8066). Substrat : glucose= 30g/L Agitation =50rpm	0.44	C_{Eth}=13.37g /L
Winkelhausen. E	T=30 -40 PH=4-5 *S .Cerevisiae* (BAKER YEAST) Substrat: glucose=100g/L Agitation =50 rpm	0.43	C_{Eth}=36.12g/L
Boulal. A et Benali. B	T= 30-32 PH=4.3-4.7 *S .Cerevisiae*, Substrat : 1kg de datte (Aghmou) Agitation= 50rpm	0.5	Densité=0.83 IR=1.361 P_{Eth}=51%
Boulal. A et Benali. B	T= 30-32 PH= 4.3-4.7 *S .Cerevisiae* Substrat : 1kg de datte (Tinaceur) Agitation =50rpm	0.65	Densité=0.8 IR=1.361 P_{Eth}=47%

II-7/ Identification de l'éthanol :

II-7-1/ Le Flambage :

A la fin de notre travail, nous avons identifié le produit séparé par flambage. Le distillat donne une flamme bleue caractéristique de l'éthanol **(Figure 30)**.



Figure 30 : La flamme bleue de l'éthanol.

II-7.2/ Test au dichromate de potassium :

La **figure 31** représente le résultat obtenu pour la révélation au dichromate de potassium.



Présence d'éthanol dans le distillat (Ethanol+)



Absence d'éthanol (Ethanol-)

Figure 31 : Résultat de la révélation au dichromate de potassium

L'expérience montre la présence d'éthanol à travers son oxydation par le dichromate en milieu acide donnant une coloration vert foncé au bleu vert.

II-7-3/ Spectrophotométrie infrarouge :

Les **figures 32 et 33** représentent les spectres (en transmitances %) des deux échantillons : Ethanol de référence et un distillat obtenu dans les conditions optimales.

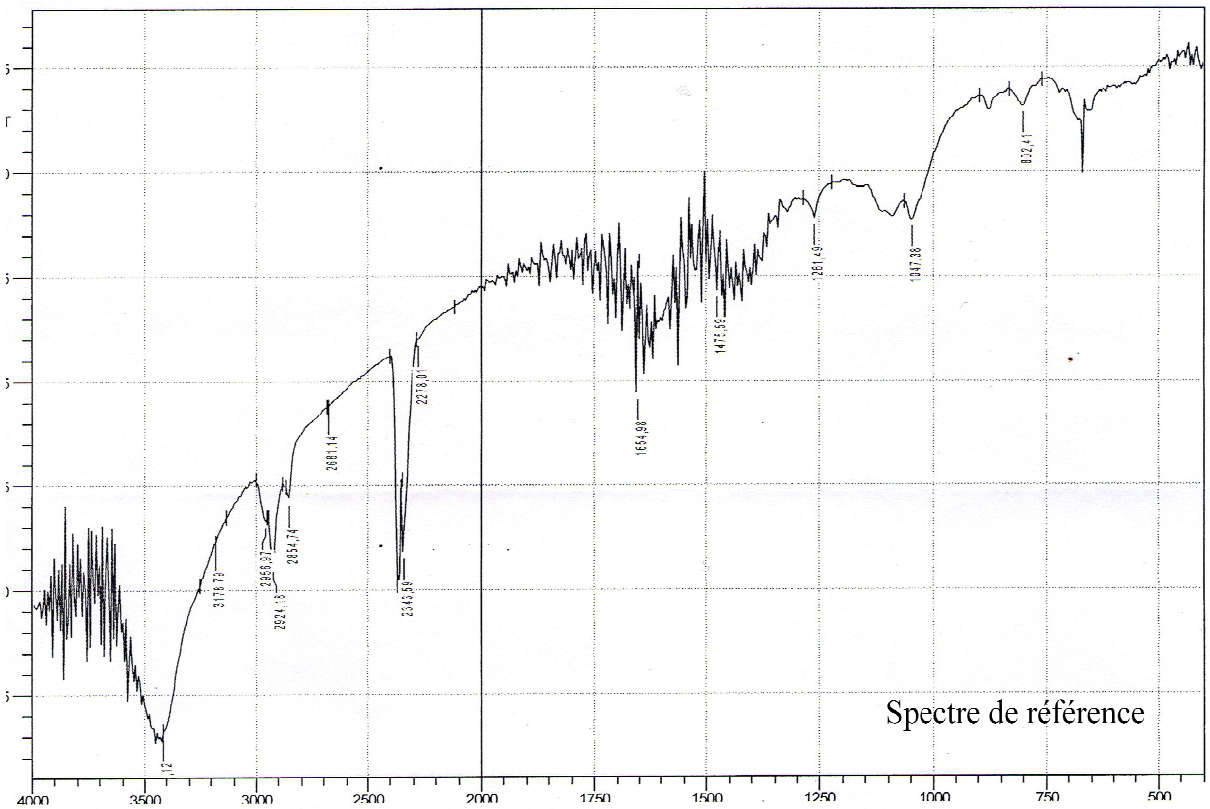


Figure 32 : Spectre de l'éthanol à 97%.

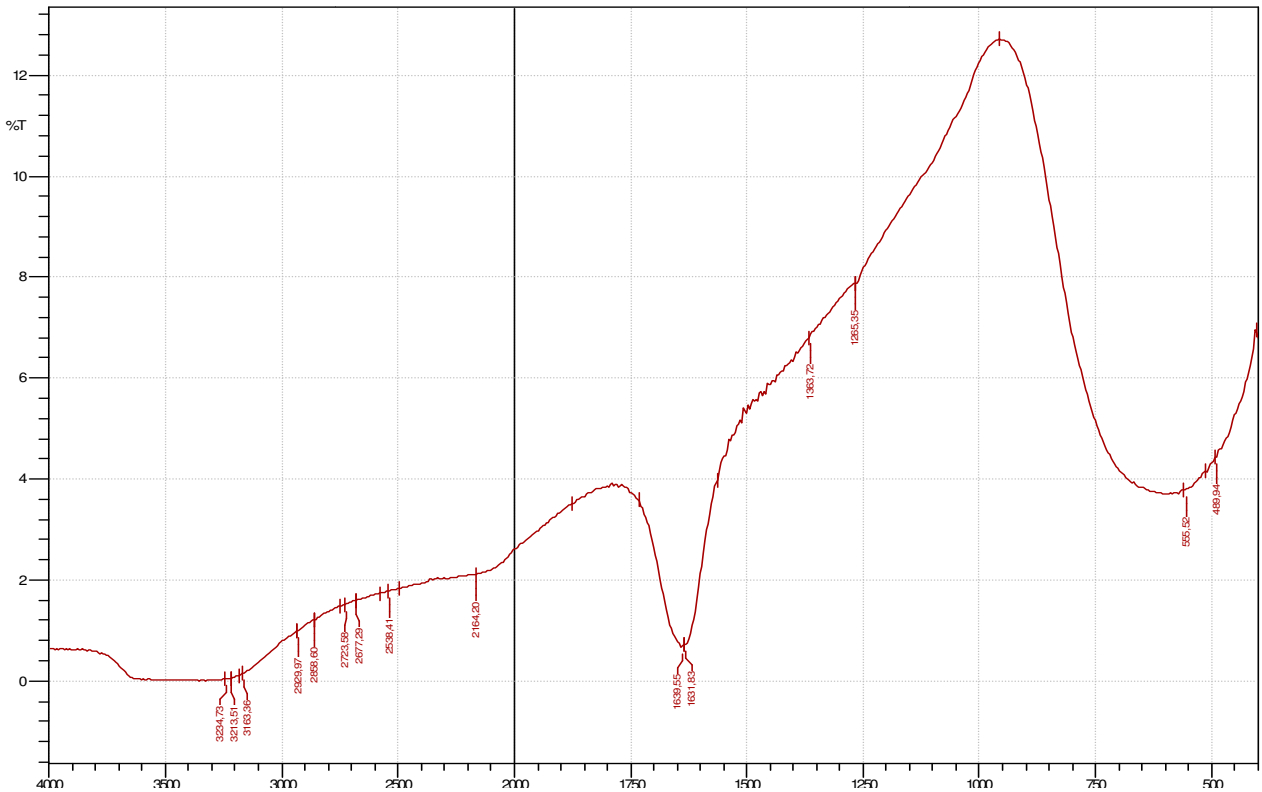


Figure 33 : Spectre du distillat.

Il s'agit bien du même produit (Ethanol) puisque nous avons obtenu des pics aux même bandes dans les deux spectres, on parle de :

- La bande d'allongement caractéristique de la fonction OH située entre 3500-3300 cm^{-1} présente dans les alcools les phénols et les acides.
- La bande de déformation caractéristique de la fonction OH à 1420 cm^{-1} présent dans les alcools, les phénols et les acides.
- La bande de déformation caractéristique des groupements CH_3 et CH_2 située entre 1480-1430 cm^{-1} présente dans les hydrocarbures (l'éthanol est aussi un hydrocarbure).
- La bande de la liaison –C-O à 1290-1050 cm^{-1} présente dans les alcools et les esters.

Malgré la présence de ces bandes de base caractéristiques à l'éthanol; il existe des différences entre les deux spectres dans la hauteur, la largeur et l'uniformité des pic à cause de la différence de pureté entre le spectre 01 de référence (Ethanol 97%) et notre distillat.

Conclusion Général

Conclusion

L'objectif visé par notre travail est de produire du bioéthanol par fermentation alcoolique en utilisant *Saccharomyces cerevisiae*. Afin d'améliorer le rendement de production d'éthanol, nous avons optimisé la composition du milieu de fermentation en nutriments (Source de carbone, source d'azote, rapport C/N), en microorganisme producteur (Inoculum) ainsi que les conditions de la fermentation (l'agitation et la durée de l'incubation).

Les résultats ont montré que *Saccharomyces cerivisea* donne sa production maximal en éthanol a pH initial neutre avec une bonne agitation de 50rpm pour une durée de fermentation 48 heure. La composition optimale du milieu de culture donnant le meilleur rendement en éthanol est la suivante :

- le glucose est la source de carbone (C) et d'énergie choisie avec une concentration optimale de 20 g/L,
- le chlorure d'ammonium est la source d'azote (N) optimale.
- La concentration optimale en chlorure d'ammonium est de 2g/L,
- le rapport optimal (C/N) est donc de 19,
- l'inoculum optimal est de 4g/L,

Dans ces conditions, *Saccharomyces cerevisiae* produit l'éthanol avec un rendement de 0,7 g /g de Glucose, source de carbone et d'énergie principale. L'éthanol étant un métabolite primaire, sa production est étroitement liée à la croissance de *Saccharomyces cerevicea*.

L'avantage de notre étude est l'obtention d'un produit 100 % biologique, dont l'utilisation comme carburant respecte l'environnement et ne porte pas d'atteintes écologiques.

Les résultats pourront être complétés par la suite sur divers axes; notamment :

- l'étude de l'effet des concentrations des composés du milieu sur la cinétique, la croissance et la production, éventuellement la source de carbone et les éléments minéraux. Dans ce cadre, nous insistons sur l'usage de source de carbones naturelles et plus complexe tels que : l'amidon de mais, de blé, de déchets de pain….. dans cas, notre étude constitue un support intéressant, du faite que le glucose constitue le résultat de l'hydrolyse de ces polysaccharides.

- la modélisation des cinétiques de croissance et de production.
- la production de bioéthanol avec modification génétique du microorganisme.
- La distillation et la purification du distillat avec des techniques plus modernes et plus efficaces.
- l'étude de l'influence des facteurs économiques et énergétiques sur ce procédé ainsi que son impact social et sur l'environnement.

Référence bibliographiques

Bibliographie :

A

- Ansanay Galéote V, Blondin B, Dioxin S, Sablayrolles JM Stress effet of éthanol on Fermentation by stationary phase saccharomyces cerevisiae. biotechnologie Lettrent (2001) 23:677-68

B

- Bai. F.W. et al., Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feed stocks, Biotechnologie Advances, (2008) 26, 89–105 .

- Balat. M. et al., Progress in Energy and Combustion Science, nos arguments en faveur du bioéthanol France Betteraves, (2008) 34, 551–573.

- Barceloux D. G., Bond G. R. et al. « American Academy of Clinical Toxicology Practice Guidelines on the Treatment of Methanol Poisoning », Clin. Toxicol., vol. 40, no 4, 2002, p. 415-446 (DOI 10.1081/CLT- 120006745).

- Bataillon M, Rico A, Sablayrolles JM, Salmon JM, Early thiamine assimilation by Yeasts Under enological conditions : impact on fermentation kinetics Barre P (1996).

- Belyï, Sablayrolles. JM, De création of alcoholic fermentation kinetics: It variability anion tex est. American Journal of Enology and Viticulture, Barre. P (1990) 41 (4), 319-324.

- Boulal. A, Benali. B, Moulay. M et Touzi. A, 'Transformation des Déchets des Dattes de la Région d'Adrar en Bioéthanol , Revue des Energies Renouvelables, Vol. 13. N°3, pp. 455 -465, 2010.

- Bourgeois et Levreau, Bourgeois C.M. Eleveur J.Y. Techn̈iques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 La voiser-Tec&Doc, 3, (p:6 9 (chapitre 1) (FIGURE 03) Paris.1991 .

- Boze, H. Moulin,G, and Galzy, P H.-J. Rehm, and G. Reed, Production of Microbial Biomass. In Biotechnology, eds. (Wiley-VCH Verlag GmbH), (2008). pp. 166 220. Journal of Fermentation and Bio engineering 82(2):145-150

C

- Cédric Malandain, mimoire fin d'etude pour l'obtention de deplome magister à l'Ecole Centrale de Lyon, 14h00, amphi 201.iter2) soutiendra sa thèse le 21 Décembre 2007

- Chaibe Hadjira mimoire fin d'etude pour l'obtentionde deplome de magister ,étude et conception d'une bioraffinerie pour la production de biocarburant de seconde génération soutiendra sa thèse Université Kasdi Merbah Ouargla 2010-2011

- Couper. A.S., « On a New Chemical Théorie », Philos. Maga., 4e série, vol. 16, 1858, p 104-116 (ISSN 1478-6435, lire en ligne).

D

- Dahlmann et .G.M. Schneider. Liquide-liquide phase equilibria and critical curve of (éthanol + dodecane or tetradecane or hexadecane or 2.2.4.4.6.8.8-heptamethylnonane) from 0.1 MPa to 120.0 MPa. J.chem.thermodynam.vol.21 n°.9 SEP 1989 P.997-1004

- Di Pardo. J, « Ethanol » « Outlook for Biomasse Ethanol Production and Demande », sur le site de l'Energie Information Administration (consulté le 14 mai 2012).

- Donnelly G. Mc et A. D. Russell, « Antiseptics and Disinfectants : Activity, Action, and Resistance », Clin. Microbiol. Rev., vol. 12, no 1, 1999, p. 147–179 (ISSN 0893-8512, PMCID PMC88911, lire en ligne [PDF]).

E

- E. Winkelhausen, E. Velickova, S. A. Amartey, and S. Kuzmanova, "Ethanol production using immobilizedSaccharomyces cerevisiaein lyophilized cellulose gel,"Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 162, no. 8, pp. 2214–2220, 2010

F

- Fodhel Benchaabane mimoire fin d'etude doctorat de sciences ecologique ,micobiologie et biocatalyse industrielles , INSA de Toulouse 30 mars

- Forbes. R. J, A Short History of the Art of Distillation: From the Beginnings Up to the Death of Collier Blumenthal, Leyden, Pays-Bas, Brill, 1970, 2e éd. (1re éd. 1948), 405 p. (ISBN 9789004006171, présentation en ligne, lire en ligne), p. 89.

H

-Hennell. H, « On the Mutual Action of Sulphuric Acid and Alcohol, with Observations on the Composition and Properties of the Resulting Compound », Philos.Trans. R. Soc., vol. 116, 9 mars 1826, p. 24.

- Henschke PA, Jiranek V Yeast-Metabolism of nitrogen compounds. In: Wine. Microbiology and Biotechnology (Fleet. G. H., Eds.). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, (1993), pp 77-165.

- Hunt V. D, The gasohol handbook, New York, Industrial Press, 1981, 580 p. (ISBN 9780831111373, presentation en ligne).

I

- Insa G, Sablayrolles JM, Douzal V. Alcoholic fermentation under enological Conditions. Use of a combination of data analysis and neural networks to predict sluggish and stuck fermentations. Bioprocess Engineering (1995).13:171-176.

L

- Larpent J P, Biotechnologie des levures Masson, P 132 315 . Paris1990.
- Larpent. J.P. Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. p. 97-127. (p: 11 chapiter1)(p: 14-25chapiter2) Paris: (1991).

- Larpent. G and Sanglier. J. Biotechnologies. Principes et méthodes, p:574-581. (10 chapiter1) (1992).

- Leclerc. H, Meyer. A et Diana. J. Cours de microbiologie générale.Nouveau program Biosciences et Techniques .Doin éditeurs, (5-10 CHAPITER 1) (p: 16 chapiter2) Paris: (1995)

- Logsdon. J. E, Kirk. O. Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, 2004 (ISBN9780471238966, DOI 10.1002/0471238961.0520080112150719.a01.pub2,lire en ligne),

M

- Mc Govern. P. E., Zhang. J, « Fermented beverages of pre- and proto-historic China », Proc. Natl. Acad. SCI. USA, vol. 101, no 51, 21 décembre 2004, p. 17593-17598 (ISSN 0027-8424, PMID 15590771, PMCID PMC539767, DOI 10.1073/pans.0407921102, lire en ligne)

- Mohan D, Pittman CU, Steele PH, Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review, Energy Fuels, (2006) 20 ,848–89

- Moss G,P (dir)" basic terminology of stereochemistry" pure appl chem. ,IUPAC vol 68 nol 12 1996 ,p 2193-2222 (ISSN 0033-4545 et 1365-3075,DOI10.1351/pac199668122193).

N

- Noui. Y, Optimisation de la production de la biomasse Saccharomyces cerevisiae cultivée sur extrait de datte. Mémoire d'ingénieur institut d'agronomie ,Batna 2001.p 3…5-6-12-14-17-20-40-58.

- Novo MT, Beltran G, Torija MJ, Poblet M, Rozes N, Guillamon JM, Mas A Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations. International Journal of Food Microbiology (2003) 86 (1-2):153-161

O

- Oteng- Gyang K. Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation La voisiez, Paris. (1984) 8, (p:4 chapitre 1) .

P

- Parrou JL, Enjalbert B, Plourde L, Bauche A, Gonzalez B, Francois JM Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in Saccharomyces cerevisiae. Yeast (1999) 15(3):191-203

- Pohorecky. L.A et Brick. J. « Pharmacologie of éthanol ». Pharmacology et Therapeutics., vol. 36, n° 2-3, 1988, p. 335–427

R

- Reichardt et Welton.T. Wenham, Wiley-VCH, Solvents and solvents effects in organic chemistry, 2010, 4e éd. p. 692 (ISBN 9783527324736) Doi (10.1002/9783527632220) Presentation en ligne , Ap-pendix.p.568.

- Revuz B.M., Yeast production on molasses .In: Microbiology and food industry. Tome IV. (ED)APRIA. Proceeding of the international congress, 7THto12THOctober Paris, (P: 23 chapiter 2),PP 113-121,1979.

- Roustan JL, Sablayrolles JM Role of trehalose and glycogen in alcoholic fermentation in winner-making conditions. Journal of Wine Research 15:189-202 (2004)

S

- Salmon JM, Vincent O, Mauricio JC, Bely M, Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in Saccharomyces cerevisiae as a major factor of enological fermentations. American Journal of Enology and Viticulture Barre P (1993) 44 (1) p :56-64

- Shvets Y. B., Washington station : my life as a KGB spy in American, New York, Simon & Schuster, 1995, 298 p. (ISBN 9780671883973).

- Sofiane Khalil Sid-Ahmed et Benhadj- Tahar Boualem. Valorisation du lactosérum en vue de fabrication de levure de boulangerie Saccharomyces Cerevisiae. 1998. p 3-7-13-16-35-38.

T

- Tesfaw. A and Assefa. F. Current Trends in Bioethanol Production by Saccharomyces cerevisiae: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. International Scholarly Research Notices Volume 2014, Article ID 532852, p ,1-11.

W

- Wiertz Jean-Luc., Le bioraffinage ou valorisation optimale de la biomasse, Val Biome (2010).
- Windholz. M. The Merck index: An Encyclopedia of Chemicals and Drugs, vol .9, Merck 1976, 9^{e}éd, 1835 p.

Y

- Ylitervo. P, Franzen. C.J, and Taherzadeh. M. J, "Ethanol production at elevated temperatures using encapsulation of yeast,"Journal of Biotechnology, vol. 156, no. 1, pp. 22–29, 2011.

Z

- Zerarka T.C., Méthodes Spectroscopiques d'analyses chimiques. Ed .O.P.U, Alger, Algérie, 1994.

- **Sites:**
- **-Site 1: « A Brief History of Rocketry »**, sur le site Kennedy Space Center (Consulté le 27 mai 2012).
- -**Site 2:** Encyclopédie Britannica**, « Alcohol »**, 1911(Consulté le 12 mai 2012).
- **-Site 3 :** FAO 2003.sur le site (WWW.FAO.COM)
- -**Site 4 :** http://fr.wikipidia.org/wiki/saccharomycescerevisiae,30 mars 2011
- **Site 5 :** « Rocket Propellants », sur le site The Internet Encyclopédie of Science (consulté le 27 mai 2012)..
- -**Site 6** : SNPAA ,Passion Céréales Le 13 novembre 2007.