الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
Département du Génie des procèdes et environnement



Mémoire de Fin d'Études

Présenté pour l'obtention du Diplôme
de Master en Génie des procèdes

***Option* : bioprocédés pharmaceutiques**

THEME

Valorisation des sous produits polysaccharidiques pour la production de bioéthanol

Proposé et dirigé par

Dr.tassist. A

Préparé et présenté
Par
Bennia Nesrine

Abdesselam Imen

2015-2016

REMERCIEMENTS

Nous tenons avant tout de remercier le bon DIEU « ALLAH » *qui nous a donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce modeste travail.*

C'est grâce au soutien permanent et aux encouragements de plusieurs personnes que ce travail a pu être réalisé. Je tiens sincèrement à les remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier très vivement MADAME« TASSIST .A » *docteur à l'université de Médéa d'avoir accepter de diriger ce travail et pour l'intéressante documentation qu'elle a mise à notre disposition, pour ses conseils spéciaux et pour toutes les commodités et aisances qu'elle nous a apporté durant notre étude de ce projet.*

Nos vifs remerciements s'adressent également à tous les membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :

- *Monsieur Abouseoud .M ,qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de soutenance .*
- *Madame Arbia.W ,pour avoir d'accepter d'examiner ce travail .*

Nous n'oublions pas de remercier toute l'équipe du Hall technologique ,en particulier madame Bouaissa .N , Mlle Fergani.R d'avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de ce travail .

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

Dédicace

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

A Ceux qui m'ont toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études qui m'ont guidé Dans le droit chemin qui m'ont appris que rien n'est impossible. Merci pour votre amour et votre confiance totale...A vous ***très chers parents*** *qui je requiers mon* ***Dieu*** *à préserver votre santé, votre joie et longue vie*

A mon cher frère : ***Djamel***

A mes chères sœurs : ***Manel , Hiba et Kaouter*** *.*

A mes ***grands parents*** *que Dieu les protèges et toutes les familles* ***Abdesselam*** *et* ***Youcef-Ezzine.***

A mon compagne de ma vie. Mon mari inchaa ellah ***Amine.***

A mes oncles et mes tantes et leurs familles.

A mon binôme : ***Nesrine***

A mes chères amies : ***Assia , Imen, Werda.*** *Pour tous les moments que nous avons partagés.*

A toute la promotion de ***Génie des procédés / Bioprocédé pharmaceutique*** *2015/2016.*

A tout ce qui connait ***IMEN*** *de proche ou de loin.*

Dédicace

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

A Ceux qui m'ont toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études qui m'ont guidé Dans le droit chemin qui m'ont appris que rien n'est impossible. Merci pour votre amour et votre confiance totale...A vous ***très chers parents*** *qui je requiers mon* ***Dieu*** *à préserver votre santé, votre joie et longue vie*

A ma chère sœur: ***Houda*** *qui je l'ambitionne un heureux mariage*

A mon cher frère : ***wassim***

A mes ***grands parents*** *que Dieu les protèges et toutes les familles* ***Bennia et Atchi***

A mes oncles et mes tantes et leurs familles.

A mon binôme : ***Imen***

A mes chères amies : ***faiza ,ilhem,imen*** *Pour tous les moments que nous avons partagées*

A toute la promotion de ***Génie des procédés/ Bioprocédé pharmaceutique*** *2015/2016.*

A tout ce qui connait ***Nesrine*** *de proche ou de loin.*

Résumé :

L'objectif de ce travail est la production de bioéthanol sur de l'amidon et les produits amylacés(eau de riz et farine de maïs) par fermentation alcoolique en utilisant *Saccharomyces cerevisiae*. Le substrat subit une liquéfaction par l'alpha amylase puis une saccharification par la glucoamylase avant fermentation. La liquéfaction est exercée dans les conditions suivantes : 30g/L d'amidon, pH6, T°=55°C, 0,12U.CEIP/ml. La saccharification est exercée dans les conditions suivantes : pH4, T°=50°C, 640mg/Lde glucoamylase. Dans ces conditions une fermentation aboutit à sa production maximale (16g/L à 17g/L) (R=0,55g d'éthanol/g d'amidon) au bout de 20h à 24h. Le rendement obtenu avec les produits amylacés est plus faible (0,23g d'éthanol/g d'amidon pour la farine de maïs et 0,083 g d'éthanol/g d'amidon pour l'eau de riz).

Abstract :

The objective of this work is the production of bioethanol on starch and starch products (rice water and corn flour) by alcoholic fermentation using Saccharomyces cerevisiae. The substrate undergoes liquefaction by alpha amylase followed by saccharification using glucoamylase before fermentation. Liquefaction is carried out under the following conditions: 30g / L of starch, pH 6, T ° = 55 ° C, 0,12U.CEIP / ml. Saccharification is conducted in the following conditions: pH 4, T ° = 50 ° C, 640mg / L of glucoamylase. Under these conditions a fermentation results in full production (16g / L to 17g / L) (R = 0.55 g ethanol / g starch) after 20h to 24h. The yield obtained with the starch products is lower (0.23 g ethanol / g starch) for the corn flour and 0.083 g ethanol / g starch for rice water.

الملخص :

الهدف من هذا العمل هو إنتاج الإيثانول من النشا ومنتجات النشا (ماء الأرز ودقيق الذرة) عن طريق التخمير الكحولي باستخدام " خميرة الخبز" المتفاعل يخضع لتمييع من قبل "ألفا اميلاز" تليها تسكرباستخدام"غلوكوأميلاز" 'قبل التخمر . وتتم عملية التمييع تحت الشروط التالية : 30 غ/ل نشاء , الرقم الهيدروجيني= 6 , 0.12 وحدة/مل, درجة الحرارة = 55درجة سلزيوس

ويحدث التسكرفي الشروط التالية:: 64مغ/ل من غلوكوأميلاز , الرقم الهيدروجيني =4 , درجة حرارة =50 درجة سلزيوس

في ظل هذه الظروف تكون نتائج التخمير في الإنتاج الكامل : (16 غ/ل – 17 غ/ل) (المردود : 0.55غ إيثانول /غ النشا) لمدة 20 سا – 24سا. المردود المتحصل عليه من منتجات النشاء ضعيف (0.23 غ إيثانول /غ النشا لدقيق الذرة و 0.083 غ إيثانول /غ النشا لماء الأرز).

Liste des abréviations

- **C** : Carbone
- **H** : Hydrogène
- **O** : Oxygène
- **T** : Température
- **Vol** : Volumique
- **Pas** : pascal
- **J** : Joule
- **°C** : degré Celsius
- **K** : Kelvin
- **µm**: micromètre
- **α** : Alpha
- **β :** Beta
- **γ :** Gama
- **CEIP** : Centre d'Évaluation et d'Information de la Pharmacodépendance
- **nm :** Nanomètre
- **h :** heure
- **N** : Normalité
- **AE** : Activité Enzymatique
- **rpm**: Rotation Par Minute
- **C_0** : Concentration Initiale
- **C_f** : Concentration Finale
- **[ ]** : La Concentration
- **V_i** : Vitesse Initiale
- **R^2** : Coefficient De Corrélation
- **S** : Substrat
- **V_{max}** : Vitesse Maximal
- **K_m** : Constante de Michaelis
- **ES** : Complexe Enzyme-Substrat
- **DO** : Densité Optique
- **IR** : Indice de Réfraction
- **d** : densité
- **T %** : Titre massique
- **ρ :** Masse Volumique
- **m :** masse
- **R :** Rendement

Liste des figures

Figure 1 : Molécule d'alcool éthylique : modèle moléculaire et formule développée **04**

Figure 2 : Evolution de la production mondiale d'éthanol carburant…….... **08**

Figure 3 : Structure de *Saccharomyces cerevisiae*……... **09**

Figure 4 : représente la reproduction asexuée…….. **10**

Figure 5 : Cycle de reproduction de la levure ……. **11**

Figure 6 : Schéma de la glycolyse……... **14**

Figure 7 : les équations de la glycolyse **..... 15**

Figure 8 : Ethanol de 1ère et 2ème génération…… **16**

Figure 9 : Les grandes étapes de production du Bioéthanol à partir des plantes saccharifères et les plantes amylacées……..... **17**

Figure 10 : Recyclage des sous-produits de l'industrie sucrière dans la production du Bioéthanol……..... **18**

Figure 11 : Procédé de production du Bioéthanol à partir des plantes des céréales… **20**

Figure 12 : Polymorphisme des grains d'amidon ……... **21**

Figure 13 : Structure de l'amylose et l'amylopectine…….. **22**

Figure 14 : Montage de distillation utilisé……... **35**

Figure 15 : Effet du pH sur l'activité de l'alpha amylase……... **36**

Figure 16: Effet de la température sur l'activité enzymatique de l'alpha amylase…. **37**

Figure 17 : Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'alpha amylase à 65°C…….. **38**

Figure 18 : Courbe de Michaelis Menten à 65°C : Evolution la vitesse initiale (Vi) en fonction de la concentration initiale en amidon……... **38**

Figure 19: Représentation graphique de Lineweaver-Burk à 65°C……. **39**

Figure 20 : Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'alpha amylase à 55°C…….. **39**

Figure21 : Courbe de Michaelis Menten à 55°C : Evolution la vitesse initiale (Vi) en fonction de la concentration initiale en amidon……... **40**

Figure22 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk à 55°C……. **40**

Figure 23 : représente l'effet du volume d'enzyme sur l'hydrolyse d'amidon…… **43**

Figure 24: Taux d'éthanol et de pH enregistrés au cours du protocole B……... **44**

Figure 25 : Taux d'éthanol et de pH durant la phase de fermentation du protocole C **46**

Figure 26 : taux de production obtenus par les trois protocoles…….. **47**

Figure 27 : Optimisation de la saccharification……... **48**

Figure 28: Taux d'éthanol produit avec les deux concentrations de la Glucoamylase **48**

Figure 29 : Cinétique de la fermentation dans les conditions optimales……. **49**

Figure 30 : Production d'éthanol à partir de deux sources d'amidon non soluble….. **51**

Figure 31: Résultat de la révélation au dichromate de potassium……... **52**

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

Figure 33 : Spectre du distillat……. **53**

Figure 34 : Cinétique des deux échantillons d'enzymes fournis par SAIDAL…… **Annexe2**

Figure 35 : Courbe d'étalonnage destinée au dosage d'amidon par spectrométrie….. **Annexe3**

Figure 36 : Courbe d'étalonnage destinée au dosage de glucose par spectrométrie… **Annexe3**

Figure 37 : Courbe d'étalonnage destinée au dosage de l'éthanol par mesure de la densité et de l'indice de réfraction…… **Annexe3**

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques principales de l'éthanol…….. **04**

Tableau 2 : Avantage et Inconvénient de l'éthanol…… **05**

Tableau 3 : Variation des teneurs en amylose et amylopectine selon l'origine botanique…….. **22**

Tableau 4 : Plage de gélatinisation de l'amidon en fonction de son origine..... **23**

Tableau 5 : Propriétés de quelques alpha amylases…… **24**

Tableau 6 : Résultats du Protocole de production A……... **44**

Tableau 7: Résultats du Protocole C : liquéfaction et saccharification……... **45**

Tableau 8 : Préparation des solutions tampons……... **Annexe1**

Sommaire

Introduction Générale ...……01

Partie théorique

I L'éthanol ……03

I-1 Définition ……..03

I-2 Propriétés ……..03

I-3 les avantages et les inconvénients de l'éthanol (Ben Chaaebane) ……..04

I-4 Utilisation de l'éthanol ……06

I-4-1 Carburant ……..06

I-4-2 Boissons alcoolisées ……06

I-4-3 Matière première ……...06

I-4-4 Antiseptique ……...06

I-4-5 Solvant……06

I-4-6 En médecine ……07

I-5 La production de l'éthanol ……...07

II Le bioéthanol ……08

II-1 Le microorganisme producteur (*Saccharomyces cerevae*) ……08

II-1-1 Classification ……..09

II-1-2 Morphologie et Cytologie ……..09

II-1-3 La reproduction ……10

II-1-4 Les besoins nutritionnelles ……11

- ***Sources de carbone* ……11**
- ***Sources d'azote* ……...12**
- ***Oligoéléments et facteurs de croissance*……..12**

II-1-5 Les conditions physicochimiques de croissance ……12

- ***La température* ……..12**
- ***Le pH* ……12**
- ***La pression osmotique et l'activité d'eau*……12**
- ***L'oxygène* ……13**

II-1-6 Métabolisme ……....13

- ***En présence d'air* ……....13**

- ***En absence d'air*……..15**

II-2 Les procédés de production du bioéthanol ……..15

II-2-1 L'éthanol de première et de seconde génération ……..……..15

II-2-2 Substrats et procédés de production de l'éthanol de 1ère génération……...17

- *A partir des plantes saccharifères* ……....17

- *A partir des plantes amylacées* …….…..19

II-2-3 L'amidon ……..20

- **Structure ……21**
- **Propriétés hydro-thermiques de l'amidon ……..23**
- **Les réactions de transformation enzymatique de l'amidon ……..23**

Partie pratique

Matériel et méthodes

I- Matériel ……26

I-1 Verreries ……26

I-2 Réactifs, produits et solutions ……..26

I-3 Equipements ……27

I-4 Matériel biologique ……..27

II- Méthodes ……..28

II-1 Caractérisation de l'α-amylase ……28

II-1-1 Effet de pH ……28

II-1-2 Effet de la température ……28

II-1-3 Effet de la concentration en substrat ……..29

II-1-4 Effet du volume de l'enzyme……29

II-2 Production du bioéthanol avec de l'amidon soluble…….30

Protocole de production A ……..31

Protocole de production B ……..31

Protocole de production C ……..31

II-3 Applications 1 : Production du bioéthanol avec de l'amidon peu soluble …….32

II-4 Application 2 : Production du bioéthanol avec de l'amidon non soluble ……..33

II-4-1 Production à partir de l'eau de Riz ……..…..33

II-4-2 Production à partir de la farine de maïs ……34

II-5 Séparation de l'éthanol par distillation……34

II-6 Analyse de l'éthanol récupéré……34

- Le test au dichromate de potassium …..……34

- Spectrophotométrie infrarouge ……35

Résultats et discussion

I Caractérisation de l'α-amylase ……36

I-1 Effet du pH ……..……36

I-2 Effet de la température ……37

I-3 Effet de la concentration du substrat ……38

- ***Cinétique à 65°C ……38***
- ***Cinétique à 55°C ……..….49***

I-4 Effet du volume d'enzyme ……..……43

II Production du bioéthanol avec de l'amidon soluble…….43

II-1 Protocole de production A ……..…….43

II-2 Protocole de production B ……..…….44

II-3 Protocole de production C ……..…….45

II-4 Comparaison entre les 3 méthodes ……46

II-5 Optimisation de la concentration en Glucoamylase ……..…….47

III Application 1 : Production du bioéthanol avec de l'amidon peu soluble ……49

IV Application 2 : Production avec de l'amidon non soluble ……..50

V Séparation et analyse de l'éthanol récupéré par distillation ……51

V-1 Identification au dichromate de potassium ……51

V-2 Identification par spectroscopie infra rouge ……...….52

V-3 Détermination du titre massique du distillat ……..53

Conclusion Générale……..……..55

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction Générale

A l'heure actuelle, le monde souffre de la diminution des ressources en énergies non renouvelables d'un coté et l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre d'un autre coté; pour cela sa préoccupation est grandissante vis-à-vis de la découverte de sources d'énergie alternatives aux carburants fossiles durables et non nuisibles **(Ferland, 2008)**.

Le bioéthanol ou éthanol biologique est une nouvelle source d'énergie. Elle pourrait être produite par fermentation alcoolique à partir de matières renouvelables, abondantes dans la nature (matières cellulosiques, amylacées et sucrières) donnant un biocarburant non polluant puisque sa combustion ne contribue pas à l'effet de serre **(Ben chaaebane)**.

La production du bioéthanol à l'échelle mondiale est passée de 30 milliards de litres à 46 milliards de litres entre les années 2000 et 2005, soit une augmentation de plus de 50%. **(kacimi, 2008)**. Au Brésil, aux États-Unis et dans les pays européens, les perspectives du développement sont claires. L'éthanol est la première source d'énergie renouvelable qui prend une place aussi importante sur l'échiquier des carburants. Le marché mondial du bioéthanol est un marché partagé entre le Brésil et les États-Unis qui détiennent respectivement 52 % et 43 % de la part du marché, les 5 % restants sont partagés entre l'Europe et l'Asie essentiellement **(Ben Chaaebane)**.

Notre pays, bien qu'il soit producteur de carburants fossiles, il porte un intérêt timide mais de plus en plus important vis-à-vis des énergies renouvelables. La production du bioéthanol est actuellement non appliquée sur terrain.

L'objectif de ce travail est de produire du bioéthanol par fermentation alcoolique en utilisant *Saccharomyces cerevisiae* comme microorganisme producteur et de l'amidon avec les sous produits amylacés comme source de carbone et d'énergie. Pour cela, nous nous sommes intéressés principalement à la préparation du substrat destiné à la fermentation en optimisant les conditions d'hydrolyse enzymatique qui permettent d'obtenir un substrat fermentescible donnant un rendement maximale de production au cours de la fermentation.

La première partie de ce mémoire consiste à une étude bibliographique qui vise à définir le bioéthanol, à expliquer son intérêt, et présenter le microorganisme producteur le plus repandu dans la production du Bioéthanol.

Dans la deuxième partie de notre étude nous avons entamé l'aspect expérimental qui se déroule en trois volets :

I-Une caractérisation de l'alpha amylase, enzyme responsable de la liquéfaction de notre substrat en précisant les conditions optimales de sa catalyse enzymatique (pH, Température, concentration du substrat et concentration de l'enzyme).

II-Une production du bioéthanol à partir de trois différentes qualités d'amidon :

- A partir de l'amidon soluble en passant par un schéma d'optimisation constitué de trois protocoles. Les deux étapes étudiées dans cette partie sont la saccharification et la fermentation.
- A partir d'un amidon peu soluble en appliquant le protocole optimisé sur l'amidon soluble,
- A partir de deux produits amylacées non solubles : la farine de maïs et l'eau de riz.

III-Une séparation du bioéthanol produit par distillation, puis une caractérisation visant son identification et sa quantification.

PARTIE THÉORIQUE

I L'éthanol :

I-1 Définition :

L'éthanol, l'alcool ou encore l'alcool éthylique sont toutes les trois des appellations qui désignent la même molécule qui est composée de deux atomes de carbone (C), six atomes d'hydrogène (H) et d'un atome d'oxygène (O). Les formules brutes et semi-développées de la molécule d'éthanol sont respectivement le C_2H_6O, le C_2H_5OH et le CH_3-CH_2-OH **(Figure 1)**. **(Kacimi, 2008).** La formule développée de ce composé qui fait apparaître toutes les liaisons covalentes entre tous éléments chimiques constituants la molécule est représentée sur la **(Figure 1) (Site 1)**.

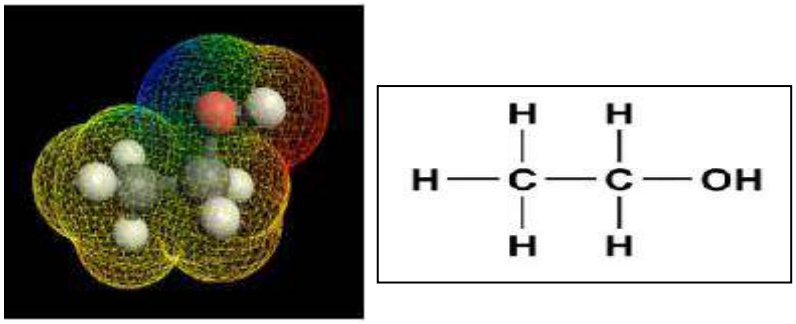


Figure 1 : Molécule d'alcool éthylique : modèle moléculaire et formule développée.

(Kacimi, 2008, Site 1)

I-2 Propriétés :

L'éthanol est un liquide volatil, incolore, il a une odeur agréable, il est miscible à l'eau mais également aux alcools, l'éther éthylique, le benzène et la plupart des solvants organiques. C'est par ailleurs, un bon solvant des graisses et de nombreuses matières plastiques.

L'éthanol est un produit combustible, il brule en donnant avec l'air, de l'eau et de l'anhydride carbonique. C'est un produit très inflammable dont les vapeurs peuvent former des mélanges explosifs avec l'air. Les principales propriétés physiques de l'éthanol sont représentées sur le **(Tableau 1) (Saihia, 2014)**.

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques principales de l'éthanol

(Pohorecky et Brick, 1988; Larpent 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^{20} 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 les avantages et les inconvénients de l'éthanol (Ben Chaaebane):

L'éthanol présente des avantages et des inconvénients qui sont résumés sur le **(Tableau 2)**.

Tableau 2 : Avantage et Inconvénient de l'éthanol **(Ben Chaaebane)**

Avantages	Inconvénients
Moins d'émissions de dioxyde de carbone (CO_2) fossile que les carburants conventionnels	Son indice de cétane étant moins élevé que celui du diesel, le bioéthanol ne convient pas comme carburant propre pour les moteurs diesels conventionnels, à moins qu'un accélérateur d'ignition ne soit ajouté.
Haut indice d'octane, permettant un fonctionnement plus efficace des moteurs à allumage par étincelle	Emissions très élevées d'hydrocarbures par évaporation (environ 15% pour l'E10G), ce qui requiert un réglage de la pression de vapeur de l'essence de base à laquelle l'éthanol est ajouté.
Moins d'émissions de particules	La pression de vapeur étant basse et la chaleur latente d'évaporation de l'éthanol élevée, le démarrage à froid peut être plus difficile dans les climats plus froids, à moins que l'éthanol ne soit mélangé à de l'essence ou qu'une autre aide au démarrage ne soit utilisée.
Moins d'émissions non réglementées de benzène et de butadiène 1-3 ; les taux de benzène diminuent à mesure que la concentration d'éthanol dans l'essence augmente.	Sa combustion entraîne une formation accrue d'acétaldéhyde, mais les émissions de formaldéhyde formique sont moindres par rapport à l'essence
Risque moins élevé de formation d'ozone que l'essence et le diesel	Sa capacité lubrifiante peu élevée peut provoquer une corrosion du moteur
Pas de teneur en soufre	Problèmes de stabilité de phase dans le mélange d'essence en cas de présence d'eau
Biodégradable	La combustion de l'éthanol pur produit une flamme invisible qui peut provoquer des problèmes de sécurité
Moins toxique que le méthanol ou le biométhanol	Les véhicules E85G produisent des émissions non réglementées plus élevées (éthylène et acétaldéhyde) que les véhicules à essence
Il a été démontré que les véhicules à un seul carburant et les véhicules tous carburants, à moteurs à démarrage par étincelle alimentés en bioéthanol, présentaient un rendement énergétique plus élevé que les moteurs à essence.	Lorsque l'éthanol non brûlé (E95D) réagit sur la surface du catalyseur, il peut s'échapper une odeur de vinaigre. Cette situation s'est améliorée avec la nouvelle génération de catalyseurs.
Rendement à indice d'octane élevé pour un coût relativement réduit.	

I-4 Utilisation de l'éthanol :

I-4-1 Carburant

L'idée d'utiliser l'éthanol comme carburant a été conçue par Henry Ford, quand il développait sa première automobile. Aux États-Unis, l'utilisation du mélange Essence-Ethanol a débuté vers la fin des années 1970, et a contribué à réduire les émissions du monoxyde de carbone tel que requis par le « Clean Air Act » de 1990. Le Brésil est aussi un des grands utilisateurs de l'éthanol en ce qui concerne le carburant automobile. L'éthanol peut également être utilisé comme carburant de fusées et d'avions légères. **(Hugues, 2015; Daho, 2008)**.

I-4-2 Boissons alcoolisées

L'éthanol est le principal constituant psycho-actif que l'on trouve dans les boissons alcoolisés, avec des effets sur le système nerveux. La majorité des boissons alcoolisés sont soit fermentés, soit spiritueuses. Dans les boissons fermentées, il ya les bières, les vins et les cidres. Les boissons spiritueuses telles que le Whiskey sont produites par distillation des boissons fermentées **(Birckel, 2011)**.

I-4-3 Matière première

L'éthanol est considéré comme un produit chimique de base pour d'autres composés organiques. On l'utilise pour la préparation des amines, des esters éthyliques, des halogénures d éthyle,….etc **(kacimi,2008)**.

I-4-4 Antiseptique

L'éthanol est utilisé dans le domaine médicale comme antibactérien, antifongique, antiviral et comme solution de lavage pour les mains **(Rhayour, 2002)**

I-4-5 Solvant

L'éthanol se mélange avec l'eau et peut être un bon solvant. On le retrouve dans l'industrie des parfums, des matières colorantes et dans l'industrie des peintures et des vernis ….ect. **(Khan, 2010)**

I-4-6 En médecine

Auparavant, l'éthanol permettait de traiter le problème de la dépression et comme anesthésique **(Rassaert, 2012)**.Actuellement, on utilise l'éthanol pour provoquer la nécrose dans les tumeurs. L'éthanol permet de traiter l'intoxication au méthanol et éthylène glycol. **(Rhayour, 2002)**.

I-5 La production de l'éthanol :

L'éthanol peut être produit industriellement à partir de la pétrochimie par hydratation de l'éthylène, ou par la fermentation alcoolique par les levures, on parle dans ce cas du bioéthanol.

La catalyse chimique directe consiste à une hydratation par catalyse acide de l'éthylène, suivant la réaction:

$$H_2C{=}CH_2{+}H_2O \longleftrightarrow CH_3CH_2OH$$

Le catalyseur le plus communément utilisé est l'acide phosphorique, adsorbé sur un support poreux comme le gel de silice. Une augmentation de la température (250 à 300°C, sous haute pression) aide à déplacer l'équilibre vers la production de l'éthanol. La catalyse chimique indirecte consiste à estérifier l'éthylène par l aide sulfurique pour produire du sulfate d'éthyle, qui est ensuite hydrolysé pour donner de l'éthanol et de l acide sulfurique, qui sert donc de catalyseur lors de cette réaction:

$$H_2C{=}\ CH_2\ {+}H_2SO_4 \longleftrightarrow CH_3CH_2SO_4H$$

$$CH_3CH_2SO_4H + H_2O \longleftrightarrow CH_3CH_2OH + H_2SO_4$$

Ce produit consomme de grandes quantités d'acide sulfurique et nécessite en entrée un mélange gazeux de bonne qualité **(site 2)**.

La production du Bioéthanol par les méthodes biologiques fermentaires est plus respectueuse de l'environnement et sa combustion est plus propre que celle de l'essence ou du diesel **(Ben Chaaebane)**.

L'augmentation de la production d'éthanol carburant **(Figure 2)** est devenue presque exponentielle depuis l'an 2000. Cette tendance devrait être conservée au moins jusqu'en 2015 suite à **(Riess, 2012)**:

- ✓ l'augmentation du prix du pétrole et à son instabilité.
- ✓ l'augmentation des demandes énergétiques des pays émergeants.
- ✓ la diminution des réserves de pétrole.
- ✓ l'intérêt environnemental de l'utilisation d'éthanol carburant.

- ✓ l'instabilité politique des régions productrices de pétrole.

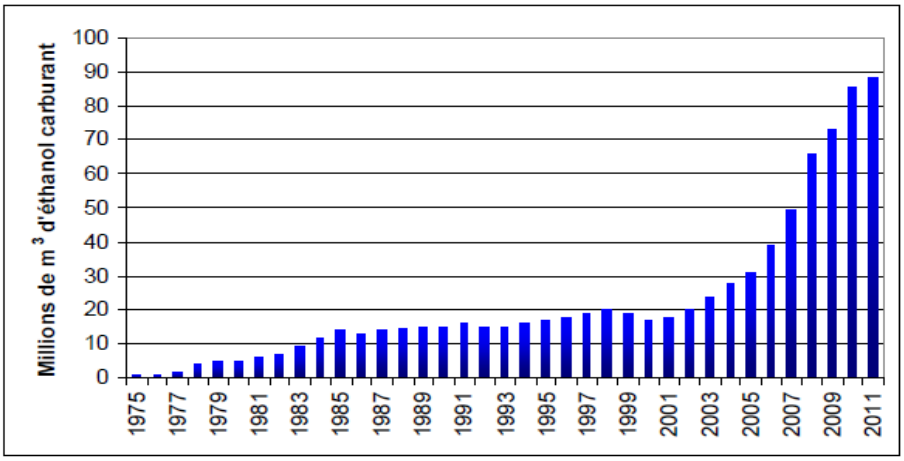


Figure 2 : Evolution de la production mondiale d'éthanol carburant

(Riess, 2012)

II Le bioéthanol :

Le bioéthanol est un éthanol produit par fermentation de la fraction biodégradable des déchets et résidus provenant de l'agriculture, de la sylviculture et de ses industries connexes, des déchets industriels et municipaux.

En Europe, le bioéthanol est produit à partir de céréales (blé, maïs...) ou de betteraves. Par un procédé de fermentation industrielle, le sucre contenu dans ces végétaux est transformé en alcool. Cet alcool (éthanol) est concentré puis déshydraté pour obtenir du bioéthanol. Au Brésil, le bioéthanol est produit à partir de la canne à sucre, et aux Etats-Unis, il est issu de la transformation du maïs **(Site 3)**.

II-1 Le microorganisme producteur (*Saccharomyces cerevisiae*):

La levure *S. cerevisiae* est un des microorganismes les plus utilisés dans le domaine des biotechnologies. Elle occupe une place privilégiée dans les activités industrielles ; car, elle est utilisée par l'homme depuis des millénaires dans l'industrie agroalimentaire comme agent de fermentation, pour la production des boissons et des produits fermentés (vin, bière, pain). De nos jours, la levure est également largement utilisée comme usine cellulaire pour la production de molécules d'intérêt : dans le domaine pharmaceutique et médical, elle est utilisée pour la production de vaccins, de probiotiques ou de protéines (insuline).

Elle joue également un rôle clé dans l'industrie chimique pour la synthèse de produits de commodité comme l'acide lactique pour la production des plastiques et dans le domaine des énergies renouvelables et des biocarburants (bioéthanol) **(Celton, 2011)**.

II-1-1 Classification (Benaouida, 2008):

Les levures Saccharomyces appartiennent au :

Règne ……	*Fungi*
Division (embranchement)……	*Ascomycota (Ascomycètes)*
Sous-division…….	*Saccharomycotina*
Classe……	*Saccharomycètes.*
Sous classe…….	*Saccharomycetidae*
Ordre……..	*Saccharomycetales.*
Famille……..	*Saccharomycetaceae.*
Genre…….	*Saccharomyces*

II-1-2 Morphologie et Cytologie :

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, ayant une forme sphérique ou ovale, d'une taille qui peut varier entre 1 et 9 µm en longueur et de 1 à 5 µm en largeur. Leur état physiologique et leur morphologie peuvent varier selon les conditions de l'environnement. **(Benaouida, 2008).**

Les levures présentent une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondries, d'un appareil de Golgi et de plus d'un chromosome (*Saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) **(Figure 3) (Labrecque, 2003).**

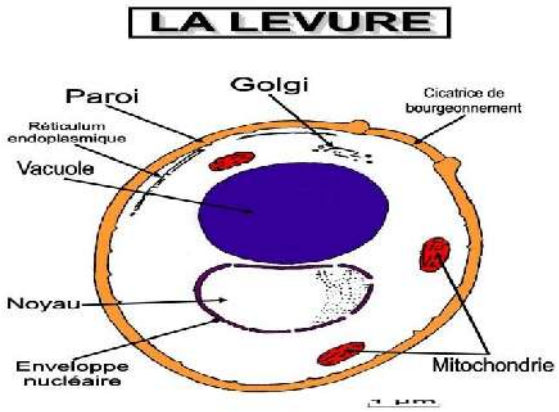


Figure 3 : Structure de *Saccharomyces cerevisiae*

(Benaouida, 2008).

II-1-3 La reproduction :

Les levures ont un mode de multiplication bien spécial. Elles se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu. De plus, les populations des levures connaissent un cycle de vie complexe, dans lequel on trouve alternativement des cellules haploïdes (n = 16 chromosomes) et des cellules diploïdes (2n = 32 chromosomes). Lorsqu'elles se trouvent dans des conditions favorables de culture (température, aération, pH, etc.), la reproduction asexuée est la forme majeure de multiplication. Elle s'effectue par bourgeonnement ou par fission (scissiparité) à partir d'une cellule mère **(Figure 4) (Benaouida, 2008)**.

Tant que l'environnement est favorable, le diploïde se multiplie par bourgeonnement. Si les nutriments viennent à manquer, la cellule repasse en phase haploïde par un processus de méiose. On obtient finalement quatre noyaux haploïdes qui sont inclus dans les spores (ascospores) contenues dans un sac appelé asque. L'enveloppe de l'asque se rompt à maturité et libère deux cellules haploïdes « *a* » et deux cellules haploïdes « *α* » qui peuvent recommencer le cycle **(Benaouida, 2008)**.



Figure 4 : représente la reproduction asexuée

(Benaouida, 2008)

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, il résulte deux cellules identiques.

Ces cellules (« *α* » et « *a* ») correspondent à des signes sexuels distincts. Elles ne se distinguent pas morphologiquement mais par la phéromone qu'elles produisent : MATa ou MATα.

Les phéromones libérées permettent l'amorce du processus de fécondation en se liant à un récepteur spécifique. Ensuite c'est la fusion entre une cellule « *a* » et une « *α* » qui donne naissance à une cellule diploïde « *a/α* » **(Amillastre, 2012)**.

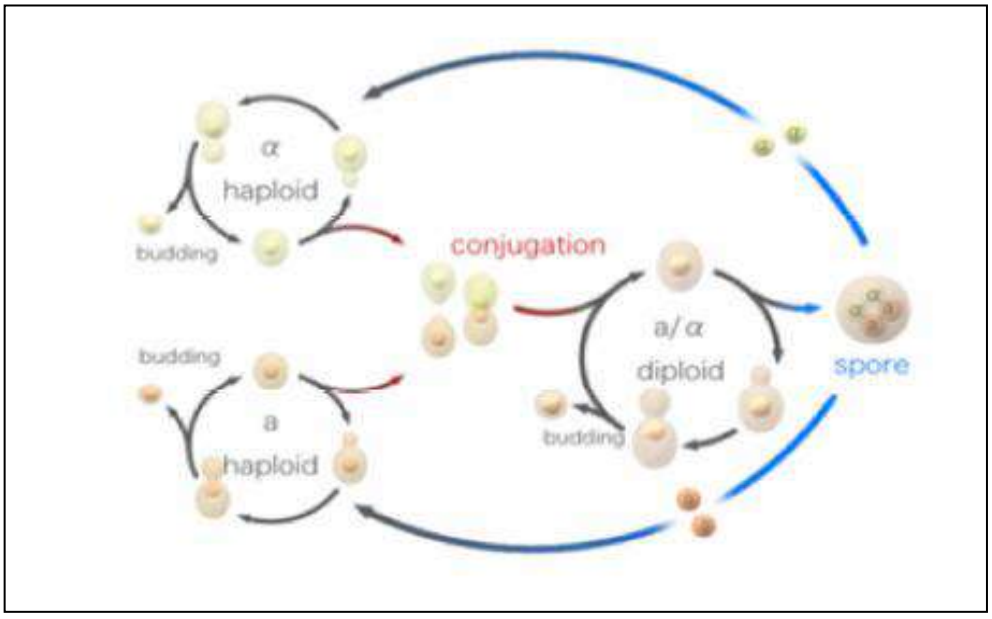


Figure 5 : Cycle de reproduction de la levure

(Leclerc, 1995)

II-1-4 Les besoins nutritionnelles :

Pour se maintenir, croître et se reproduire, la levure doit trouver dans son milieu externe les éléments nécessaires à la synthèse cellulaire.

- ***Sources de carbone :*** Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les champignons puisque elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques etc **)**.Les levures utilisent des sucres comme source principale de carbone et par conséquent d'énergie. Les sources les plus efficaces sont des oses (glucose, fructose et mannose) qui sont utilisables par plus de 400 espèces identifiées **.**D'autres levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles, elles sont capables d'oxyder des acides organiques et des alcools (éthanol, Glycérol) **(Aldiguier, 2006)**

- ***Sources d'azote :*** La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques pour la biosynthèse d'acides aminés, de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines. Les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre. Par ailleurs, l'assimilation des ions ammoniums est largement répandue chez ces dernières. Cependant, d'autres espèces se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés comme source d'azote (acides aminés, urée, biotine, base puriques et pyrimidiques) (**Aldiguier, 2006)**

- ***Oligoéléments et facteurs de croissance :*** Les levures ont besoin aussi de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations. De plus, d'autres facteurs sont essentiels comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique), qui interviennent lors des réactions enzymatiques, comme des coenzymes (**Aldiguier, 2006)**

II-1-5 Les conditions physicochimiques de croissance :

- ***La température :*** La température courante de culture des levures se situe entre 25 et 30°C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans leurs habitats naturels. En effet, la température maximale de croissance peut se situer entre 35°C et 45°C. D'autres levures peuvent se développer à 0°C ou à plus de 50°C pour *Candida sloofii*, *Saccharomyces telluris* et *Torulopsis bovina* **(Larpent, 1990).**

- ***Le pH :*** Les levures ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. Leur croissance optimale se fait à des pH entre 4,6 à 6,5 et beaucoup d'espèces tolèrent de grandes variations de pH. Elles peuvent s'adapter à des milieux acides (pH 2,8 à 3,0) ou alcalins (pH 8 à 8,5) **(Noui, 2001).**

- ***La pression osmotique et l'activité d'eau :*** La pression osmotique intervient également sur le développement des levures dont l'effet varie d'une souche à une autre. La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs (betaine, glycérol) **(Saihia, 2014)**

- ***L'oxygène :*** Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes. Certaines levures sont aérobies strictes comme les genres : *Rhodotorula, Lipomyces, Cryptococcus* etc. Les autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire (comme les *Saccharomyces, Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces*) soit respiratoire (comme les *Candida*, les *Kluyveromyces* la plupart des *Pichia* et des *Hansenula* et Quelques *Torulopsis*) **(Noui, 2001)**.

II-1-6 Métabolisme :

Saccharomyces cerevisiae est un micro-organisme capable de vivre aussi bien en présence qu'en absence d'air, avec comme nutriment préféré un sucre simple (le glucose). La transformation des sucres par la levure est donc possible selon deux voies différentes:

- ***En présence d'air*** (aérobiose)**,** les levures respirent et consomment une partie du sucre en produisant de l'eau et du gaz carbonique, suivant l'équation :



La dégradation du glucose se fait par de nombreuses réactions enzymatiques spécifiques. Appartenant aux voies classiques suivantes : dont les plus importantes sont **la Glycolyse (Figure 6)** et **le Cycle de Krebs**. L'étape ultime mobilise **la chaîne des enzymes respiratoires** qui transportent les électrons provenant des déshydrogénations vers l'Oxygène moléculaire. Par cette voie «aérobie», la dégradation d'une molécule de Glucose produit 38 molécules d'Adénosine Triphosphate (ATP). Cette énergie assure le maintien de la vie de la cellule et permet d'effectuer de nombreuses synthèses cellulaires pour la croissance et la multiplication. Cette voie est utilisée pour la fabrication industrielle de la levure en présence d'air dans les fermenteurs de la levurerie, les souches sont cultivées dans des milieux sucrés (mélasses de betterave et de canne). **(Boitard, 2010)**

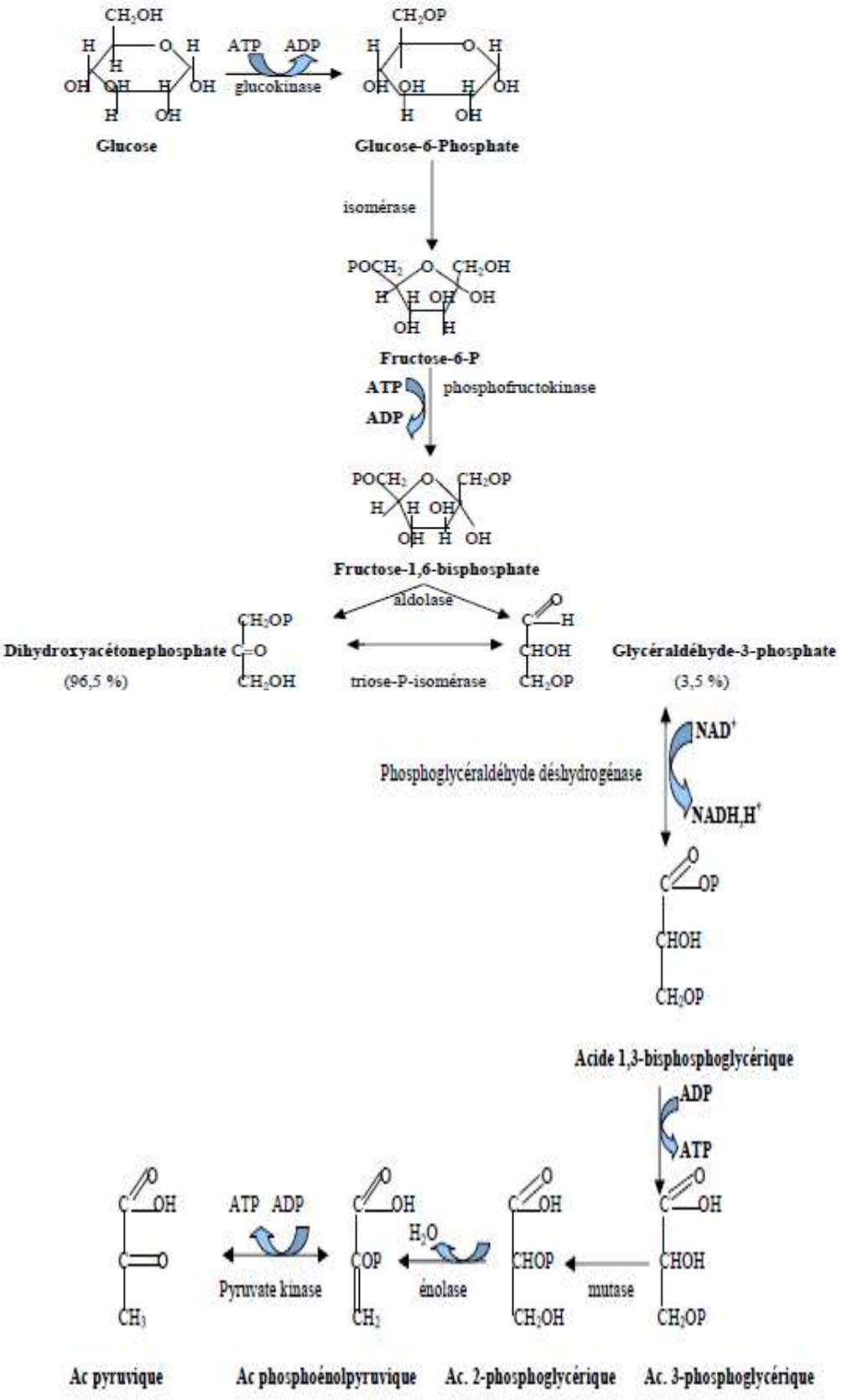


Figure 6 : Schéma de la glycolyse

(Nehme, 2008)

[14]

- ***En absence d'air*** (anaérobiose), la levure tire l'énergie pour survivre de la fermentation du sucre qui produit de l'alcool éthylique et du gaz carbonique, suivant l'équation:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH$$

La glycolyse **(Figure 7)** constitue la première étape de la dégradation du glucose. Elle se fait en aérobiose comme en anaérobiose et amène à la formation de deux molécules de pyruvate, deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH, H^+. Ces dernières subissent une réoxydation en anaérobiose amenant dans le cas de la fermentation alcoolique, à la réduction de l'acétaldéhyde (issu de la décarboxylation du pyruvate) en éthanol selon les réactions suivantes. **(Boitard, 2010)**

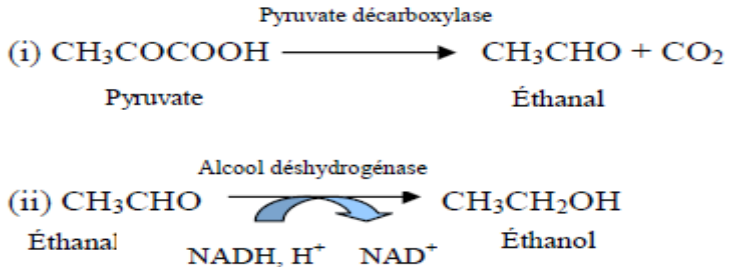


Figure 7 : Les équations de la glycolyse

(Nehme, 2008)

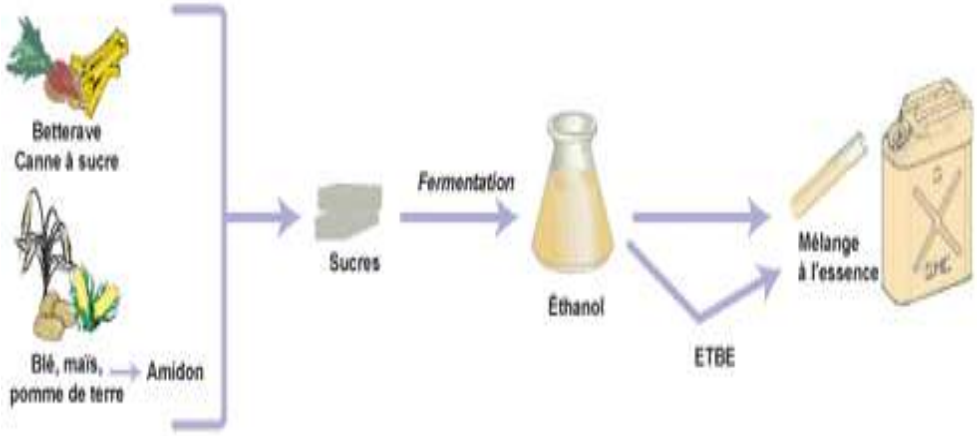
II-2 Les procédés de production du bioéthanol :

II-2-1 L'éthanol de première et de seconde génération :

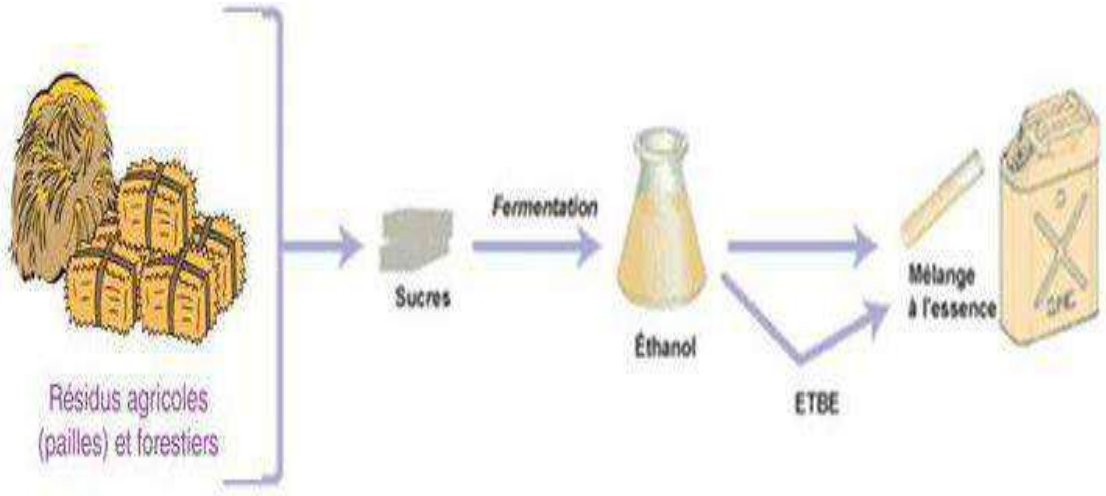
L'éthanol élaboré à partir de plantes riches en sucres ou en amidon comme le maïs et les céréales est dit de « première génération » parce qu'il est produit à l'aide de procédés industriels et d'hydrolyse enzymatique relativement simples et bien maîtrisés ; c'est pourquoi il a fait l'objet d'un développement à l'échelle commerciale au cours des dernières années en Amérique du Nord **(Ferland, 2008)**.

Dans le cas de l'éthanol produit à partir de matière lignocellulosique, couramment appelé éthanol cellulosique, le procédé d'hydrolyse enzymatique est beaucoup plus complexe et laborieux puisque la matière lignocellulosique est formée d'une matrice rigide difficile à déstructurer pour libérer la cellulose. Pour cette raison, l'éthanol cellulosique est dit de « seconde génération » **(Ferland, 2008)**.

Les bilans énergétique et environnemental des biocarburants de seconde génération sont considérés comme supérieurs à ceux de première génération. Cependant, parce que la rentabilité des procédés reste à démontrer, leur production ne se fait pas encore à l'échelle industrielle. La filière prédominante actuellement est donc celle de première génération **(Ferland, 2008)**.



Production de bioéthanol de 1ére génération



Production de bioéthanol de 2éme génération

Figure 8 : Ethanol de 1ère et 2ème génération

(Dutriez et watterlot, 2016)

II-2-2 Substrats et procédés de production de l'éthanol de 1ère génération :

Actuellement, la production industrielle de bioéthanol de 1ère génération est effectuée à partir de produits agricoles riches en amidon ou en saccharose qui sont facilement fermentescibles. Ces sucres servent de réserve d'énergie pour les végétaux et sont à ce titre stockés dans des tissus spécifiques à chaque plante. Deux voies sont donc distinguées : une utilisant les plantes saccharifères et une autre basée sur les plantes amylacées (**Figure 9**) **(Riess, 2012)**.

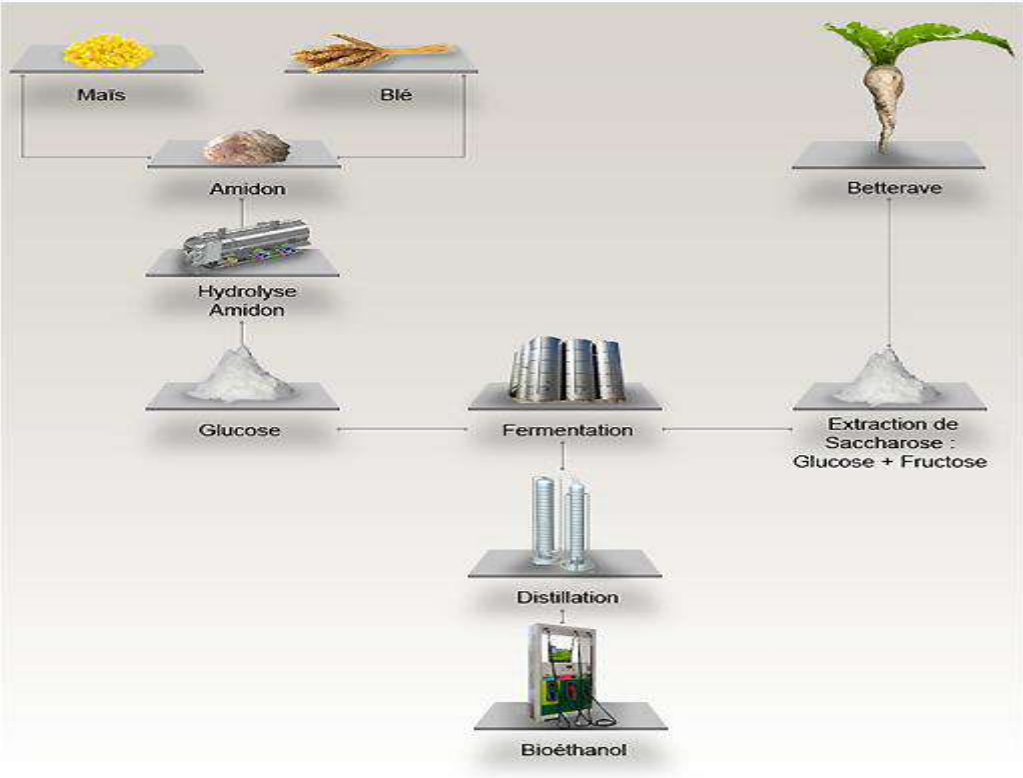


Figure 9 : Les grandes étapes de production du Bioéthanol à partir des plantes saccharifères et les plantes amylacées **(site 4)**

- A partir des plantes saccharifères :

La canne à sucre, avec son utilisation massive au Brésil, est la plante saccharifère la plus utilisée au niveau mondial pour la production de bioéthanol. En 2010, l'éthanol de canne à sucre représentait un tiers de la production d'éthanol au niveau mondial **(Agrimer, 2011)**. Cependant, la canne à sucre ne pousse qu'en milieu tropical. La betterave sucrière est beaucoup mieux adaptée au climat tempéré de l'Europe. Il existe aussi une troisième plante utilisée à moindre échelle, le sorgho sucrier. Il provient de l'Afrique ; mais il est adaptable au climat tempéré et présente l'avantage d'avoir des besoins réduits en eau pour se développer.

Les plantes saccharifères ont l'inconvénient d'être riches en eau et ne peuvent donc pas être stockées dans le temps pour une utilisation ultérieure. En effet leurs teneurs en sucre

diminuent rapidement après arrachage ou coupage. La production d'éthanol à partir de betterave sucrière débute, comme pour la production de sucre, avec le lavage des racines, leur découpage en cossettes et l'extraction des sucres à l'eau chaude qui est appelé diffusion. Pour ce qui est de la canne à sucre, la première étape est la coupe, suivie du broyage des cannes puis enfin leur pressage. Par la suite, les différences entre la canne à sucre et la betterave sucrière dépendent essentiellement des unités de production **(Riess, 2012)**

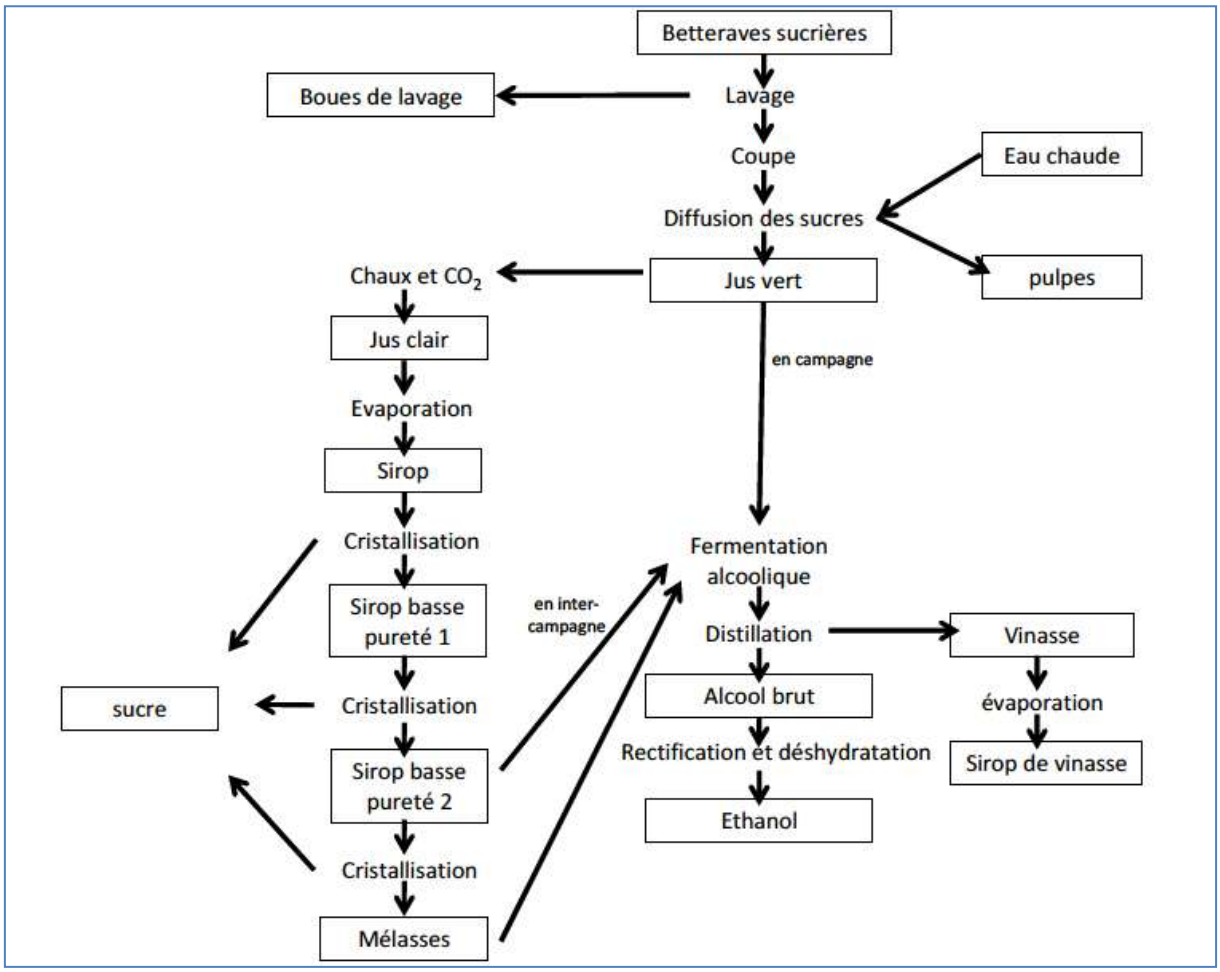


Figure 10 : Recyclage des sous-produits de l'industrie sucrière dans la production du Bioéthanol **(Riess, 2012)**.

La **(Figure 10)** illustre le procédé de production d'éthanol à partir de betterave sucrière. Les jus d'extraction appelés jus verts peuvent être utilisés directement pour la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* durant la campagne sucrière. Cette levure a la capacité d'hydrolyser le saccharose et ainsi de libérer les deux sucres simples dont il est composé, qui sont le glucose et le fructose. Ces sucres simples sont fermentescibles. Il s'agira ensuite de distiller le vin obtenu pour récupérer l'éthanol.

Les jus clairs, sirops et mélasse sont issus respectivement des étapes de clarification, évaporation et cristallisation. La phase de clarification est effectuée par chaulage. Le jus chaulé sera ensuite carbonaté puis subira un second chaulage et une seconde carbonatation. Sous l'action de la chaux, les acides minéraux et un certain nombre de matières organiques, comme les pectines et les protéines, sont transformés en sels insolubles. Il se forme un précipité qui entraîne les impuretés en se déposant. Le chaulage entraîne l'élimination presque totale du fer. Le fer peut catalyser des réactions d'oxydations entrainant la formation de couleur et mener à la formation de sucres blanc-grisâtre **,** il est donc indésirable pour la production de sucre. La fraction liquide, appelée jus clair est alors récupérée. Le sirop correspond au jus clair est concentré par évaporation de l'eau. Le saccharose représente alors plus de 90 % de la matière sèche totale. Le passage de sirop à mélasse consiste en une cristallisation du sucre, ce sont donc les autres constituants qui sont concentrés et le sucre lui est en partie éliminé. Le but de cette opération est de former la masse-cuite (sucre refroidi) par cristallisation du sucre contenu dans le sirop. L'introduction de très fins cristaux dans le sirop amorce la cristallisation du sucre, qui se propage spontanément. L'essorage permettra de séparer d'une part le sucre cristallisé et la mélasse **(Riess, 2012)**.

- ***A partir des plantes amylacées :***

Le maïs est la plante la plus utilisée pour la production d'éthanol aux Etats-Unis d'Amérique. Cependant, cette plante, grande consommatrice en eau, est bien moins adaptée aux étés généralement secs de l'Europe. Néanmoins d'autres plantes sont utilisables comme le blé et l'orge (moins gourmande en eau en été), la pomme de terre ou encore le manioc ; ce dernier est particulièrement bien adapté au climat tropical. Les réserves d'amidon dans les céréales s'effectuent dans leurs graines. Celles-ci étant pauvres en eau, elles peuvent être stockées et utilisées ultérieurement. Ce n'est pas le cas pour la pomme de terre ou le manioc qui sont riches en eau et doivent donc être transformés rapidement après récolte **(Riess, 2012)**.

A l'instar des jus de betterave, la composition des jus sucrés à partir d'amidon peut varier selon les procédés utilisés, selon les variétés de plantes utilisées ou encore selon les sols. Cependant dans ce cas, l'influence de la technique utilisée pour obtenir les jus sucrés est encore plus importante. En effet, l'amidon contenu dans les plantes n'est ni fermentescible, ni accessible directement, il doit donc être transformé en glucose par un procédé consiste de prétraitement enzymatique **(Figure11)**. Il existe deux types de procédés, le premier est la voie sèche « drymilling » et le second est la voie humide « wet milling ». Le procédé

« dry milling» permet l'obtention d'un jus à la composition très proche de celle du grain de blé. Le procédé « wet milling » provoque des réactions secondaires dues à l'action de l'acide utilisé durant l'étape de trempage. La composition des jus sucrés utilisant le « wet milling » est donc très variable **(Riess, 2012)**.

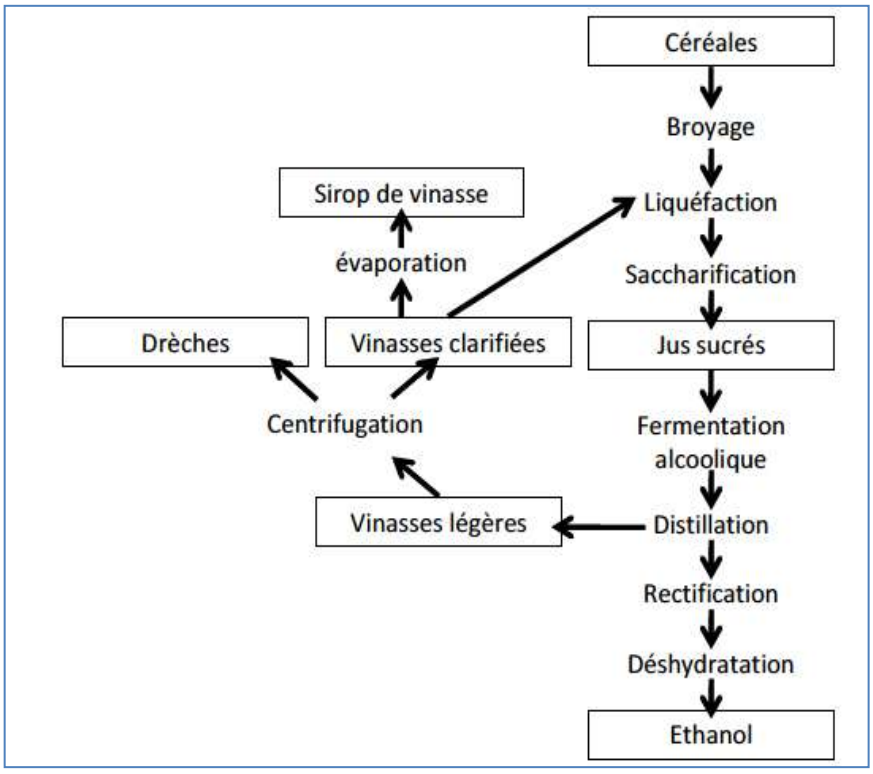


Figure 11 : Procédé de production du Bioéthanol à partir des plantes des céréales**.**

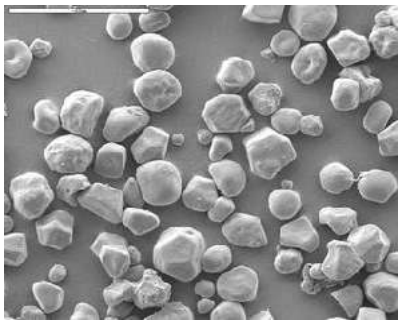
(Riess, 2012)

II-2-3 L'amidon :

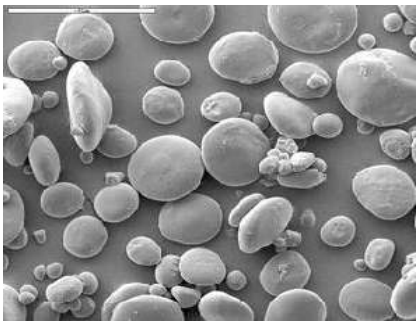
L'amidon est un biopolymères végétal de réserve composé d'unités glucose $C_6H_{12}O_6$. Il est répandu dans de nombreuses variétés botaniques ; on le trouve stocké dans les organes de réserve des végétaux tels que les céréales (maïs et blé) (30-70% de la matière sèche), les tubercules (les pommes de terre) (60-90 %) et les légumineuses (pois)
(25 à 50 %) .A coté du secteur industriel alimentaire, l'amidon est également utilisé dans de nombreux secteurs industriels non-alimentaires : comme la production papetière, l'industrie pharmaceutique, cosmétique et textile. Il est devenu également ces dernières années une matière première intéressante pour la production de matières plastiques biobasées et biodégradables ainsi que pour la production de bioéthanol **(Wertz, 2011)**.

- **Structure:**

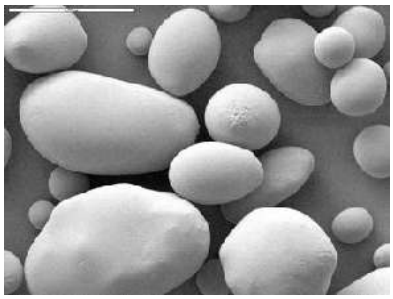
Les granules d'amidon sont composés d'une proportion d'amylose et d'amylopectine variable **(Tableau3).** Rapportent des teneurs en amylose variant entre 16,1 et 23,3 % après analyse de 35 variétés différentes de maïs ont quant à eux observé des teneurs en amylose variant entre 15,3 et 25,1 %. Les amidons de certaines variétés sont essentiellement composés d'amylopectine, tandis que d'autres sont beaucoup plus riches en amylose **(Malumba, 2010)**.



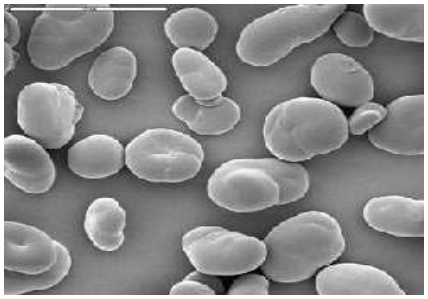
Amidon de mais.



Amidon de blé.



Amidon de pomme de terre.



Amidon de pois.

Figure 12 : Polymorphisme des grains d'amidon **(Multon, 1992).**

L'amylose est un homopolymère linéaire de 600 à 6 000 unités D-glucosyl liées par des liaisons D-glucopyranoses (1-4) et par de très rares liaisons D-glycopyranoses (1-6) **(Figure13)**. Il forme des complexes d'inclusion en présence d'acides gras, d'alcools, d'agents tensioactifs et d'autres composés apolaires. La formation de ces complexes peut modifier certaines propriétés techno-fonctionnelles de l'amidon, dont notamment la résistance à l'hydrolyse enzymatique, l'aptitude des granules au gonflement et à l'empesage **(Malumba, 2010)**.

L'amylopectine est un homopolymère extrêmement ramifié, composé de dizaines de milliers d'unités glucose (sous la forme D-glucopyranose) et comportant des zones de ramification résultant de la formation de liaisons (1-6) **(Figure13)**.

Chez les céréales, l'amylopectine comporte principalement deux types de chaines : les premières présentent un degré de polymérisation (DP) de l'ordre de 45 unités de glucose et forment le squelette sur lequel viennent se greffer des chaines plus courtes du second type, ayant un DP compris entre 15 et 20 unités de glucose. L'amylopectine est le constituant majeur de la phase cristalline du granule. **Ji et al, 2004** associent la résistance thermique des amidons extraits de certaines lignées de maïs au pourcentage élevé de courtes chaines d'amylopectine présent dans leurs parties cristallines. Cette résistance résulterait principalement du grand nombre de ramifications dans la structure cristalline de ces amidons, ce qui leur conférerait une plus grande résistance à la désarticulation pendant leur traitement thermique **(Huchette, 1967)**.

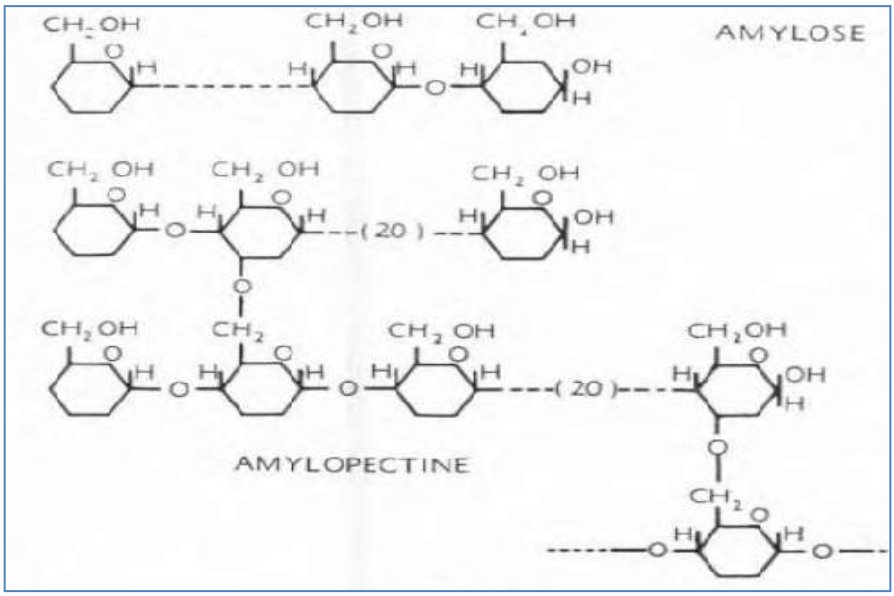


Figure 13 : Structure de l'amylose et l'amylopectine**.**

(Huchette, 1967)

Tableau 3 : Variation des teneurs en amylose et amylopectine selon l'origine botanique**.**

(Multon, 1992)

	Amidon % matière sèche	Amylose %	Amylopectine %
Pomme de terre	84	23	77
Manioc	15	20	80
Maïs	75	25	75
Maïs cireux	75	0	100
Amylomaïs	75	77	23
Banane	90	17	83

- **Propriétés hydro-thermiques de l'amidon :**

L'amidon est insoluble dans l'eau à température ambiante. A cette température, l'humidité relative de l'air influence la cristallinité, indiquant par là la perméabilité du grain vis-à-vis de l'eau (phénomène de sorption).

A une température supérieure à 60 °C, le phénomène d'empesage intervient. Il s'agit d'une perte de la cristallinité du grain et une dispersion de ces composants. La température à laquelle débute la dispersion des amyloses dépend de l'origine botanique. Lorsque le chauffage se prolonge, l'amylose amorphe se solubilise dans le milieu, Les petites molécules d'amylose sont libérées plus facilement tandis que des températures pouvant atteindre 90 °C sont nécessaires pour avoir une dispersion totale, y compris celle des amyloses participant à la cristallisation de l'amylopectine. L'état final est appelé empois d'amidon. Il s'agit d'une déstructuration irréversible du grain conduisant à une solution comprenant des granules gonflés et des macromolécules solubilisées.

En revenant à la température ambiante, il y a gélification par rétrogradation de l'amidon, l'amidon gélatinisé se réorganise pour atteindre un état énergétiquement plus stable, au cours de ce phénomène, la solubilité de l'empois diminue pour finalement donner un gel blanc et opaque, mélange d'amylose et d'amylopectine (Tableau 4). **(wertz, 2011)**.

Tableau 4 : Plage de gélatinisation de l'amidon en fonction de son origine

(Multon, 1992)

Origine de l'amidon	Plage de gélatinisation °C
Maïs	60 - 72
Blé	60 – 65
Tapioca	52 – 64
Pomme de terre	58 - 66

- **Les réactions de transformation enzymatique de l'amidon :**

L'amidon est utilisé depuis longtemps pour produire du glucose qui, par voie fermentaire donnera de l'alcool en utilisant des enzymes connues sous le nom d'amylases. Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les molécules d'amidon pour donner divers produits, y compris des dextrines et progressivement de plus petits polymères composés d'unités de glucose. Ces enzyme sont d'une grande importance dans l'actuelle de la biotechnologie avec des applications allant de la nourriture, la fermentation, le textile à l'industrie du papier.

Bien que les amylases puissent dériver de plusieurs sources (les plantes, les animaux et les micro-organismes), les enzymes microbiennes répondent généralement plus aux exigences industrielles.

Aujourd'hui, un grand nombre d'amylases microbiennes sont disponibles et elles ont presque complètement remplacé l'hydrolyse chimique de l'amidon dans les industries de transformation de l'amidon **(Sani, 2014)**.

L'α-amylase : Elle est présente dans les plantes et dans les animaux. La salive humaine et le pancréas sont riches en cette enzyme. L'alpha -amylase est une endoamylase qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4), de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose et d'oligosides de 2 à 7 unités (maltose, maltotriose et surtout d'α–dextrines). Les propriétés des l'alpha amylases sont très variables et dépendent de l'origine de l'enzyme **(Tableau 5) (Sani, 2014)**.

Tableau 5 : Propriétés de quelques alpha amylases **(Villette ,1991)**

0rigine	Masse molaire KDa	pH optimum	Température optimale °C
Animale			
Pancréas de porc	50	6,9	37 - 40
salive	50	6,9	37 - 40
Végétale			
Orge malté	60	4,7 – 5,4	50 – 55
Microbienne			
A. niger	58	4 – 5	50
A. oryzae	52,5	5,5 – 6,9	40
B. subtilis	47	5,3 – 6,4	50
B. acidocaldarius	68	3,5	75
B. amyloliquefasciens	49	5,9	65
B. licheniformis	22-23	5,9 - 9	76

La β-amylase qui agit à partir de l'extrémité non-réductrice de la chaîne, coupe l'amidon en unités maltose (un disaccharide) **(Sani, 2014)**.

La γ-amylase (ou amyloglucosidase ou encore glucoamylase) : se sont des exo-enymes qui coupent la chaîne à la dernière liaison glucosidique α (α (1,4) et α (1,6)) à l'extrémité non-réductrice, et conduit au monosaccharide glucose. La γ-amylase scinde aussi les liaisons α (1,6) **,(wertz, 2011)** c'est est une enzyme essentiellement produite par des moisissures du genre *Aspergilus sp., Penicillium sp. et Rhizopus sp.* . Le rendement de l'hydrolyse dépend de la nature des liaisons adjacentes, de la taille et de la structure du substrat à hydrolyser.

Les longues chaînes d'alpha glucanes sont plus rapidement hydrolysées que les maltodextrines et les oligosaccharides. Certaines amyloglucosidases de *Aspergillus oryzae* sont susceptibles de réagir avec des grains crus d'amidon. Lorsque la concentration en glucose augmente dans le milieu réactionnel, les amyloglucosidases sont susceptibles de moduler des réactions de transglucosidation **(Sauer et al, 2000)**.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

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

L'objectif de ce procédé est de tester la capacité de *Saccharomyces cerevisiae* de convertir l'amidon en éthanol et d'augmenter le rendement de production par l'utilisation de deux types d'amylase, α-amylase pour optimiser la liquéfaction et la Glucoamylase pour optimiser la saccharification.

I- Matériel :

I-1 Verreries :

- Pipettes + poire
- Fioles jaugées
- Béchers
- Erlens mayer
- Cristallisoirs
- Eprouvette
- Tubes à essaies
- Capsules, verre de montre
- Micropipettes
- Spatules.



I-2 Réactifs, produits et solutions :

- Solutions d'amidon de concentrations différentes.
- Acide chlorhydrique HCl pur (12N) et Solution d'HCl (0.1N)
- Iode (I_2).
- Iodure de Potassium (KI).
- Solution d'Iodine mère (de stockage) (0.1N).
- Solution d'Iodine (0.01N)
- Sulfate de Magnésium 7 hydraté ($MgSO_4.7H_2O$)
- Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)
- Phosphate mono potassique (KH_2PO_4)
- Extrait de levure.
- Réactif de Biomaghreb pour le dosage de Glucose.



- Dichromate de Potassium $K_2Cr_2O_7^{2-}$ (0.1 N)
- Solution d'acide sulfurique H_2SO_4 (25%)
- Acide citrique $C_6H_7O_8$
- Phosphate de sodium di-sodique (Na_2HPO_4)
- Solutions Tampons

La préparation de ces solutions est indiquée dans l'**Annexe 1**.

I-3 Equipements :

- Agitateur magnétique, barreau « Heidolph MR Hei-standard »Balance « Sartorius »
- Spectrophotomètre (UV-Visible) « UV mini 1240-SHIMADZU »
- Infrarouge «Ftir-8400- SHIMADZU »
- Dispositif de filtration « Sartorius Goehingen »
- PH mètre « Hanna »
- Bain-marrie « Memmert »
- Autoclave « Memmert »
- Capteur Ethanol « Jeulin »
- Centrifugeuse « EBA 20 »
- Dispositif de distillation « Jeulin ».
- Thermomètre
- Bec benzène



I-4 Matériel biologique :

- Biocatalyseurs (Enzymes) :
  - ✓ α amylase BAN 480L en solution aimablement fournie par le complexe SAIDAL de Médéa : Code 09330028 L, Titre : 3.7 à 4.1 $*10^6$ unités CEIP /100 ml, Densité : 1.2 g/ml. Nous avons reçu séparément deux flacons. Le contenu de ces derniers a été mélangé après un test de l'activité enzymatique des enzymes correspondantes aux deux flacons (**Annexe 2**).
  - ✓ Glucoamylase en poudre: Température optimale 50°C, pH optimum 4.
- Micro-organisme: La levure boulangère commercialisée: *Saccharomyces cerevisiae* produite par S.I. Lesaffre, 59703 Marq-France.

II- Méthodes :

II-1 Caractérisation de l'α-amylase :

L'objectif de cette partie est de tester les effets des principaux paramètres (Température, pH, concentration du substrat, concentration de l'enzyme) sur l'activité de l'alpha amylase fournie par SAIDAL. Il faut signaler le titre ainsi que les conditions optimales de la catalyse réalisée par cette enzyme sont indiqués par le fournisseur ; cependant pour un souci lié aux conditions de conservation de cette enzyme et à sa datte de validité, nous avons préféré de faire notre caractérisation avant d'entamer la fermentation.

II-1-1 Effet de pH :

1. Préparer 250ml d'une solution d'amidon (20g/L).
2. Préparer des solutions tampons de pH dans un intervalle de 3, 4, 6, 7 et 8.
3. Pour chaque pH à tester, mélanger 50ml de la solution d'amidon à 20g/L avec 50ml de chaque solution tampon afin d'obtenir une solution d'amidon tamponnée à 10g/L.
4. Ajouter 0.5ml de l'enzyme diluée au (1/1000) à partir de la solution concentrée.
5. Laisser l'hydrolyse s'effectuer à température ambiante sous une agitation pendant 15min.
6. Prendre un volume de 0.5ml de milieu réactionnel, mettre dans 4.5ml d'une solution de HCl (0.1N) pour arrêter la réaction.
7. En suivant la méthode de dosage choisie " Iodométrie , **Annexe 3**" , ajouter à 1ml du mélange final 2.4ml d'iodine (0.01N), mélanger et mettre à l'obscurité pendant 15min pour le développement de la couleur. Mesurer l'absorbance à 620nm.
8. Déduire la concentration finale en amidon.

II-1-2 Effet de la température :

Pour réaliser ce test, on doit fixer le pH et la concentration d'amidon et varier la température du milieu à l'aide d'un bain-marie en allant de la température ambiante à une température de 86,5°C (25°C, $50C^0$, $60C^0$, $70C^0$ $80C^0$, $86.5C^0$) :

1. Mélanger 300ml d'une solution d'amidon (20g/L) avec 300ml d'une solution tampon pH 6.
2. Diviser le volume total sur 6 flacons.
3. Chauffer le bain-marie à une température donnée.
4. Verser 0.5ml de la solution enzymatique diluée au (1/1000) quant la température voulue est obtenue.
5. Laisser l'hydrolyse s'effectuer sous une agitation pendant 15min.

6. Arrêter la réaction par Ajout de 4.5ml de HCl (0.1N) à un prélèvement de 0.5ml du milieu réactionnel
7. En suivant la méthode de dosage choisie "Iodométrie , **Annexe 3**" , ajouter à 1ml du mélange final 2.4ml d'iodine (0.01N), mélanger et mettre à l'obscurité pendant 15min pour le développement de la couleur. Mesurer l'absorbance à 620nm.
8. Déduire la concentration finale en amidon.

II-1-3 Effet de la concentration en substrat :

Pour réaliser ce test, il suffit de fixer le pH et la température du milieu réactionnel (aux valeurs optimales) et varier la concentration du substrat (amidon) :

1. Préparer des solutions tamponnées d'amidon de concentrations allant de 5g/L à 30g/L avec un pas de 5g/L. Pour obtenir une concentration donnée, il faut mélanger 50ml de la solution tampon (pH 6) avec 50ml de la solution d'amidon d'une concentration double.
2. Commencer l'hydrolyse par ajout de 0.5ml de la solution enzymatique (diluée au 1/1000) dans un bain-marie à température fixe pendant 2h. Pendant cette durée, réaliser des prélèvements de 0.5ml du milieu réactionnel à des intervalles de temps fixes.
3. Pour chaque prélèvement arrêter la réaction avec 4.5ml de HCl (0.1N) puis doser 1ml de mélange final avec 2.4ml d'iodine (0.01N). Mesurer l'absorbance à 620nm après une incubation à l'abri de la lumière pendant 15min (**Annexe 3**).
4. Déduire les concentrations en amidon correspondantes aux prélèvements.

Ce paramètre a été testé à deux températures : à 55°C et à 65°C.

II-1-4 Effet du volume de l'enzyme:

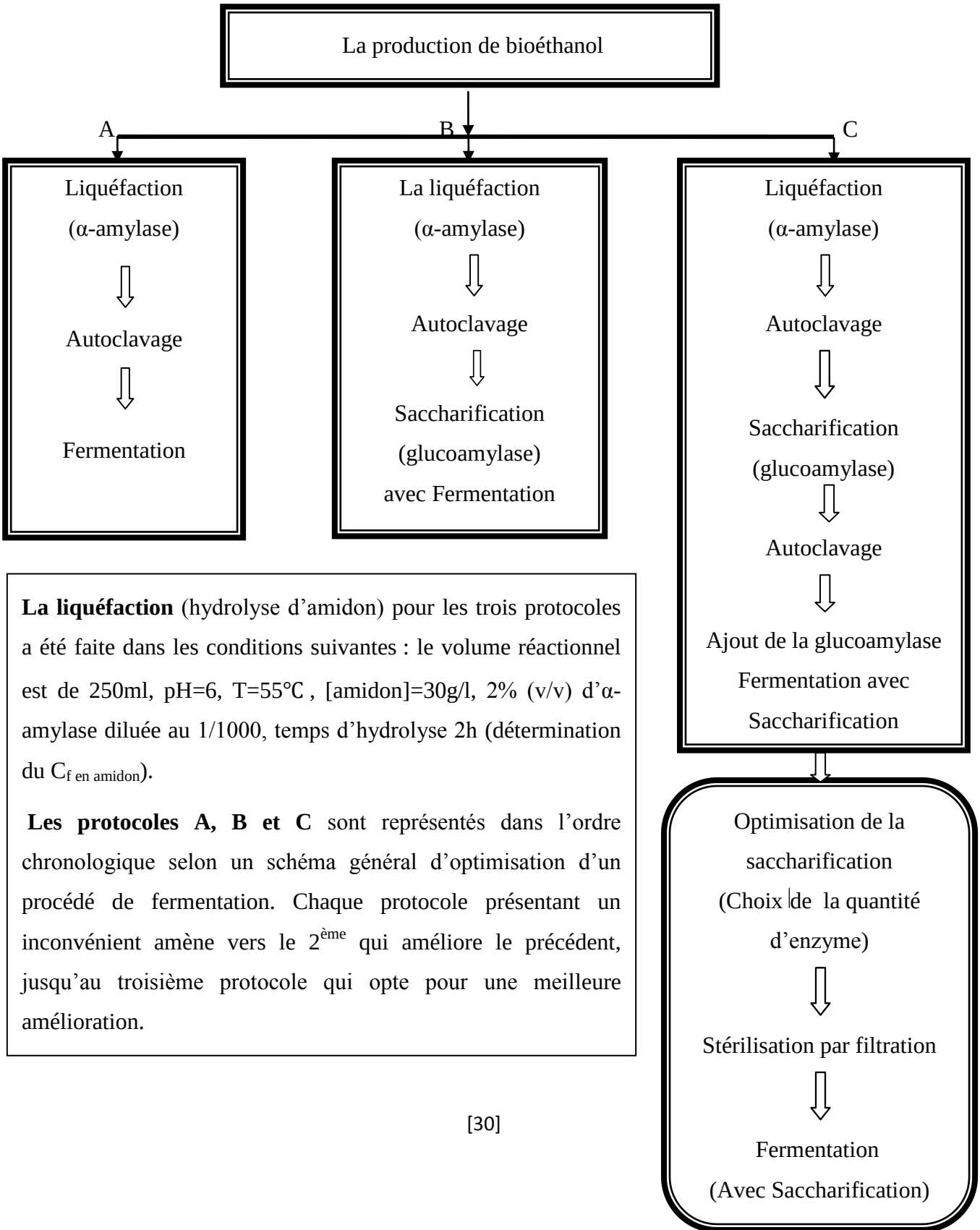
Dans ce cas, il suffit de fixer le pH, la température et la concentration du substrat et de varier le volume de l''enzyme diluée au 1000 dans un intervalle de 0.25 à 2ml par 100ml de milieu réactionnel :

1. Mélanger 250ml d'une solution d'amidon (60g/L) avec 250ml de solution tampon pH6 afin d'obtenir une concentration finale de 30g/L.
2. Diviser le volume total sur 5 flacons (100ml /flacon).
3. Commencer l'hydrolyse par ajout des volumes choisis d'enzyme. L'hydrolyse s'effectue dans un bain-marie à température fixe (55^0C) pendant 2h en réalisant des prélèvements de 0.5ml du milieu réactionnel à différents intervalles de temps.

4. Pour chaque prélèvement, arrêter la réaction avec 4.5ml de HCl (0.1N) puis doser 1ml du mélange final avec 2.4ml d'iodine (0.01N). Mesurer l'absorbance à 620nm après une incubation à l'abri de la lumière pendant 15min (**Annexe 3**).
5. Déduire les concentrations en amidon correspondantes aux prélèvements.

II-2 Production du bioéthanol avec de l'amidon soluble:

La production de bioéthanol a été réalisée par les trois protocoles suivants :



La liquéfaction (hydrolyse d'amidon) pour les trois protocoles a été faite dans les conditions suivantes : le volume réactionnel est de 250ml, pH=6, T=55°C , [amidon]=30g/l, 2% (v/v) d'α-amylase diluée au 1/1000, temps d'hydrolyse 2h (détermination du $C_{f\ en\ amidon}$).

Les protocoles A, B et C sont représentés dans l'ordre chronologique selon un schéma général d'optimisation d'un procédé de fermentation. Chaque protocole présentant un inconvénient amène vers le 2ème qui améliore le précédent, jusqu'au troisième protocole qui opte pour une meilleure amélioration.

Protocole de production A :

1- Apres liquéfaction, ajouter pour 250ml d'amidon hydrolysé 0.12g $MgSO_4.7H_2O$; 0.67g NH_4Cl; 0.125g KH_2PO_4 ; 0.25g d'extrait de levure. Ces quantités ont été calculées selon les résultats d'optimisation de la production d'éthanol à partir du glucose trouvés par **Salhi et Bouchehir, 2015**.

2- Autoclavage du milieu de culture à 120℃ pendant 20min.

3- Après refroidissement et devant le bec, verser 1g de levure (4g/L) et mettre sous agitation modérée pendant 48h à température ambiante.

4- Mesurer la concentration de l'éthanol à l'aide d'un capteur éthanol.

Protocole de production B:

1- Ajouter (0.12g $MgSO_4.7H_2O$, 0.67g NH_4Cl ,0.125g KH_2PO_4, 0.25g de l'extrait de levure) à 250ml d'une solution d'amidon hydrolysée par liquéfaction.

2- Ajuster le pH à 5 et autoclaver le milieu.

3- Après refroidissement et devant le bec verser 10mg de la Glucoamylase (soit une concentration de 40mg/L) et 1g de levure et mettre sous agitation modérée pendant 48h à température ambiante.

4- Mesurer le pH et la concentration d'éthanol.

Protocole de production C:

1- Réaliser une liquéfaction puis autoclavage la solution d'amidon hydrolysée à 120℃ pendant 20min. cette opération d'autoclavage est facultative, elle peut être éliminée si l'opération de saccharification est exercée directement après liquéfaction.

2- Après refroidissement, déterminer la concentration du glucose puis ajuster le pH à 4.

3- Lancer la Saccharification avec 10mg de la Glucoamylase pendant 6h à 50℃. Réaliser un dosage du glucose chaque 45min.

5- Ajouter les éléments complémentaires suivants :(0.12g $MgSO_4.7H_2O$, 0.67g NH_4Cl ,0.125g KH_2PO_4, 0.25g de l'extrait de levure). Ajuster le pH à 5 puis autoclavage le milieu de culture à 120℃ pendant 20min.

7- Après refroidissement et devant le bec verser 1g de levure et 10mg de glucoamylase puis mettre sous agitation modérée à température ambiante.

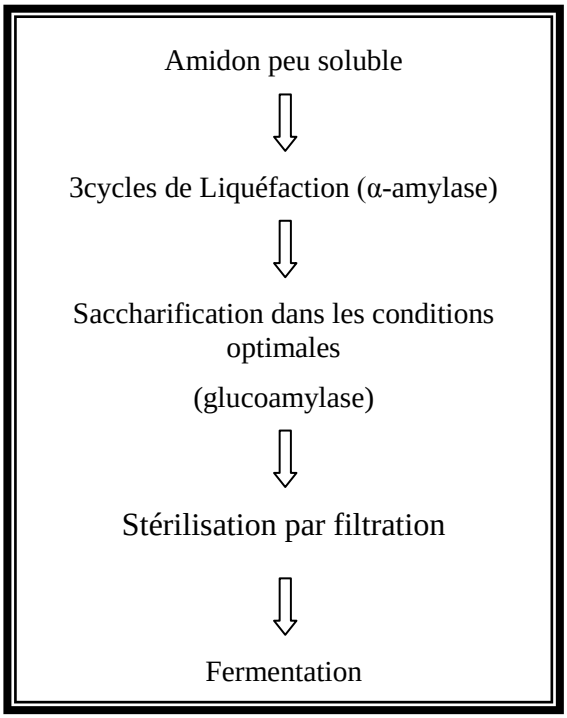
8- Mesurer le pH et la concentration de l'éthanol chaque 24h.

Afin d'améliorer ce schéma, nous avons optimisé la phase de saccharification en variant la quantité de glucoamylase par 250ml d'amidon hydrolysé par liquéfaction. Les quantités testées sont : 10mg, 20mg, 40mg, 80mg et 160mg soient des concentrations de 40mg/L, 80mg/L, 160mg/L, 320mg/L, 640mg/L. La saccharification est réalisé à pHi=4, T°=50°C.

Les solutions hydrolysées par concentrations choisies en glucoamylase ont été additionnées les éléments complémentaires ($MgSO_4.7H_2O$, NH_4Cl, KH_2PO_4) ajustées à pH5 et stérilisées par microfiltration (0,22µm) afin de sauvegarder l'activité de la glucoamylase. Apres filtration, lancer la fermentation par ajout de la levure.

II-3 Applications 1 : Production du bioéthanol avec de l'amidon peu soluble:

Le procédé optimisé lors de la partie précédente a été appliqué sur la production du bioéthanol en utilisant un substrat peu soluble. Le protocole de la production est résumé comme suit :



1- Faire bouillir une solution de 1.5L d'amidon durement soluble à 30g/L tamponné à pH6 jusqu'à la gélatinisation. Réajuster le volume avec un tampon froid pH6.
2- Réaliser une première liquéfaction en ajoutant 2% (v/v) d'α-amylase diluée au 1/1000 dans les conditions optimisées. Suite à la lenteur de l'hydrolyse, nous avons prolongé le temps de contact de 2h à (4-5h).

3- La solution n'étant pas clarifiée, nous avons réalisé une dispersion par un autoclavage à 130℃ pendant 1h suivie d'un 2ème cycle de liquéfaction.

4- Le résultat n'étant pas encore satisfaisant, nous avons refait la dispersion et un 3ème cycle de liquéfaction. Suite à ce dernier cycle, la solution d'amidon est devenue claire avec un aspect caramélisé.

5- Déterminer [glucose] de la solution d'amidon hydrolysée (1.5L).

6- Ajuster le pH à 4, ajouter de la Glucoamylase et laisser la Saccharification dans les conditions optimisées pendant 6h à 50℃. Déterminer la concentration du glucose libéré.

7- Ajouter les éléments complémentaires ($MgSO_4.7H_2O$, NH_4Cl, KH_2PO_4) puis ajuster le pH à 5.

8- Filtrer le tout sur une membrane de microfiltration puis lancer la fermentation avec l'ajout de la levure (1g/250ml soit 4g/L), agiter à température ambiante.

9- Réaliser à des temps précis des prélèvements de 3ml. Centrifuger et mesurer le pH, la concentration d'éthanol, la concentration du glucose et la quantité de biomasse sèche.

Enfin, un essai de fermentation sans stérilisation par filtration a été réalisé afin de voir l'utilité réelle de l'étape de stérilisation.

II-4 Application 2 : Production du bioéthanol avec de l'amidon non soluble:

II-4-1 Production à partir de l'eau de Riz:

1- Faire bouillir 60g de Riz dans un 1L d'eau distillée jusqu'à un volume de 125ml. Filtrer pour obtenir l'eau de riz.

2- Ajuster ce liquide à 250ml avec 125ml d'une solution tampon pH 6.

3- Faire sécher le riz à 100°C. Peser la masse finale. Calculer la masse passée en solution.

4- Ajuster le volume de cette solution avec un mélange (eau/tampon pH6 v/v) de telle sorte à avoir une solution de 30g/L.

5- Réaliser 3cycles d'hydrolyse d'un volume de 250ml de cette solution avec 2% (v/v) d'α amylase diluée au (1/1000). Une dispersion est réalisée par autoclavage à 130℃ pendant 1h après chaque cycle d'hydrolyse.

6- Déterminer la concentration du glucose de la solution de Riz hydrolysée.

7- Ajuster le pH à 4, ajouter la Glucoamylase à concentration optimale et laisser la Saccharification pendant 6h à 50℃.

8- Ajouter les éléments complémentaires ($MgSO_4.7H_2O$, NH_4Cl, KH_2PO_4, extrait de levure), ajuster le pH à 5.

9- Lancer la fermentation à température ambiante et mesurer le taux d'éthanol à des temps précis.

II-4-2 Production à partir de la farine de maïs:

1- Mélanger 250ml d'une solution de Farine de maïs (60g/L) avec 250ml de solution tampon pH6 afin d'obtenir une concentration finale de 30g/L.

2- Réaliser 3cycles d'hydrolyse d'un volume de 250ml de cette solution avec 2% (v/v) d'α amylase diluée au (1/1000). Une dispersion est réalisée par autoclavage à 130℃ pendant 1h après chaque cycle d'hydrolyse.

3- Déterminer la concentration du glucose de la solution de Farine de maïs hydrolysée.

4- Ajuster le pH à 4, ajouter la Glucoamylase à concentration optimale et laisser la Saccharification pendant 6h à 50℃.

5- Ajouter les éléments complémentaires ($MgSO_4.7H_2O$, NH_4Cl, KH_2PO_4, extrait de levure), ajuster le pH à 5.

6- Lancer la fermentation à température ambiante et mesurer le taux d'éthanol à des temps précis.

II-5 Séparation de l'éthanol par distillation:

La distillation est un procédé de séparation de mélange de substances liquides dont les températures d'ébullition sont différentes. Elle permet de séparer les constituants d'un mélange homogène sous l'effet de la chaleur ou d'une faible pression. La vapeur obtenue est liquéfiée pour donner le distillat **(Figure 23)**.

Notre but été d'obtenir un distillat le plus concentré que possible et puisque la température d'ébullition de l'eau est de 100 °C et d'éthanol est 78°C, nous avons chauffé le milieu entre 78°C et 83°C à fin d'éviter le passage d'eau.

II-6 Analyse de l'éthanol récupéré:

L'identification de l'éthanol a été réalisée par deux principales méthodes :

- ***Le test au dichromate de potassium*** : En milieu acide, l'éthanol (CH_3-CH_2OH) est oxydé en acide acétique (CH_3-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 :

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

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

$$2Cr2O_7^{2-}+3CH_3\text{-}CH_2OH+16H^+ \text{ --> } 4Cr^{3+}+3CH_3\text{-}COOH+11H_2O.$$

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 :*** dans le but de confirmer la structure de l'éthanol distillé nous avons réalisé une analyse par spectroscopie infrarouge avec une comparaison avec un spectre d'une molécule pure. Pour cela, notre distillat a été déposé dans une cuve de quartz placée dans le trajet optique d'une radiation infrarouge. Le spectre est enregistré en transmittance.

Le titre de l'éthanol dans le distillat a été réalisé soit directement par le capteur éthanol ou par réfractométrie ou densitométrie en utilisant les courbes d'étalonnage en **Annexe 3**.

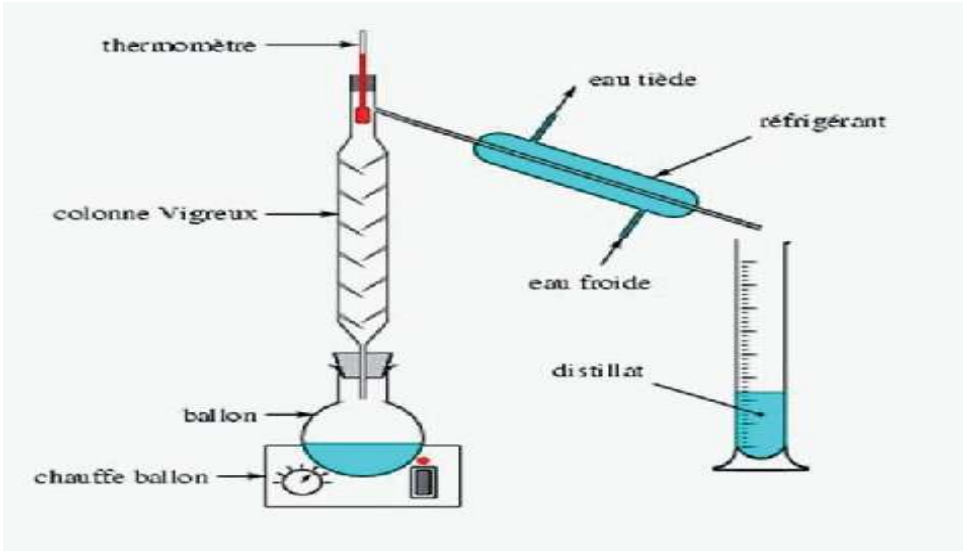




Figure 14 : Montage de distillation utilisé.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I Caractérisation de l'α-amylase :

I-1 Effet du pH :

L'étude de l'influence du pH sur l'activité enzymatique de l'α-amylase nous donne les résultats représentés sur la **(Figure15)**.

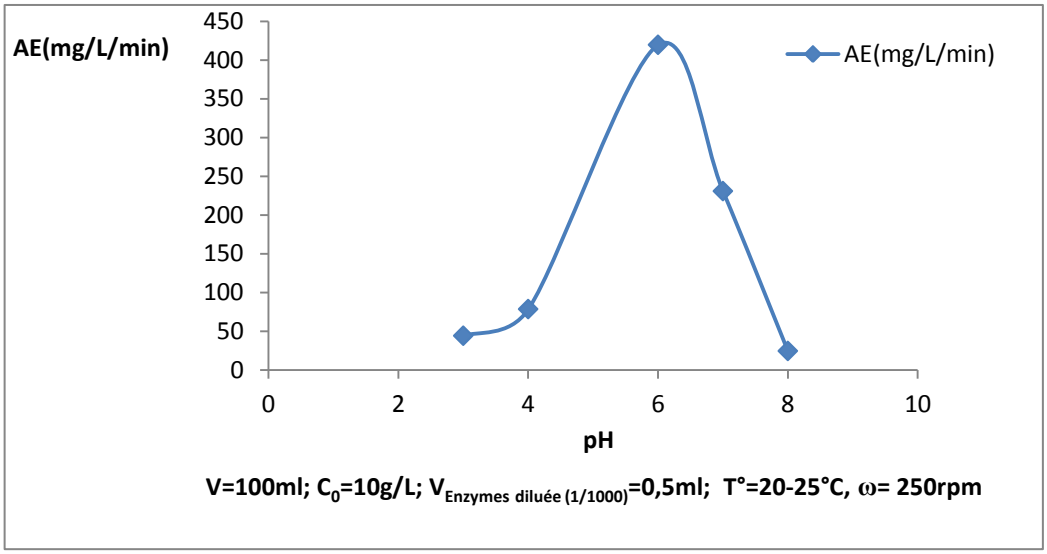


Figure 15 : Effet du pH sur l'activité de l'alpha amylase.

La courbe de l'activité amylasique en fonction du pH a une forme d'une cloche, qui fait apparaitre un pH optimal égal à 6 correspondant à une activité maximale : dans un intervalle de pH allant de 3 à 6, l'activité progresse proportionnellement à la variation du pH, au-delà de cette valeur, l'activité commence à diminuer et devient presque nulle pH=8.

Aux voisinages du pH optimal, l'abaissement de l'activité catalytique de notre enzyme est du aux changements engendrés au niveau des groupements des acides aminés du site actif qui se répercute sur l'interaction enzyme-substrat et déstabilise le complexe binaire E-S lors de la réaction enzymatique. Les pertes en activité aux pH acide et basique extrêmes sont dues à l'effet du pH sur l'ionisation des acides aminés de structure de l'enzyme. Ceci entraîne un changement dans les liens ioniques et les ponts hydrogène de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. La structure tertiaire de l'enzyme subit une modification qui abaisse son pouvoir catalytique jusqu'à suppression totale lorsque le dommage engendré par le pH sur le structure enzymatique est important : on parle d'une dénaturation.

Nos résultats sont en parfaite concordance avec les donnée de fiche technique du fournisseur de la BAN480L **(novozymes, site 5)** et avec la littérature : selon **Afifi et al, 2008**, le pH optimal des amylases bactérienne et fongique est situé entre 5 et 6. **El-Safey, 1994** a déduit que le pH optimal est 5.8 pour MM-alpha amylase et 6.4 pour RH-alpha amylase.

Par ailleurs, l'activité amylasique est maximale à un pH=6 chez *Bacillus subtilis* (**Yandri A.S, 2010; Hayashida S, 1988**), chez *Burnatia enneandra* et *Cadaba farinosa* (**Klang et Talamond, 2014**) et chez *Leuconostoc spp* (**Lind-Green et Refia, 1984**). Cependant, *Lactobacillus cellobiosus* produit un alpha amylase ayant un pH optimal situé dans une gamme de 6.3 à 7.9 (**Send et Chakraborty, 1986)**.

I-2 Effet de la température :

Il faut rappeler que ce paramètre a été testé en fixant le pH à son optimum (pH=6). Les résultats obtenus sont représentés sur la **(Figure 16)**.

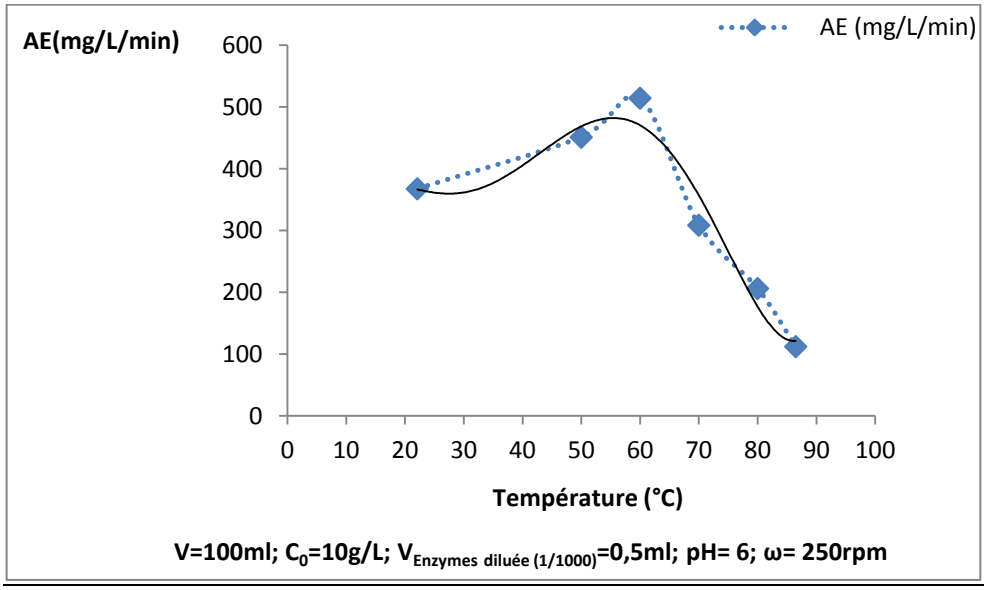


Figure 16: Effet de la température sur l'activité enzymatique de l'alpha amylase.

L'influence de la température sur l'activité amylasique a été testée dans une gamme de température allant de 22.1°C à 86.5°C. Les résultats montrent une activité maximale entre 50 et 65°C. L'augmentation de température amène les molécules réactives à avoir de plus en plus d'énergie cinétique et donc d'augmenter la fréquence de collision. Une température trop élevée pourrait dénaturer de façon irréversible cette structure.

Selon la littérature, l'alpha amylase est réputée pour sa grande thermo stabilité. **Abd el Rahman, 1990 ; Lin et al, 1998** ont conclus que la température optimale de l'alpha amylase *Aspergillus Falvus Var.Columnaris* est située entre 30 et 85°C. Les amylases issues de *Cadaba farinosaon* ont une thermo stabilité plus importante à 65°C (**Klang Et Talamond , 2014**). De plus nos résultats sont en parfaite conformité avec les donnée de fiche technique du fournisseur de la BAN480L **(Novozymes, site 5)**.

I-3 Effet de la concentration du substrat:

Afin de trancher sur la température optimale de notre enzyme, nous avons préféré étudier ce paramètre à pH=6 et aux voisinages de 60°C : à 55°C et à 65°C. Les résultats obtenus sont représentés sur les **(figures 17, 18 et 19)** pour la cinétique à 65°C et sur les **(figures 20, 21 et 22)** pour la cinétique 55°C.

- ***Cinétique à 65°C :***

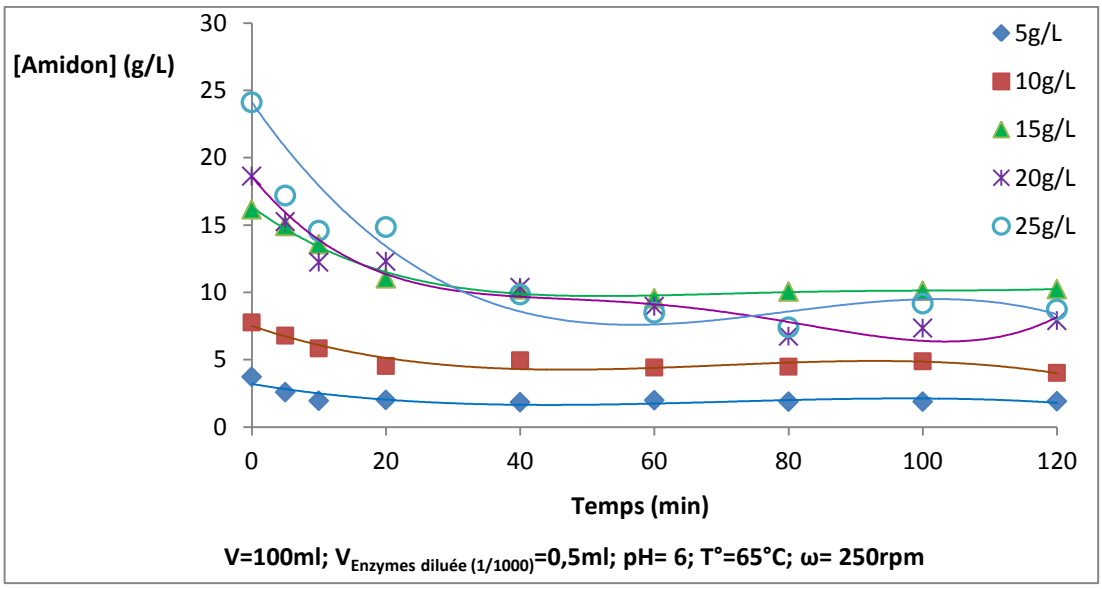


Figure 17 : Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'alpha amylase à 65°C.

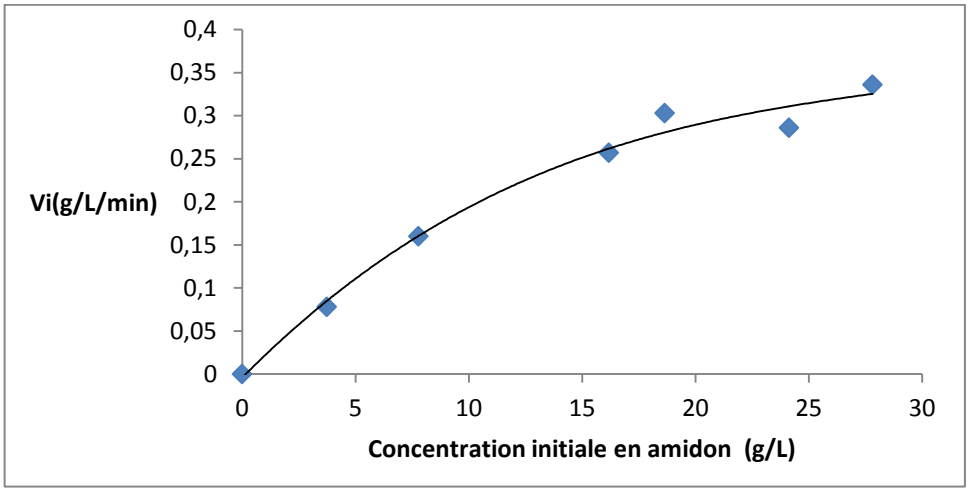


Figure 18 : Courbe de Michaelis Menten à 65°C : Evolution la vitesse initiale (Vi) en fonction de la concentration initiale en amidon.

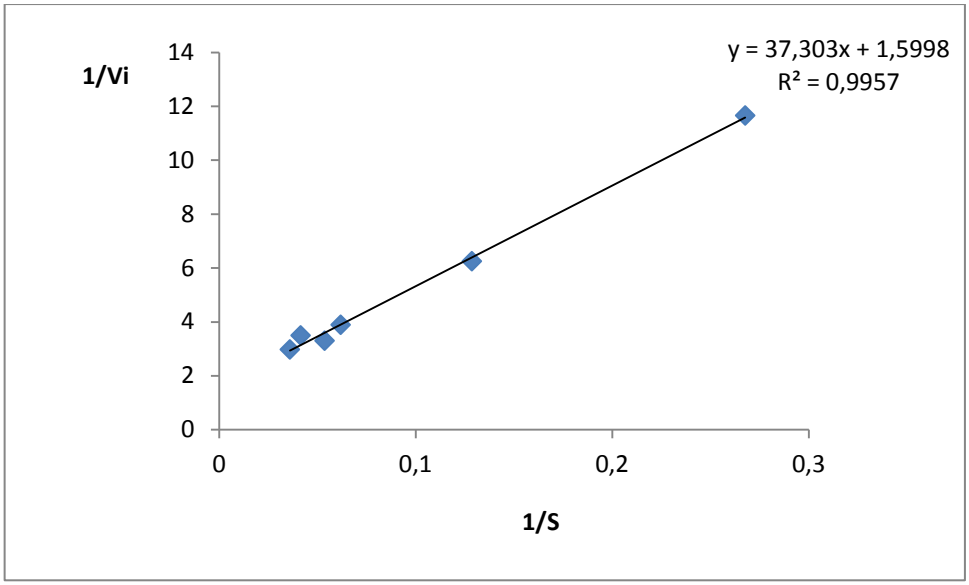


Figure 19: Représentation graphique de Lineweaver-Burk à 65°C.

- ***Cinétique à 55°C :***

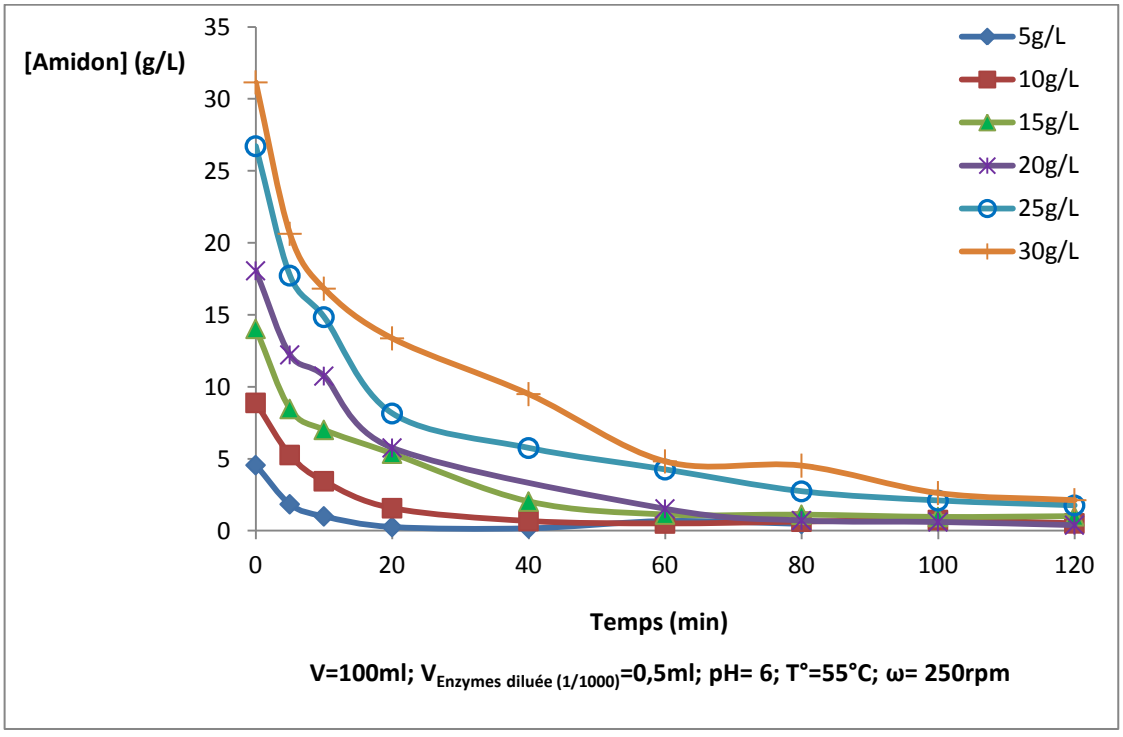


Figure 20 : Effet de la concentration du substrat sur l'activité de l'alpha amylase à 55°C.

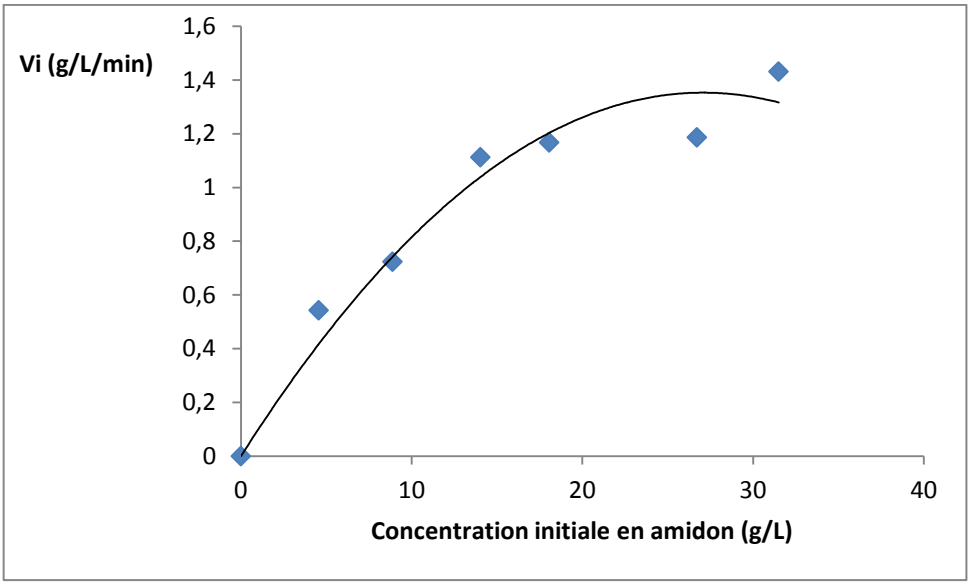


Figure 21 : Courbe de Michaelis Menten à 55°C : Evolution la vitesse initiale (Vi) en fonction de la concentration initiale en amidon.

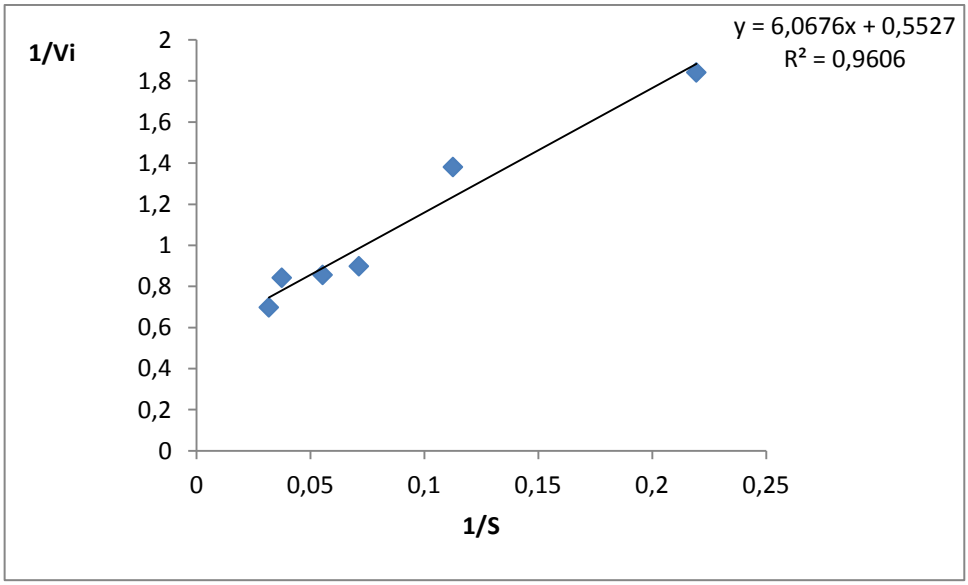


Figure 22 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk à 55°C.

Les courbes cinétiques obtenues aux deux températures (**Figures 17 et 20**) présentent 2 phases, la première étape est linéaire qui correspond à la réaction rapide due à l'action catalytique de l'enzyme : nous avons formation du complexe enzyme-substrat E-S qui se termine par un relâchement du produit et régénération de l'enzyme. Au cours de cette phase, un déclin rapide de la concentration de l'amidon est enregistré. La seconde correspond à la réaction lente due à la baisse de la concentration de l'amidon dans le milieu, ce qui donne un plateau.

La représentation des vitesses initiales (obtenue à partir des pentes des tangentes tracées au niveau des phases linéaires) en fonction des concentrations initiales en amidon nous donne des courbes hyperboliques, appelée courbes de saturation de l'enzyme par le substrat, où ce modèle représente la cinétique de Michaelis-Menten **(Figures 18 et 21)**:

$$\mathbf{V=\ \frac{Vmax\ .[S]}{Km+[S]}}$$

A partir des courbes de saturation, nous pouvons déterminer les constantes Km et Vmax de l'équation de Michaelis- Menten. V_{max} correspond à la vitesse maximale pour une concentration infinie de substrat. Cette concentration infinie ne pouvant être qu'approchée et non atteinte et elle permet d'évaluer la quantité de substrat nécessaire pour quantifier la vitesse de la réaction enzymatique expérimentalement. Km (constante de Michaelis) est inversement proportionnelle à l'affinité (Km^{-1}) de l'enzyme pour son substrat. L'affinité de l'enzyme pour son substrat diminue avec la constante de Michaelis. Cette dernière peut être définie comme la concentration en substrat par extrapolation de la moitié de la vitesse maximale sur l'axe des abscisses de la courbe de Michaelis Menten. Les vitesses maximales obtenues expérimentalement et tirées à partir des courbes de saturation **(Figures 18et 21)** sont approximativement 0,34g/L/min à 65°C avec un Km de 8,75g/L et 1,33g/L/min à 55°C avec un Km de 7,5g/L. La vitesse maximale enregistrée à 55°C est presque 4 fois plus importante de celle enregistrée à 65°C. L'affinité de l'enzyme pour son substrat est donc plus grande à 55°C (0,13 L/g) qu'à 65°C (0,11 L/g). Pour notre travail, nous étions dans l'obligation de tester au maximum une concentration de 30g/l car à partir de cette concertation la solubilité d'amidon est difficile.

Les courbes de saturation étant non linéaires, il peut être difficile d'évaluer précisément les valeurs de Km et Vmax. Pour cela, on utilise la représentation de Lineweaver –Burk selon L'équation:

$$\frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{V}} = \frac{\mathbf{Km}}{\mathbf{Vmax}} \cdot \frac{\mathbf{1}}{[\boldsymbol{S}]} + \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{Vmax}}$$

Les représentations graphiques de Lineweaver –Burk $\frac{\mathbf{1}}{\boldsymbol{V}} = \boldsymbol{f}(\frac{\mathbf{1}}{[\boldsymbol{S}]})$ **(Figures 19 et 22)** permettent d'obtenir des droites linéaires. Les interceptions axiales correspondent à $\frac{1}{\mathrm{Vmax}}$ à l'ordonnée et $-\frac{1}{\mathrm{Km}}$ à l'abscisse. D'après les équations, nous avons :

- à 65 °C : V_{max} =0.625 g/L/min avec un K_m= 23.312 g/L, l'affinité (1/Km)=0,0428 L/g.
- à 55°C : V_{max} =1.811 g/L/min K_m= 10.99 g/L, l'affinité (1/Km)=0,09 L/g.

En appliquant le modèle de Lineweaver –Burk, la vitesse maximale à 55°C est presque 3 fois plus importante que celle enregistrée à 65°C. L'affinité de l'enzyme pour son substrat est donc plus grande à 55°C (0,09 L/g) qu'à 65°C (0,04 L/g). Il apparait que ce modèle est plus approprié à décrire la cinétique de notre enzyme à 55°C car les paramètres cinétiques (V_{max} et Km) tirés à partir de ce modèle sont proches de ceux enregistrés expérimentalement. A 65°C, le modèle est beaucoup moins représentatif, car nous avons un grand écart entre les paramètres cinétiques (V_{max} et Km) tirés à partir de ce modèle et ceux enregistrés expérimentalement.

Bilan :

- Selon le modèle de Lineweaver –Burk **V_{max}=1,8 g/L/min ($V_{max\ réelle}$ = 1,33g/L/min).**
- Dans un volume réactionnelle de **100ml**, nous avons donc **0,18g/100ml/min** (**0,133g/100ml/min**),
- Nous avons une quantité d'enzyme diluée au 1/1000 est de 0,5ml/100ml de volume réactionnelle, donc : **0,18g/0,5ml d'enzyme /min** (**0,133g/0,5ml d'enzyme/min**),
- L'activité enzymatique par ml d'enzyme diluée au 1/1000 est de 0,36g/min/ml (0,266 g/min/ml),
- L'activité enzymatique par ml d'enzyme pure est de 360 g/min/ml (266 g/min/ml).
- En convertissant l'activité en g/min/ml en unité CEIP (mg/s/ml), nous avons 6000 CEIP/ml (4433,33CEIP/ml).

Sur l'étiquette des caractéristique de l'enzyme offerte par SAIDAL, le fournisseur annonce une activité de 3.7 à 4.1 *10^6 unités CEIP /100 ml ce qui correspond à 37000 à 41000 CEIP/ml. En considérant que cette activité a été mesurée dans les mêmes conditions, nous pouvons dire que le stock d'alpha-amylase a perdu 6 à 7 fois son activité. Ceci pourrait être du soit à une mauvaise conservation de l'enzyme ou à une contamination.

I-4 Effet du volume d'enzyme (quantité de l'enzyme) :

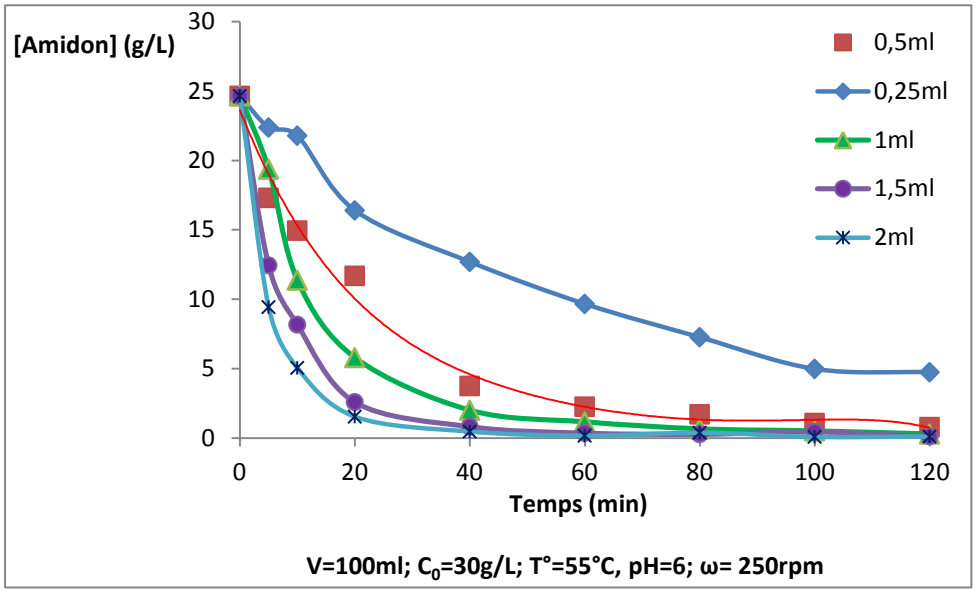


Figure 23 : représente l'effet du volume d'enzyme sur l'hydrolyse d'amidon.

On constate que pour les volumes d'enzyme de 1ml, 1,5ml et 2ml, la vitesse de la réaction est rapide jusqu'à l'atteint d'une concentration nulle en substrat en une heure. Pour les faibles volumes d'enzymes la vitesse est lente à cause de l'excès du substrat. Pour plus de précaution, nous avons opté pour un volume d'enzyme diluée au 1/1000 de 2ml par 100ml de milieu réactionnel, ce qui correspond à une quantité en enzyme de 12U. CEIP soit une concentration de 0,12U.CEIP/ml de volume réactionnel.

II Production du bioéthanol avec de l'amidon soluble:

II-1 Protocole de production A:

Afin de tester la capacité de saccharification de notre levure nous avons lancé une fermentation directement après liquéfaction par l'α-amylase. Les résultats trouvés sont représentés sur le **(Tableau 6)**.

Tableau 6 : Résultats du Protocole de production A

	Etat initial	Etat final
Liquéfaction (2H)	$C_{0\ d'amidon}$= 30g/L	$C_{f\ d'amidon}$=2.22g/L
Fermentation (48H)	$C_{0\ Ethanol}$= 0g/L	$C_{f\ Ethanol}$=2 à 2.1g/L.

En suivant cette méthode, nous avons obtenu un taux d'éthanol trop faible quasi nulle par rapport à nos espérances malgré que nous avons fournit une concentration d'amidon optimal avec une hydrolyse presque total.

Il est donc clair que notre levure n'est pas productrice de glucoamylase, car l'amidon hydrolysé en dextrines n'est pas fermentescible.

II-2 Protocole de production B:

La liquéfaction a été réalisée avec succès puisque la concentration d'amidon après hydrolyse est de 0.37g/L (soit une hydrolyse totale).

La phase de fermentation à température ambiante a été couplée à une saccharification par de la glucoamylase à 10mg/250ml (soit une concentration de 40mg/L). Les résultats obtenus sont représentés sur la **(Figure 24)**.

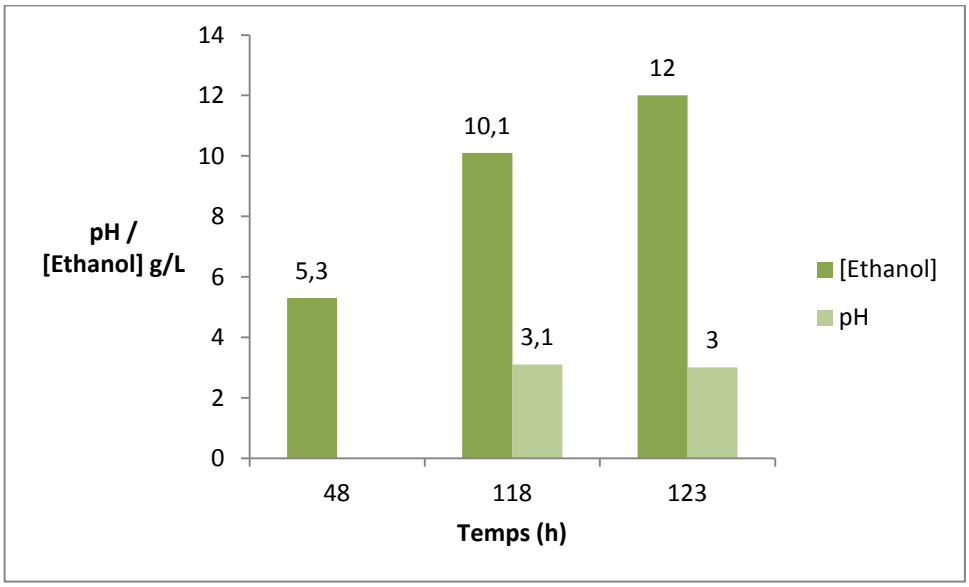


Figure 24: Taux d'éthanol et de pH enregistrés au cours du protocole B.

Un faible taux d'éthanol a été enregistré à 48H mais il reste 2,5 fois plus important que celui enregistré par le protocole A. la production se poursuit tout au long de 5 jours de fermentation alcoolique avec un tau final de 12g/L. En parallèle, nous avons une acidification du milieu qui atteint une valeur de 3.

Une hydrolyse totale de l'amidon avec une saccharification par de la Glucoamylase nous améliore la production de l'éthanol. La diminution du pH durant la fermentation de 5 à 3 nous montre que la fermentation alcoolique n'est pas le métabolisme prédominant, une respiration aérobie est exercée en parallèle donnant des sous produits acides (de la glycolyse et du cycle de krebs) qui abaissent le pH.

Afin de performer encore notre procédé, nous avons pensé à commencer la saccharification avant la fermentation afin d'obtenir un taux de glucose important à partir de l'amidon hydrolysé par l'α-amylase. Ce taux (>1g/L) inhibe la respiration aérobie par effet crabtree ce qui peut avoir un bon retentissement sur le niveau de production de l'éthanol.

II-3 Protocole de production C:

Les résultats trouvés pour les deux phases de liquéfaction (2h à 55°C, pH6) et de saccharification (6h à 50°C, pH4) sont représentés sur le **(Tableau 7)**.

Tableau 7: Résultats du Protocole C : liquéfaction et saccharification.

	Etat initial	Etat final
Liquéfaction (2H)	$C_{0\ d'amidon}$= 30g/L	$C_{f\ d'amidon}$=0,79g/L
Saccharification (6H)	$C_{0\ Glucose}$= 0g/L	$C_{f\ Glucose}$= 13,13g/L.

Une phase de liquéfaction performante suivie d'une phase de saccharification de 6h, dans les conditions optimales (pH4, T°=50°C) permettent d'obtenir un taux en glucose satisfaisant de 13g/L (soit une hydrolyse de 40%).

Il faut signaler que la saccharification se poursuit à une température ambiante en parallèle que la fermentation, car la même quantité de la glucoamylase a été rajoutée après autoclavage. Ce ci nous assure plus de performance de la phase de fermentation. Les résultats sont représentés sur la **(Figure 25)**.

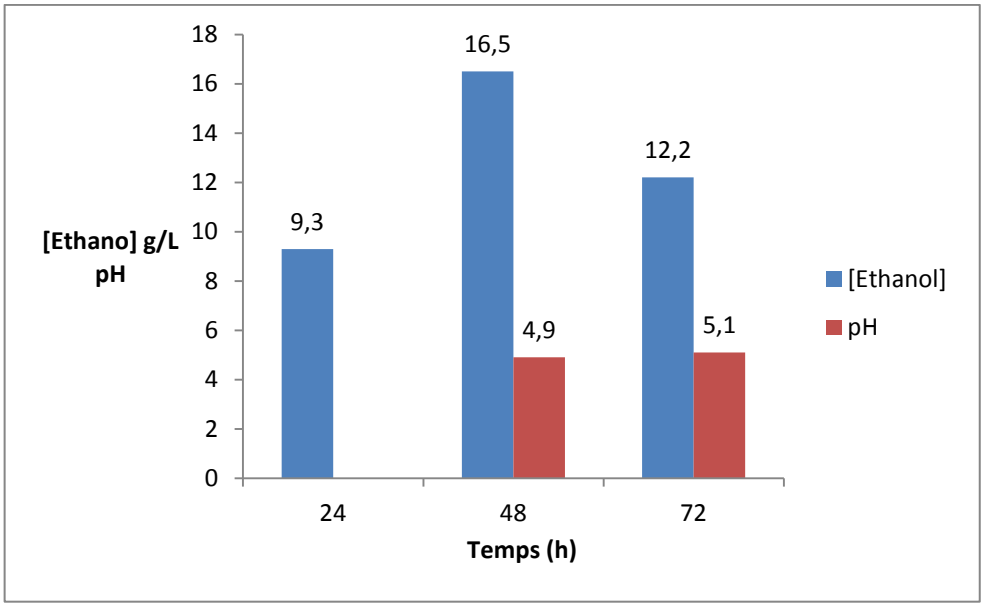


Figure 25 : Taux d'éthanol et de pH durant la phase de fermentation du protocole C.

Ce schéma apparait plus efficace des son début : nous avons déjà un taux d'éthanol de 9,3 g/L en 24h, nettement plus grand que les taux enregistrés en 48h de fermentation des protocoles précédents. En 48h de fermentation, la concentration d'éthanol est plus grande (16,5 g/L). A 72h, le déclin est enregistré où on obtient un taux plus faible estimé de 12 g/L. Le pH est pratiquement stable ($pH_{\text{au cours de la fermentation}}=pH_i=5$). La présence de forte concentration de glucose des le début de la phase de la fermentation ([glucose]> 1g/l) a orienté son métabolisme vers la fermentation alcoolique, ce qui a donné un taux plus grand en éthanol pour un temps plus cours (48h) par comparaison au protocole B. Le pH stabilisé à 5 au cours de la fermentation nous montre bien que le métabolisme respiratoire aérobie est limité dans ces conditions.

II-4 Comparaison entre les 3 méthodes :

La **(Figure 26)** montre de façon remarquable que le taux de production du bioéthanol par une fermentation précédée par la saccharification est de 16.5g/L. Il est meilleur que ceux des deux autres méthodes. Nous avons donc un rendement maximal de 0,55 en 48h.

L'effet du taux de glucose en début de fermentation sur la production de l'éthanol a été remarquable, ce qui mérite des milieux très concentrés en sucres fermentescibles. Il faut donc passer à l'optimisation de la concentration en Glucoamylase afin d'amorcer la fermentation avec un taux de glucose plus élevé.

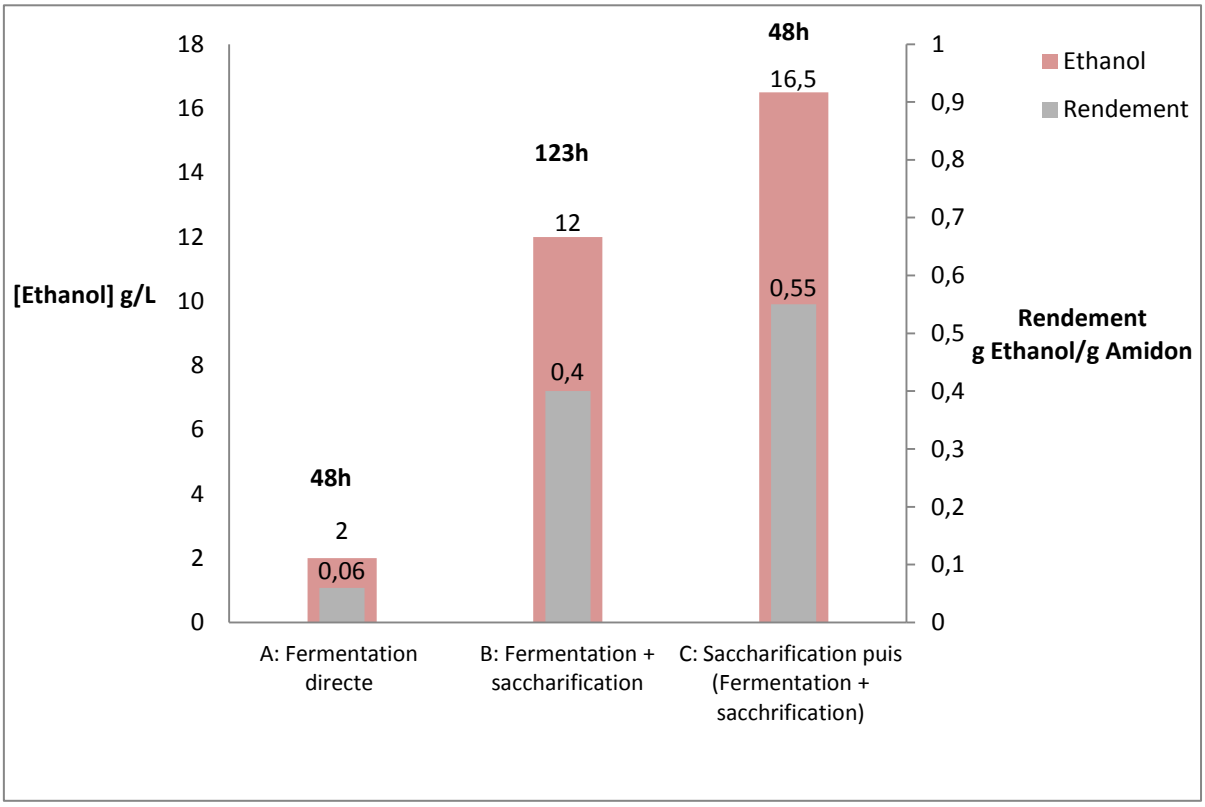


Figure 26 : taux de production obtenus par les trois protocoles.

II-5 Optimisation de la concentration en Glucoamylase :

Nous avons varié la concentration de la glucoamylase de 40mg/L à 640mg/L. Il faut signaler que la saccharification a été lancée après une phase de liquéfaction totale d'une solution d'amidon à 30g/L donnant une concentration finale de 0.47g/L. Les résultats sont illustrés sur la **(Figure 27)**.

Les taux de glucose obtenus en 6h en utilisant 320 et 640 mg/L de glucoamylase sont supérieurs par rapport à ceux tenus par 40, 80 et 160mg/L (12g/L). Avec une concentration en glucoamylase de 320 mg/L, la durée de la saccharification est raccourcie car le plateau est atteint après presque 3h d'hydrolyse donnant une concentration en glucose de 15 g/L. Pour une concentration de 640 mg/L, le glucose libéré se rapproche de la stabilité à partir de 5h donnant un taux de 20g/L (**Figure 27**). Pour confirmer notre choix, nous avons continué la phase de fermentation avec les concentrations en enzyme de 320 et 640mg/L. Les résultats obtenus sont représentés sur la **(Figure 28)**.

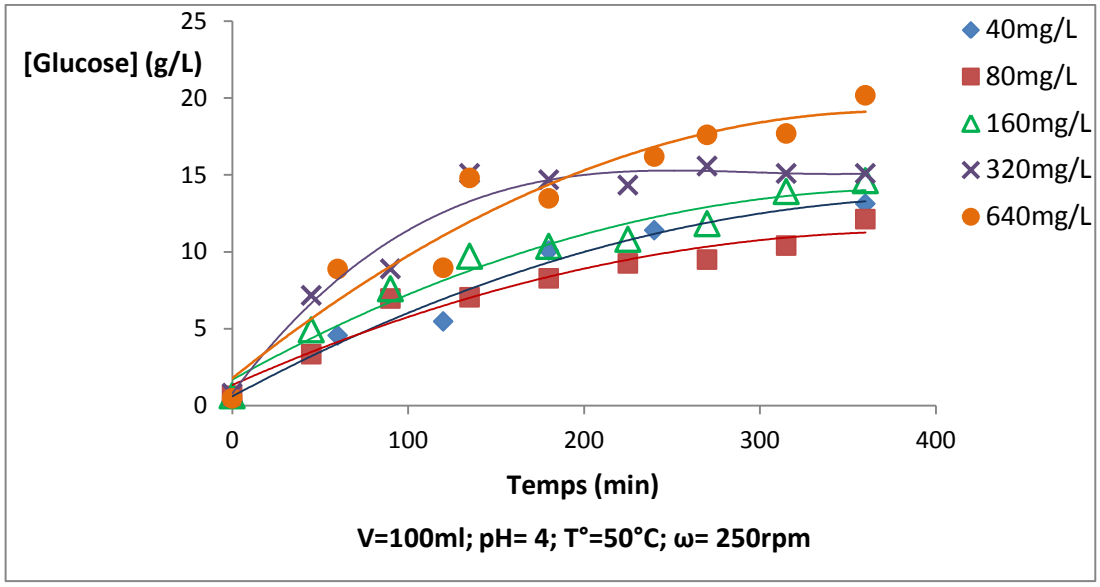


Figure 27 : Optimisation de la saccharification.

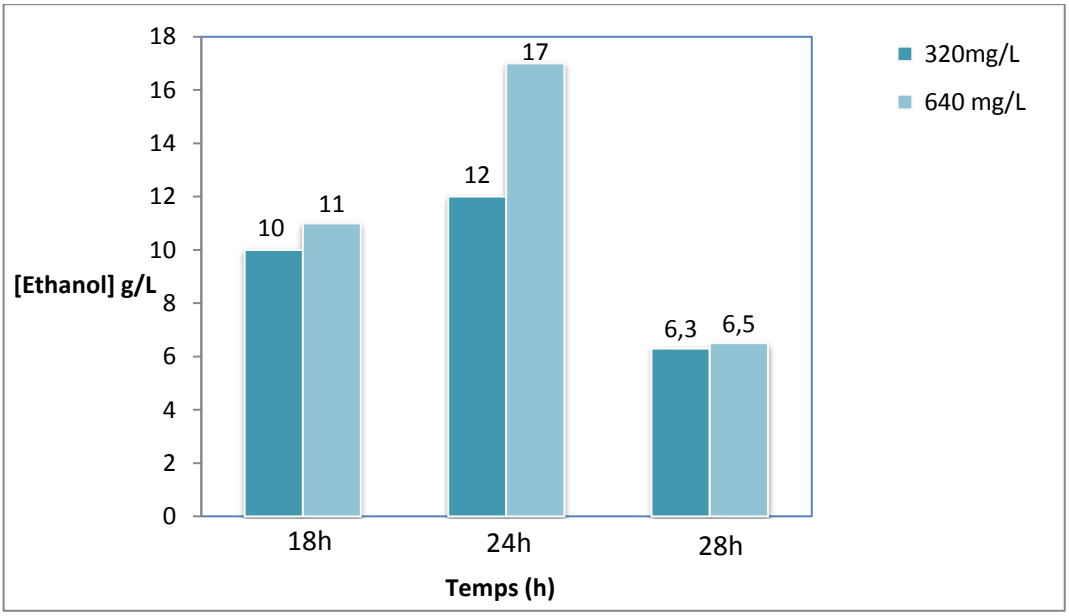


Figure 28: Taux d'éthanol produit avec les deux concentrations de la Glucoamylase.

La production d'alcool atteint son maximum à 24h pour les deux concentrations en glucoamylase. Le bioéthanol produit avec 640mg/L de glucoamylase est plus important (17g/L, rendement =0,56g d'éthanol/g d'amidon) par rapport à celui produit avec 320 mg/L (12g/L, rendement= 0,4g d'éthanol/g d'amidon). Haut delà de 24h, le déclin commence donnant une valeur de 6g/L pour les deux quantités d'enzyme. Nous retenons donc une concentration de 640mg/L pour la suite de notre travail.

III Application 1 : Production du bioéthanol avec de l'amidon peu soluble :

Il faut rappeler que la liquéfaction totale d'une solution d'amidon peu soluble à 30g/L n'a été obtenue qu'après trois cycle de « dispersion- liquéfaction » dans les conditions optimales de l'activité alpha-amylasique. Apres saccharification de 6h en utilisant 640mg/L de glucoamylase à pH4 et à 50°C, le taux de glucose final était de 20,53g/L. Dans le but de fixer la durée de la fermentation nécessaire pour obtenir un taux maximale d'éthanol et afin d'éviter la phase de déclin, un suivi de la phase de fermentation a été réalisé donnant les résultats représentés sur la **(Figure 29)**.

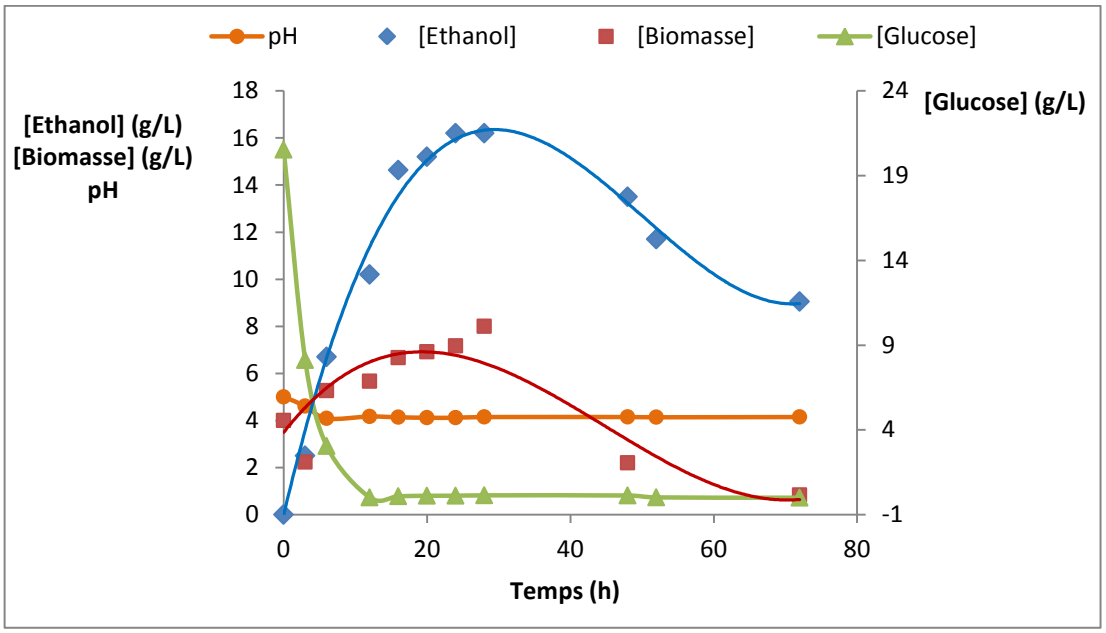


Figure 29 : Cinétique de la fermentation dans les conditions optimales.

Il est à enregistrer que :

- le Glucose diminue significativement au cours des premières heures, Il atteint 3 g/L au bout de 6h et sa concentration est presque nulle à partir de 12h.
- En parallèle, nous avons une augmentation exponentielle de la biomasse pendant les 12 premières heures.
- Pendant la même durée, nous signalons une bonne production de l'éthanol.
- Une phase stationnaire s'installe par la suite (A partir de 16h jusqu'à 28h) au cours de laquelle, nous avons un taux en glucose presque nul. Cependant le taux d'éthanol augmente de façon ralentie jusqu'à un maximum enregistré à 24h (16,2g/L).
- A partir de 28h, la biomasse est en phase de déclin, pendant laquelle nous avons une diminution du taux d'éthanol.

- Durant la fermentation, nous n'avons pas une grande acidification du milieu, car le pH est stabilisé aux environs de 4, pH favorable au fonctionnement de la glucoamylase qui continue son action enzymatique en libérant encore le glucose pendant la fermentation. Ce dernier est directement consommé par la biomasse productrice d'éthanol. A partir de 20g/L de glucose initial nous ne pouvons avoir que 11g/L d'éthanol en considérant que le rendement est maximal (0,55g d'éthanol/g de glucose), notre enzyme est donc active en parallèle que la fermentation. Le taux d'éthanol obtenu (16,2g/L) est compatible avec la quantité d'amidon mise au départ (30g/L et qui peut libérer après hydrolyse totale 33g/L de glucose), le rendement est don maximale (0,54g d'éthanol / g d'amidon).

En conclusion, une durée de fermentation de 20h à 24h est suffisante pour un maximum de production. Il est préférable de ne pas dépasser les 24h, car nous avons un risque d'entamer la phase de déclin où l'éthanol est consommé par la biomasse.

Puisque le taux d'éthanol est en augmentation rapide pendant les premières 12h, nous avons testé un essai de fermentation directement après saccharification, addition d'adjuvants et réajustement du pH à 5 sans stérilisation par filtration. Le taux d'éthanol enregistré à partir de 18h est 17g/L. l'éthanol produit au cours de la fermentation stérilise le milieu et évite l'effet de la contamination sur le taux de la production.

IV Application 2 : Production avec de l'amidon non soluble :

Une liquéfaction totale d'une solution d'amidon non soluble à 30g/L n'a pas été obtenue après trois cycles de « dispersion- liquéfaction ». L'aspect des solutions est resté trouble, attestant la présence d'amidon résiduel. Apres saccharification de 6h en utilisant 640mg/L de glucoamylase à pH4 et à 50°C, le taux de glucose final était bas : 6,40 g/L pour l'eau de riz et 7,33g/L pour la farine de maïs. La phase de fermentation a donné les résultats représentés sur la **(Figure 30)**.

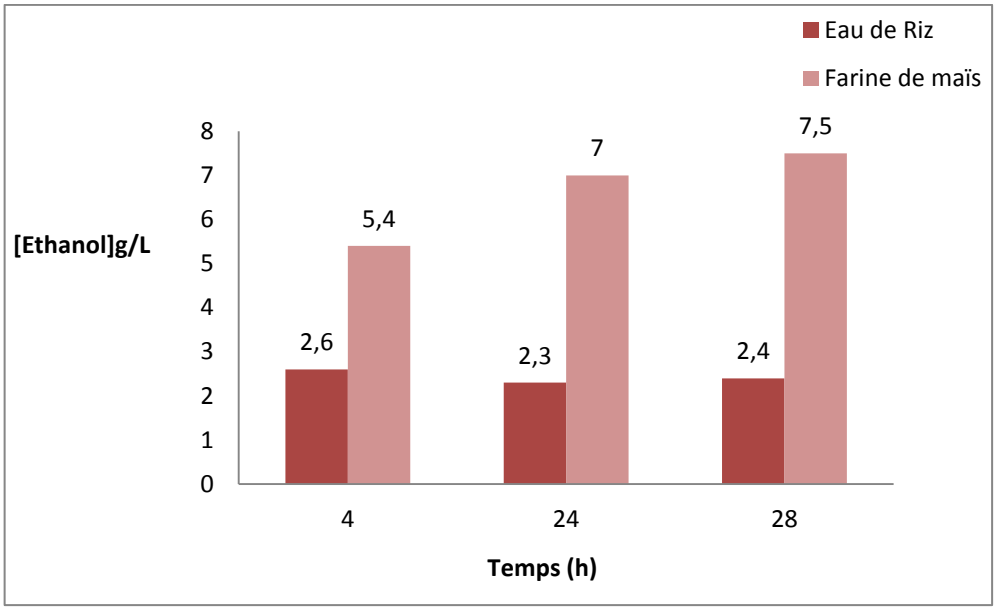


Figure 30 : Production d'éthanol à partir de deux sources d'amidon non soluble.

La farine de maïs a donné un taux d'éthanol maximal et stable entre 24h et 28h (7g/L), il est meilleur que celui obtenu en utilisant l'eau de riz (une moyenne de 2,5 à partir de 4h). Les deux substrats ont donné des rendements plus faibles par rapport à celui obtenu en utilisant de l'amidon soluble ou peu soluble à la même concentration (0,23g d'éthanol/g d'amidon pour la farine de maïs et 0,083 g d'éthanol/g d'amidon pour l'eau de riz). Ceci est attribué à l'attaque enzymatique peu performante de l'alpha-amylase puisque son substrat n'est pas soluble ou ayant un aspect gélifié. Ceci se répercute aussi sur la performance de la glucoamylase ce qui donne un taux bas en substrats fermentescibles et un taux faible en éthanol.

V Séparation et analyse de l'éthanol récupéré par distillation:

V-1 Identification au dichromate de potassium :

D'après la **(Figure 31)**, le virage de la couleur du réactif de l'orange au vert commence avec l'ajout de l'acide sulfurique. La couleur devient plus foncée (vers le bleu) au cours du temps.



Absence d'éthanol **présence d'éthanol**

Figure 31: Résultat de la révélation au dichromate de potassium.

V-2 Identification par spectroscopie infra rouge :

Les deux spectres représentés en **(Figures 32 et 33)** correspondent à l'éthanol pur 97% (molécule de référence) et notre distillat.

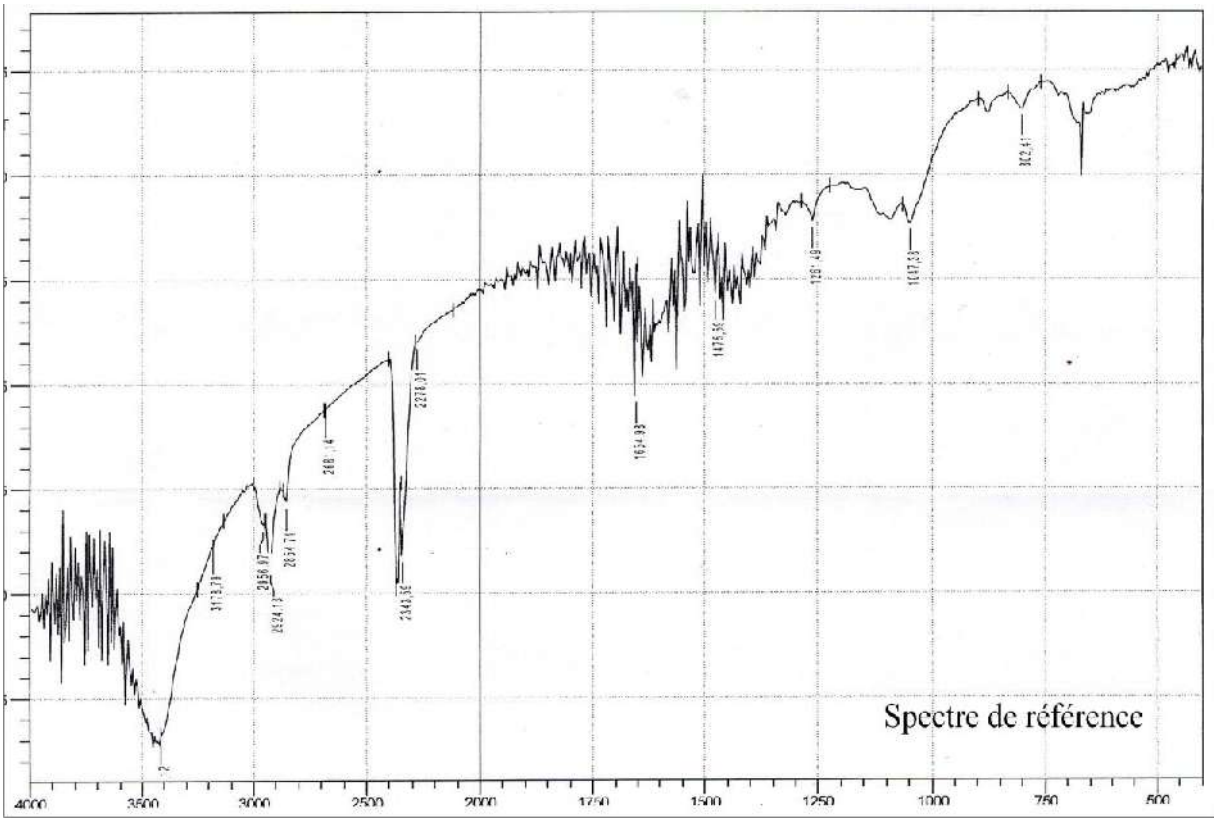


Figure 32 : Spectre de l'éthanol 97%

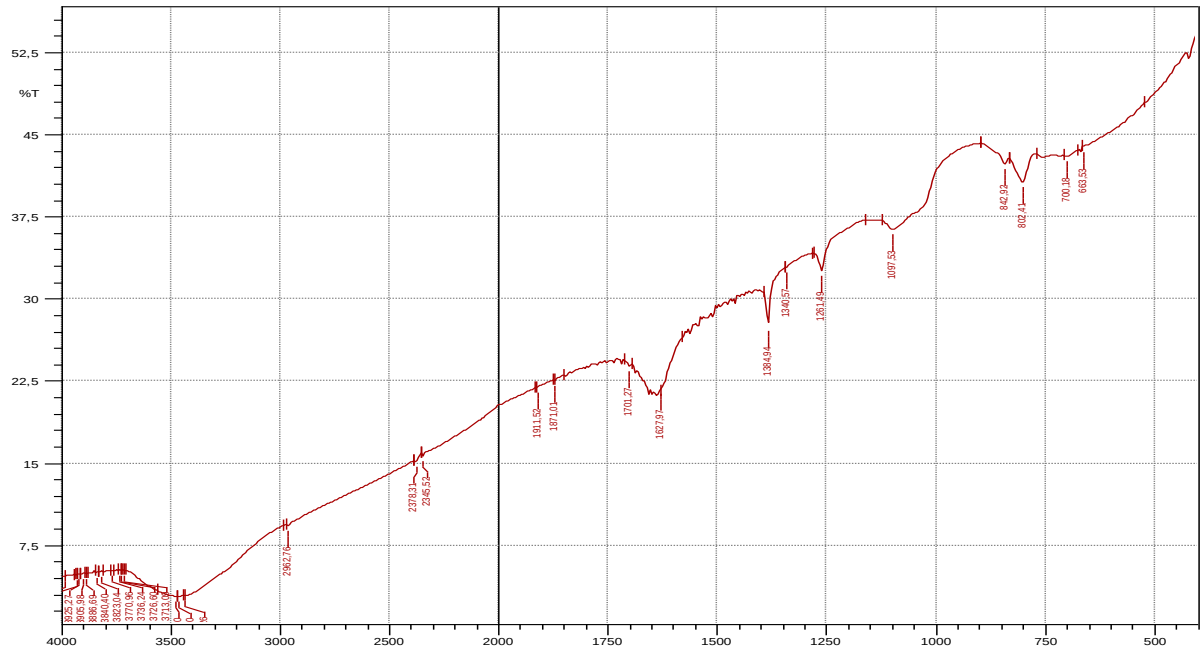


Figure 33 : Spectre du distillat.

Les deux spectres sont superposés avec une différence qui réside dans la hauteur, la largeur et l'uniformité des pics à cause de la différence de pureté et de concentration entre le spectre 01 de référence (Ethanol 97%) et notre distillat. Il s'agit bien donc 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 entre 1410-1330 cm^{-1} présente dans les alcools.
- La bande de déformation caractéristique des groupements CH_3 et CH_2 située entre 1460-1380 cm^{-1}.
- La bande de la liaison –C-O des alcools aux environs de 1050-1100 cm^{-1}.

V-3 Détermination du titre massique du distillat :

Pour une fermentation dans les conditions optimales, nous avons obtenu un distillat ayant :

- Un Indice de réfraction de 1.340, le titre massique est de 18,778%=19% (**Annexe 3**),
- Une densité de 0.96, le titre massique est de 20% (**Annexe 3**).

Le titre massique est très faible car nous avons eu de grandes pertes au cours de la distillation (réfrigérant non adapté au montage de distillation). Ceci explique l'échec du test de flambage.

Les titres massiques obtenus par les courbes densitométrique et réfractométrique ont été confirmés par un dosage direct en utilisant le capteur éthanol (20,21%).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion Générale

L'objectif de ce travail est la production du bioéthanol par fermentation alcoolique en utilisant de l'amidon et les produits amylacés (eau de riz et farine de maïs) comme source de carbone et d'énergie. Le microorganisme producteur est *Saccharomyces cerevisiae*.

Afin d'améliorer le rendement de production de l'éthanol, le substrat subit une liquéfaction par l'alpha amylase puis une saccharification par la glucoamylase avant fermentation. Les conditions optimales trouvées pour la liquéfaction sont : une concentration en amidon de 30g/L, un pH égale à 6, une température de 55°C et une concentration en alpha-amylase de 0.12U.CEIP/ml. La phase de saccharification est exercée à un pH=4, une température de 50°C et une concentration optimisée en glucoamylase de 640mg/L.

Le protocole optimal est constitué de trois phases :

- Une première phase de liquéfaction de 2heures dans les conditions optimales,
- Une deuxième phase de saccharification de 6heures dans les conditions optimales,
- Une troisième phase de « fermentation couplée à la suite de la saccharification» de 20H à 24H. Cette phase s'exerce à température ambiante, à un pH situé entre 4 et 5. Le taux maximal d'éthanol est de 16 à 17g/L avec un rendement de 0,55g d'éthanol /g d'amidon.

L'application sur l'amidon peu soluble nécessite une rectification de la phase de liquéfaction, car cette phase n'est performante que si le substrat subit 3cycles de « dispersion-liquéfaction de 4h à 5h», aboutissant après saccharification et fermentation à un rendement maximal de production du bioéthanol en 20h à 24h.

L'application sur les produits amylacés non solubles aboutit à des rendements plus faibles (0,23g d'éthanol/g d'amidon pour la farine de maïs et 0,083 g d'éthanol/g d'amidon pour l'eau de riz), car la phase de liquéfaction est peu performante.

Notre étude ne constitue qu'un début sur l'usage des produits amylacés dans la production d'un carburant 100 % biologique, dont l'utilisation respecte l'environnement et ne porte pas d'atteintes écologiques. Le procédé est satisfaisant sur l'amidon soluble et peu soluble ; cependant, il nécessite plus recherche dans le future proche concernant son application sur les produits amylacés non solubles.

ANNEXES

Annexe 1

Préparation des solutions

A) Solutions d'amidon :

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

- Peser la masse d'amidon sec (poudre) nécessaire pour aboutir à la concentration voulue.
-Verser l'amidon pesé dans une fiole choisie puis ajouter 1/3 du volume voulu d'eau distillée froide sur une agitation magnétique jusqu'à une bonne dispersion de l'amidon.
- Terminer l'ajustement du volume voulu avec de l'eau distillée Bouillante.

La solution obtenue est soluble, d'une couleur transparente qui s'épaissit et devient plus visqueuse en fonction de la concentration d'amidon.

B) la solution d'HCl (0.1N) :

Pour obtenir une solution fille N_f=0,1N d'un volume V_f, réaliser une dilution à partir d'une solution mère pure (12N) selon la loi de dilution : $N_m V_m = N_f V_f$

C) La solution de stockage (0.1N) :

-Dissoudre 3.17 g d'iodine (I_2) et 10 g de KI dans une fiole de 250 ml.
-Ajouter un petit volume d'eau distillée et mélanger jusqu' à la dissolution totale.
-Ajuster le volume à 250ml par l'eau distillée.
- Conserver la solution préparée dans un flacon en verre fumé sombre bien fermé.

D) La solution de dosage (0.01N) :

- Diluer 10 ml de la solution de stockage à 100 ml avec l'eau distillée (Dilution de 1/10).
- Conserver la solution de dosage dans un flacon en verre fumé sombre bien fermé.

E) Les solutions tampons :

-Préparer une solution d'acide citrique 0,50 M (soit 105,06 g de $C_6H_7O_8$, H_2O sec par litre) et une solution de phosphate de sodium disodique 0,50 M (soit 71,01 g de Na_2HPO_4 sec par litre).
-Mélanger suivant les indications du tableau ci-dessous puis diluer à 200 ml.

Tableau 8 : Préparation des solutions tampons

(Chahrour Wassila 2013)

pH	Na2HPO4 à 0,50M	Acide citrique à 0,50M	pH	Na2HPO4 à 0,50M	Acide citrique à 0,50M
2,2	1,60 ml	39,20 ml	**5,2**	42,88 ml	18,56 ml
2,4	4,96 ml	37,52 ml	**5,4**	44,60 ml	17,70 ml
2,6	8,72 ml	35,64 ml	**5,6**	46,40 ml	16,80 ml
2,8	12,68 ml	33,66 ml	**5,8**	48,36 ml	15,82 ml
3,0	16,44 ml	31,78 ml	**6,0**	50,52 ml	14,74 ml
3,2	19,76 ml	30,12 ml	**6,2**	52,88 ml	13,56 ml
3,4	22,80 ml	28,60 ml	**6,4**	55,40 ml	12,30 ml
3,6	25,96 ml	27,12 ml	**6,6**	58,20 ml	10,90 ml
3,8	28,40 ml	25,80 ml	**6,8**	61,80 ml	9,10 ml
4,0	30,84 ml	24,58 ml	**7,0**	65,88 ml	7,06 ml
4,2	33,12 ml	23,44 ml	**7,2**	69,56 ml	5,22 ml
4,4	35,28 ml	22,36 ml	**7,4**	72,68 ml	3,66 ml
4,6	37,40 ml	21,30 ml	**7,6**	74,92 ml	2,54 ml
4,8	39,44 ml	20,28 ml	**7,8**	76,60 ml	1,70 ml
5,0	41,20 ml	19,40 ml	**8,0**	77,80 ml	1,10 ml

Annexe 2

Pour réaliser l'hydrolyse de l'amidon, *SAIDAL* nous a fourni 2 flacons différents d'alpha amylase. Avant de mélanger le contenu des deux flacons, nous avons réalisé une cinétique enzymatique pour les deux enzymes dans les conditions indiquées en ci-dessous (**Figure 34**). Les cinétiques des deux enzymes étant identiques, nous avons donc mélangé les deux échantillons d'enzymes afin d'obtenir un échantillon homogène.

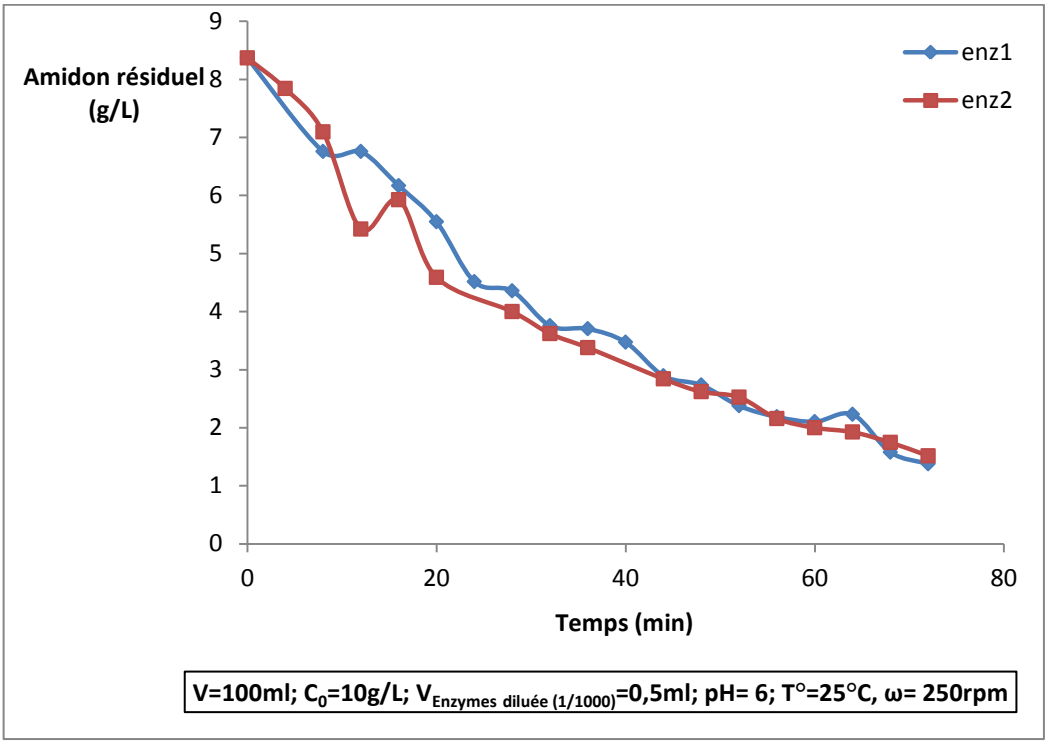


Figure 34 : Cinétique des deux échantillons d'enzymes fournis par SAIDAL.

Annexe 3

Courbes d'étalonnage

A/ Dosage d'amidon :

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

-Faire une gamme de dilutions allant de 0.2 à 2 g/L en utilisant du HCl (0.1N).

-Faire un dosage de 1ml de mélange final avec 2.4ml d'iodine (0.01N).

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

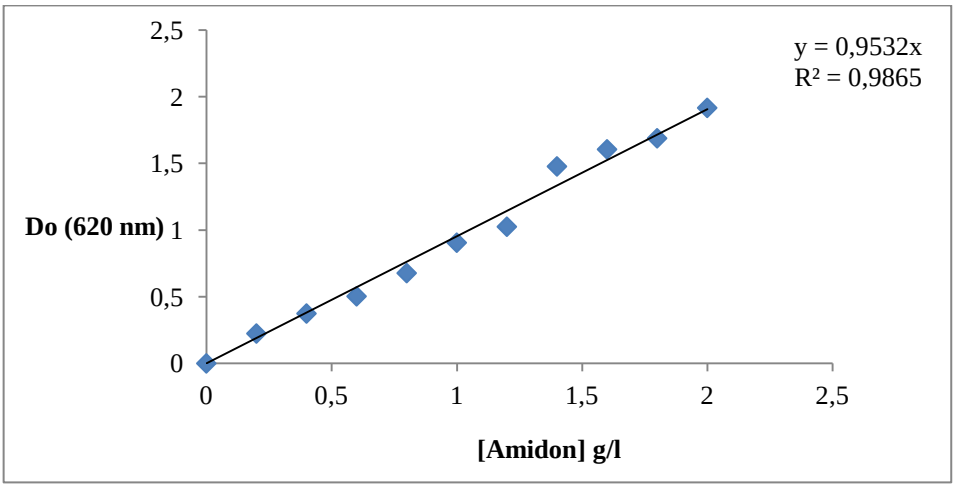


Figure 35 : Courbe d'étalonnage destinée au dosage d'amidon par spectrométrie.

B/ Dosage du glucose :

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

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

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

-Mesurer l'absorbance à 505nm après une incubation à l'abri de la lumière pendant 30min.

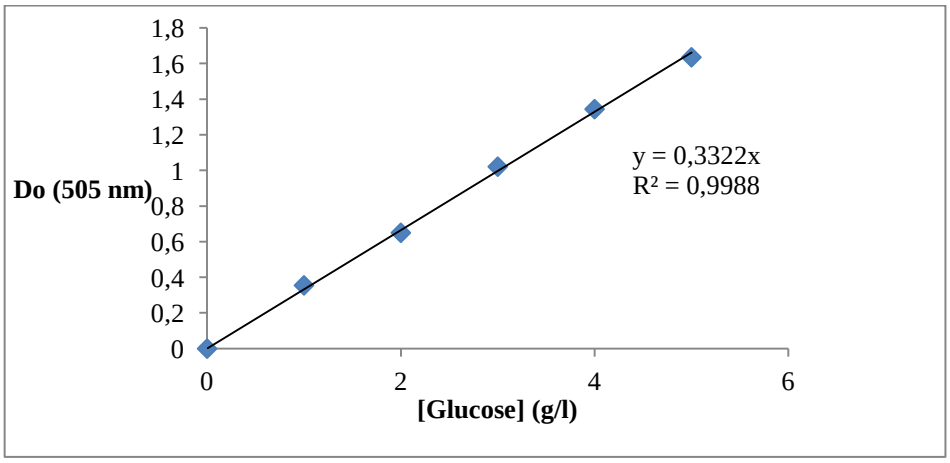


Figure 36 : Courbe d'étalonnage destinée au dosage de glucose par spectrométrie.

C/ Dosage de l'éthanol par méthodes densitométrique et réfractométrique :

Les deux méthodes ont été établies pour la même gamme d'étalonnage. Le protocole se résume comme suit :

• Préparer des solutions d'éthanol-Eau distillée de titres massiques suivants: 10%, 30%, 50%, 60%, 80%, 100%.

• Mesurer l'indice de réfraction de chaque solution à l'aide d'un réfractomètre en utilisant l'eau comme référence.

• A l'aide d'un pycnomètre, mesurer les densités de ces solutions :

- Peser le pycnomètre vide, tarer,
- Remplir le pycnomètre jusqu'au trait avec de l'eau distillée : noter m1
- Remplir le pycnomètre avec une solution étalon : noter m2.
- Le volume étant le même, la densité est calculé comme suit : d= (ρ2/ρ1)=(m2/m1).

• Tracer les graphes: **IR=f(T% éthanol) et d=f(T%éthanol)**. Les deux courbes d'étalonnages sont représentées sur la figure ci dessous.

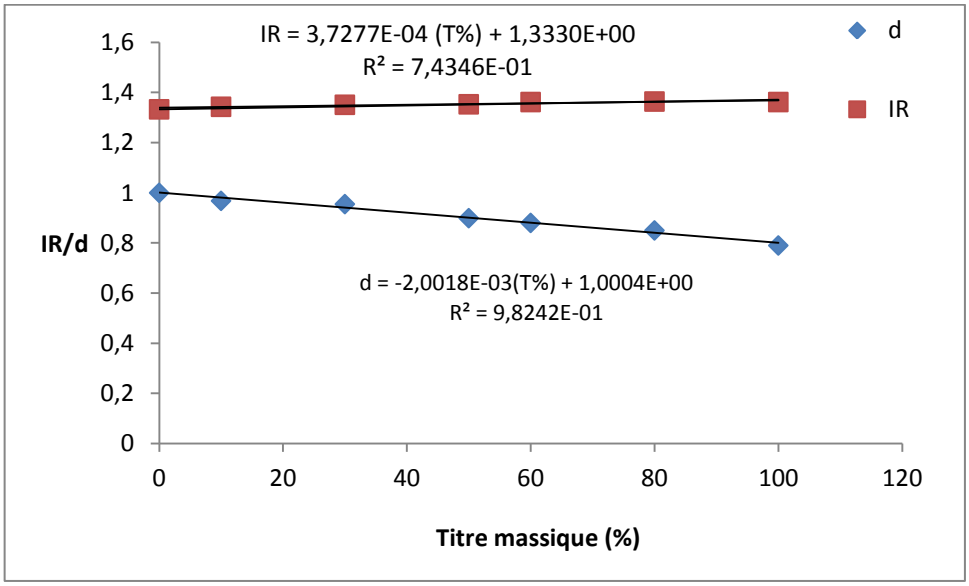


Figure 37 : Courbe d'étalonnage destinée au dosage de l'éthanol par mesure de la densité et de l'indice de réfraction.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

A

AbdEl-Rahman, E.M 1990 : Studies on some thermophilic cterial strains.Ph.D.Thesis, Al-Azhar Univ., Fac of Sci., Bot.and Microbiol.Dept., Cairo, Egypt. **– In : E.M.El- Safey :** Purification and characterization of α-amylase isolated from aspergillus Falvus Var .Columnaris

Afifi AF , Kamel EM ,Khalil AA , Fouaad E ,Fazxi M , Housry M , 2008 : Purification and characterization of α-amylase from penicillium olsonii under the effect some antioxidant vitamins , global J.Biotechnol.biochem . 3(1) : 14-21 – **In : Tahar Nouadri et al , 2010 :** Characterization of α-amylase from penicillium **:** puification and characterization of α-amylase from penicillium camemberti PL21

Aldiguier Anne –sophie, 2006: L'activité biocatalytique en haut densité cellulaire de Saccharomyces cerevisiae. Thèse de doctorat .L'institue national des sciences appliquées de Toulouse.

Amillastre Emilie , 2012 : Amélioration de la robustesse de souches de levures aux stress technologiques par une stratégie de génie microbiologique. Application à la production industrielle de bioéthanol à partir de matières premières agricoles. Thèse de doctorat .l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

B

Benaouida Karima, 2008 : Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extreme (sol environnement des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Thèse de doctorat. Université de Mentouri Constantine.

Ben Chaaebane Mohamed Fadhel : Intensification de la production d'éthanol biocarburant dans un bioréacteur bi-agité avec recyclage cellulaire : Modélisation et stratégie de conduite. **.** Thèse de doctorat , INSA de Toulouse

Birckel Emeline , 2011 : Pharmacie enquête sur les connaissances et le mode de consommation d'alcool des femmes pendant la grossesse. Thèse de doctorat. Universite Henri Poincare - Nancy 1

Boitard Laurent , 2010 : Mesure du métabolisme de la levure par flux ´ osmotiques entre gouttes d'émulsion. These de Doctorat . l'Université Paris VII - Denis Diderot

C

Chahrour Wassila, 2013 : La transformation des sucres solubles des fourrages en acide lactique et propionique par les bactéries lactiques naturellement présente sur le fourrage. Thèse de doctorat . Université d'Oran

Celton Magalie, 2011: Etude de la réponse de *Saccharomyces cerevisiae* à une perturbation NADPH par une approche de biologie des systèmes**.** Thèse de doctorat Centre International D'études Supérieures En Sciences Agronomiques De Montpellier Supagro.

D

Daho Tizane , 2008 : Contribution a l'étude des conditions optimales de combustion des huiles végetales dans les moteurs diesel et sur les brûleurs : cas de l'huile de coton. Thèse de doctorat université d'Ouagadougou.

Dutriez chilpéric, watterlot fabrice, 2016 : comparaison des procédés de production de bioéthanol à base d'amidon ou d'algues. Thèse .Ecole des mines Douai

E

El-Safey , E.M , 1994 : production of microbial α-amylases under solid –state incubation conditions in the open air . Sci.A thesis , bot and microbial .Dept ., Fac . Sci., Al –azhar Univ.,Cairo-Egypt – **in : E.M.El- Safey :** Purification and characterization of α-amylase isolated from aspergillus Falvus Var .Columnaris

F

Ferland Chantale , 2008 : La production d'éthanol à partir de grains de maïs et de céréales. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec, Canada. 2875,boulvard Laurier,9^{éme} étage . publication N°EVC 029 . p 4 -5

.

H

Hayashida S,Teramoto Y, Inoue T (1988). Appl.Environ.Micrbiol ;54 :1515-22 – **In :** : **I. Sani 2014 :**Isolation, partial purification and charavterization of α-amylase from Bacillus subtilis

Huchette. M, 1967 : la transformation de l'amidon pour usages industriels. Etablissements ROQUETTE Frères — SESTREM Pas-de-Calais — FRANCE et alimentaires. *Rev. Port. Quínt., 10, 16*

Hugues Paul, 2015 : Stratégies technologique et réglementaire de déploiement des filières bioénergies françaises. **.** Thèse Doctorat, l'École nationale supérieure des mines de Paris

K

Kacimi Mohamed mehdi, **2008** : Analyse de secteur de l'éthanol selon les principes du développement durable .centre universitaire de formation en environnement en vue de l'obtention du garde de maitre en environnement. Thèse Doctorat .Université De Sherbrooke **–** Canada

Khan Muhammad Kamran , 2010 : Extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec la sérum albumine. Thèse de doctorat. Université d'Avignon.

Klang M.J.Talmaond P.djidimbelen N.Tavea F.and Ndjouenkeu R.2014 : Patial purification and characterization of α-amylases from Abrus precatorius, Burnatia enneandra and Cadaba farinosa. , volume 5.

L

Labrecque M.H 2003 : Etude e la capacité d deux souches de levure à dégrader l'xylène. Mémoire, faculté des sciences l'agriculture et de l'alimentation . Université Laval

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

Larpent J P, **1990** : Biotechnologie des levures Masson, P 132 315 . Paris.

Leclerc 1995 : cours de microbiologie générale nouveau programme . Biosciences et techniques . doin éditeurs . Paris

Lindgren,S and Refia,O (1984) : Amylolitic lactic acid bacteria in fish silage. Journal of Applied Bacteriology 57,221-228—**In : E.Giraud 1993 :** Purification and characterization of an extracellular amylase from Lactobacillus plantarum strain A6.

Lin, L.-L.,Chyau C.-C., and Hsu W.-H., 1998 : Production and properties of a taw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic Bacillus sp.TS-23- **In : E.M.El-Safey :** Purification and characterization of α-amylase isolated from aspergillus Falvus Var .Columnaris

M

Multon J.L , 1992 : Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides de charge dans les IAA, Tec et Doc Lavoisier Paris, ISBN 2-85206-702-1

Malumba Paul, Sébastien Janas , Claude Deroanne , Thaddée Masimango, François Béra ,2010 : Structure de l'amidon de maïs et principaux phénomènes impliqués dans sa modification thermique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **15**(2), 315-326

N

Nehme Nancy , 2008: Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* : impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. Thèse de doctorat . L'institut National Polytechnique De Toulouse.

Noui. Y, 2001 : Optimisation de la production de la biomasse Saccharomyces cerevisiae cultivée sur extrait de datte. Mémoire d'ingénieur **.** institut d'agronomie, Batna

P

Pohorecky. L.A et Brick. J ,1988: « Pharmacologie of éthanol ». Pharmacology et Therapeutics , vol. 36, no 2-3, p. 335–427

R

Rassaert Charles , 2012: Succès et déboires des biocombustibles au Brésil, et utilisation de la politique énergétique de l'éthanol . Thèse de doctorat. Université Paris-Sorbonne

Rhayour Khadija , 2002 : Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur Esherichia coli, Bacillus subtilis et sur Mycobacterium phlei et Mycobacterium fortuitum , Université Sidi Mohamed Ben Abdellah.

Riess Julien , 2012: Intensification de la brique "fermentation alcoolique" de substrats betteraviers (et autres substrats) pour la production d'éthanol. . Thèse de Doctorat Université De Toulouse.

S

Saihia Asma, 2014.: l'effet d'éthanol sur les paramètres hématologiques ,biochimiques et les paramètres de reproduction chez le lapin male Oryctolagus Cuniculus.Thèse de doctorat Université Badji-mokhtar- Annaba.

Salhi Abdelhak, Bouchher Saadia, 2015 : Production De Bioéthanol Par Fermentation Alcoolique. Université Dr Yahia Farés De Médéa

Sani .I, A. Abdulhamid, F. Bello, M. Yahaya et AI Bagudo , 2014 :L'isolement, la purification et la caractérisation partielle de l'α-amylase de Bacillus subtilis. Journal de microbiologie et de recherche en biotechnologie Bibliothèque de recherche Scholars J. Microbiol. Biotech. Res, 4 (1) 49-54

Sauer Jorgen, Bent W.Sigurskjold, Ulla Christensen,Torben P.Frandsen ,Ekatrena Mirgorodskaya, Matt Harrison, Peter Roepstorff , Birte Svensson , 2000 : glucoamylase :structure /fonction relationships and protein engenering .Biochemica Et Biophysica Acta 1543 (275-293)

Sen ,S and Chakrabarty ,S.L.1986 : Amylase from Lactobacillus cellobiosus D-39 isolated from vegetable wastes. Journal of Fermentation Technology 62, 407-413.- **In** : **E.Giraud 1993 :** Purification and characterization of an extracellular amylase from Lactobacillus plantarum strain A6.

V

Villette J. 1991 : Relation structure-fonction de la cyclomaltodextrine glucanotransférase de Bacillus circulans E 192. Thèse USTL

W

Wertz Jean-Luc , 2011 : L'amidon et le PLA : deux biopolymères sur le marché. Document FARR-Wal – Avec le soutien de la Région Wallonne – DGO3/4

Y

Yandri A.S.,T.Suhartati,S.Hadi.(2010). European Journal of Scientific Research.39, 64-74 —**In** : **I. Sani 2014** Isolation, partial purification and charavterization of α-amylase from Bacillus subtilis.

Les sites :

Site 1 : http://www.educonline.net « les formules développées et semi développées »

Site 2 : http://www.chemicalTechnologie.net

Site 3 : http://www.Bioéthanolcarburant.net (site complet sur l'éthanol)

Site 4 : http://www.energieaireetclimat.net

Site 5 : http://www.novozymes.com (product range enzymes for biocatalysis for smarter chemical synthesis**)**