

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire de Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés



BIOGEP

Thèse de doctorat

En Génie de l'Environnement

Présentée par

Mme KECHKAR Madina épouse CHAIMI

Intitulée

**PROCEDE DE CONVERSION DE LA BIOMASSE
POUR LA PRODUCTION DURABLE DE
BIOCARBURANTS**

Rapporteurs	Mlle AZIZA Majda Amina	Directrice de recherche	CDER
	Mr AHMED ZAID Toudert	Professeur	ENP
Présidente :	Mme BELHANECHÉ Naima	Professeur	ENP
Examineurs :	Mr IGOUD Sadek	MRA	UDES
	Mr CHERGUI Abdel Malek	Professeur	ENP
	Mme ZEMMOURI Hassiba	MCA	USTHB
	Mr LOUNICI Hakim	Professeur	Univ de Bouira

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire de Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés



BIOGEP

Thèse de doctorat

En Génie de l'Environnement

Présentée par

Mme KECHKAR Madina épouse CHAIMI

Intitulée

PROCEDE DE CONVERSION DE LA BIOMASSE
POUR LA PRODUCTION DURABLE DE
BIOCARBURANTS

Rapporteurs	Mlle AZIZA Majda Amina	Directrice de recherche	CDER
	Mr AHMED ZAID Toudert	Professeur	ENP
Présidente :	Mme BELHANECHÉ Naima	Professeur	ENP
Examineurs :	Mr IGOUD Sadek	MRA	UDES
	Mr CHERGUI Abdel Malek	Professeur	ENP
	Mme ZEMMOURI Hassiba	MCA	USTHB
	Mr LOUNICI Hakim	Professeur	Univ de Bouira

ملخص

ترتكز هذه الدراسة على إنتاج الإيثانول الحيوي عن طريق التحويل الكيميائي لدبس قصب السكر. على وجه الخصوص، تمت دراسة القدرة على إنتاج الإيثانول باستخدام سلالات معزولة محليًا من الساكروميسيس سيرفيسيا. كشفت الدراسة أن السلالتين س2 وس3 لديهما إنتاج أعلى من الإيثانول (3.8 و 3.9 غ/ل) على التوالي مقارنة بالسلالة س1 والسلالة المرجعية (2.2 و 2.1 غ/ل). بالإضافة إلى ذلك تظهر النتائج، ان استعمال السلالتان س2 وس3 مع بعضهما في التخمر يعطي أكثر فعالية في إنتاج الإيثانول، بحيث ارتفعت نسبة الإيثانول من 52% و 59% ل س2 وس3 على التوالي إلى 68% في حالة التخمر باستعمال السلالتين س2 وس3 مع بعضهما. اظهر العمل الحالي ان تحويل دبس قصب السكر لإنتاج الإيثانول الحيوي يفتح افاقا جيدة لاستعادة الطاقة من هذه الكتلة الحيوية بمردود 74 غ/ل للإيثانول و انتاجية 1.03 غ/ل/سا.

الكلمات الأساسية: الإيثانول، دبس قصب السكر، تخمر، سلالة معزولة، زراعة مشتركة.

Abstract:

This study focuses on the production of bioethanol by biochemical conversion of sugar cane molasses. In particular, the ability to produce bioethanol using locally isolated *Saccharomyces cerevisiae* strains was investigated. The study revealed that strains S2 and S3, have a high ethanol production (3.8 and 3.9 g. L⁻¹ respectively) compared to that of S1 and a reference strain (2.2 and 2.1 g.L⁻¹ respectively). In addition, our results show that co-culture offers considerable potential for efficient conversion to ethanol; in fact the efficiency went from 52 and 59% for S2 and S3 respectively in the monoculture to 68% for the co-culture of S2 and S3. The present work has shown that the biochemical conversion of sugar cane molasses for the production of bioethanol opens good prospects for the energy recovery of molasses, with a yield of 74 g / L of ethanol, and a bioethanol productivity of 1.03g / L / h.

Keywords: Bioethanol, sugarcane molasses, fermentation, isolated strain, co-culture.

Résumé :

La présente étude porte sur la production de bioéthanol par conversion biochimique de mélasse de canne à sucre. En particulier, la capacité à produire du bioéthanol en utilisant des souches de *Saccharomyces cerevisiae* localement isolées a été étudiée. L'étude a révélé que les souches S2 et S3, ont une production d'éthanol élevée (3.8 et 3.9 g.L⁻¹ respectivement) par rapport à celle de S1 et d'une souche de référence (2.2 et 2.1 g.L⁻¹ respectivement). De plus, nos résultats montrent que la co-culture offre un potentiel considérable pour la conversion efficace en éthanol, en effet l'efficacité est passée de 52 et 59% pour S2 et S3 respectivement dans la monoculture à 68% pour la co-culture de S2 et S3. Le présent travail a montré que la conversion de la mélasse de canne à sucre pour la production du bioéthanol ouvre de bonnes perspectives pour la valorisation énergétique de la mélasse avec un rendement de 74 g/L d'éthanol et une productivité de bioéthanol de 1,03g/L/h.

Mots clés : bioéthanol, mélasse de canne à sucre, fermentation, souche isolée, co-culture.

DÉDICACES

Ce travail est dédié à mes chers parents

À mon mari,

À mes enfants,

À mon frère et mes sœurs,

À la mémoire de ma Babouchka ,

À ma belle Famille,

À tous mes amis,

REMERCIEMENTS

Mes remerciements, avant tout, à **DIEU** le Tout Puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné durant toutes ces années afin que je puisse concrétiser ce travail de thèse.

Un grand merci au Professeur **YASSAA Noureddine**, ex Directeur du CDER, commissaire aux énergies renouvelables et à l'efficacité énergétique actuellement, de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer la majorité de mes travaux de recherche au sein du laboratoire Bioénergie et Environnement CDER.

Mes remerciements particuliers à ma promotrice Mlle **AZIZA Majda**, Directrice de recherche au niveau du CDER, je la remercie d'avoir accepté de m'encadrer, de sa disponibilité et son aide tout le long de ces années, qu'elle trouve ici toute ma gratitude.

Je remercie également mon co-encadreur Mr **AHMED ZAID Toudert** Professeur à l'ENP, pour son aide précieuse et tous les conseils qu'il a pu me fournir, merci pour sa confiance et sa patience.

Je tiens à remercier Madame **BELHANECHÉ Naima**, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, d'avoir fait l'immense honneur de présider le jury de ma thèse ;

Mes vifs remerciements vont aussi aux membres du jury : Monsieur **CHERGUI Abdel Malek**, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, Monsieur **LOUNICI Hakim**, Professeur à l'université de Bouira, Monsieur **IGOUD Sadek**, Maître de Recherche A à l'Unité de Développement des Équipements Solaires(UES) et à Madame **ZEMMOURI Hassiba** Maître de Conférence A, à l'USTHB qui ont cordialement accepté d'être examinateurs de ce travail.

Mes profonds remerciements vont aussi à Mme **DJELAL Hayet** enseignante-chercheuse à l'EME Rennes, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi qu'à Monsieur **AMRANE Abdeltif** Professeur à l'Université de Rennes1, d'avoir collaboré avec nous ce qui a abouti à la publication d'un article scientifique, un grand merci.

Je remercie également, Mr **DIAF Said** Directeur de l'EPST CDER.

Mes sincères remerciements à toutes mes amies du CDER qui ont partagé avec moi les moments de joie et de peine, merci de m'avoir soutenue et de m'avoir supportée tout au long de ces années.

Je n'arrive pas à trouver de mots suffisamment forts pour exprimer la reconnaissance que j'ai à l'égard de mes parents, merci **Papa** merci **Maman**, d'avoir fait de moi la personne que je suis devenue aujourd'hui.

Enfin, j'adresse mes remerciements, et pas les moindres, à ceux qui ont été là pour moi, qui m'ont soutenue quand le moral n'allait pas ou lorsque je n'avais plus d'énergie pour continuer, ma petite famille ; mon époux **Mohamed** et mes deux enfants **Mohamed Zakaria** et **Maria**.

Enfin, un grand Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de
ce travail

Table des matières

I - Liste des tableaux	
II- Liste des figures	
III- Liste des abréviations	
Introduction générale.....	13

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : LA BIOMASSE ENERGIE

1.1.1. Introduction	18
1.1.2. Techniques de conversion de la biomasse.....	18
1.1.2.1. Voies thermochimiques	19
1.1.2.2. Voie biochimique.....	20
1.1.3. Les biocarburants.....	21
1.1.3.1. La première génération	22
1.1.3.2. La deuxième génération	22
1.1.3.3 La troisième génération	23
1.1.4. Le bioéthanol	24
1.1.4.1.Synthèse pétrochimique	25
1.1.4.2.Synthèse microbienne	25
1.1.5. Schéma général de production du bioéthanol	26
1.1.6. Procèdes de fermentation alcoolique	28
1.1.6.1. Procèdes discontinues	28
1.1.6.2. Les procèdes fed-batch	28
1.1.6.3. Les procèdes continus	29
1.1.6.4. Les fermentations à haute densité	29
1.1.6.4.1. Les intérêts et défis techniques des fermentations à haute densité	30
1.1.7. Récupération de l'éthanol	31
1.1.7.1. La distillation	31
1.1.7.2. La rectification	31
1.1.7.3. La déshydratation	31
1.1.8. Production mondiale du bioéthanol	32
1.1.9. Production du bioéthanol en Algérie.....	33
1.1.10. Impact environnemental, avantages et inconvénient du bioéthanol	34
1.1.11. Produits de la fermentation alcoolique autres que l'éthanol	35
1.1.11.1. Glycérol	36
1.1.11.2.Acide acétique	36
1.1.12. Microorganismes utilisés pour la production du bioéthanol	36

CHAPITRE II : LES LEVURES

1.2.1. Caractéristiques structurelles	40
1.2.1.1. La paroi	40
1.2.1.2. Membrane plasmique	40
1.2.2. Les exigences nutritionnelles	41
1.2.2.1. Source de carbone	41

1.2.2.2. Source d'azote	42
1.2.2.3. Source de phosphore	42
1.2.2.4. Sources d'oligo-éléments	42
1.2.2.5. Les vitamines	42
1.2.3. Métabolisme chez les levures	44
1.2.3.1. Métabolisme oxydatif	44
1.2.3.2. Métabolisme fermentaire	46
1.2.3.3. Métabolisme réspiro-fermentaire	46
1.2.4. Métabolisme des sucres	47
1.2.4.1. Métabolisme des monosaccharides	47
1.2.4.2. Métabolisme des disaccharides	47
1.2.4.3. Métabolisme de polysaccharides	47
1.2.5. Stress chez les levures	48
1.2.5.1. Facteurs influençant le métabolisme de la levure	48
a) Effet de la concentration en substrat	48
b) Effet de la température et du pH	49
c) Effet de l'oxygène et du dioxyde de carbone	49
d) Effet de la concentration de l'éthanol	50
e) Effet de l'acide acétique	50
f) Effet de la pression osmotique	51

PARTIE 2 MATERIEL ET METHODES

2.1. Isolement et identification des levures productrices d'éthanol	
2.1.1. Matériel biologique	53
2.1.2. Isolement des levures	53
2.1.3. Purification des levures	53
2.1.4. Conservation des levures	54
2.1.5. Sélection des souches	54
2.1.5.1. Capacité de production d'éthanol	54
2.1.6. Identification des isolats levuriens sélectionnés	54
2.1.6.1. Méthodes conventionnelles	54
2.1.6.2. Identification moléculaire	55
2.1.7. Effet de quelques stress sur la croissance des levures isolées	55
2.1.7.1. Effet du stress salin	55
2.1.7.2. Effet de la température	55
2.1.7.3. Test de tolérance à l'éthanol	56
2.2. Production du bioéthanol	
2.2.1. Préparation des précultures	57
2.2.2. Milieux utilisés pour la fermentation	57
2.2.2.1. Milieu synthétique à base de glucose	57
2.2.2.2. Milieu synthétique enrichi en NaCl	57
2.2.2.3. La mélasse de canne à sucre	57
2.2.3. Les Fermentations	58
2.2.4. Co-culture S2 et S3	58
2.2.5. Influence de quelques paramètres sur la production du bioéthanol	58
2.2.5.1. Analyse statistique	58

2.3. Techniques analytiques	
2.3.1. Caractérisation de la mélasse	59
2.3.1.1. Analyses physicochimiques	59
2.3.2. Les prélèvements	62
2.3.2.1. Suivi de la croissance	62
2.3.3. Evaluations de la fermentation	62
2.3.4. La distillation	63
2.3.4.1. Analyse du bioéthanol distillé	63

PARTIE 3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Isolement et identification des levures

3.1.1. Sélection et Identification des souches de levures productrices de bioéthanol ...	66
3.1.1.1. Sélection	66
3.1.1.2. Caractérisation morphologique	67
3.1.1.3. Caractérisation biochimique	69
3.1.1.4. Effet de différents stress	70
3.1.1.5. Identification moléculaire	75

3.2. Production du bioéthanol

3.2.1. Production d'éthanol dans un milieu synthétique à base de glucose	76
3.2.2. Production du bioéthanol avec un milieu synthétique d'algue	78
3.2.3. Co-culture S2 avec S3	80
3.2.4. Production de l'éthanol à partir de la mélasse de canne à sucre	84
3.2.4.1. Caractérisation de la mélasse de canne à sucre	84
3.2.4.2. Fermentation de la mélasse de canne à sucre	85
3.2.4.3. Analyse par GCMS du bioéthanol obtenu après distillation	91
3.2.4.4. Optimisation du rendement en bioéthanol	92
3.2.4.5. Modélisation du rendement en bioéthanol	93
Conclusion générale	100
Références bibliographique	104
 Annexes	 118

Liste des tableaux

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : La biomasse énergie

Tableau 1 : Quelques espèces d'algues productrices de carburant	24
Tableau 2 Quelques études récentes sur la production du bioéthanol en Algérie.....	33
Tableau 3 : Comparaison des avantages et inconvénients de l'utilisation du bioéthanol en tant que carburant.....	34
Tableau 4 : Différentes espèces productrices d'éthanol.....	37

Chapitre 2 : Les levures

Tableau 5 : Les sources de carbone pouvant être utilisées par les levures.....	41
Tableau 6 : Récapitulatif des principaux oligo-éléments.....	43

PARTIE 2 MATERIEL ET METHODES

Tableau 7 : Les niveaux des variables indépendantes utilisés dans la CCD.....	58
Tableau 8 : Paramètres d'utilisation du chromatographe.....	64
Tableau 9 : Paramètres d'utilisation du détecteur de masse.....	64

PARTIE 3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 10 : Fermentation de différents hydrates de carbone par des souches isolées sélectionnées.....	69
Tableau 11 : Tolérance des souches isolées à l'éthanol.....	74
Tableau 12 : Comparaison de la consommation et de la production entre les trois souches isolées après 46 h de fermentation en milieu synthétique simulant un hydrolysats d'algues (15 g.L ⁻¹ glucose et 1,37 M de NaCl)	79
Tableau 13 : Caractérisation de la mélasse	84
Tableau 14 : Paramètres des cinétiques de production du bioéthanol	90
Tableau 15 : Matrice du plan de surface.....	93

LISTE DES FIGURES

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LA BIOMASSE ENERGIE

Figure 1 : Procèdes de conversion de la biomasse pour l'obtention du carburant	19
Figure 2 : Schéma général de production du bioéthanol de deuxième génération.....	23
Figure 3 : Biosynthèse de l'éthanol.....	26
Figure 4 Schéma explicatif de production du bioéthanol à partir de plusieurs sources de sucres.....	27
Figure 5 : Production mondiale du biocarburant, le bioéthanol.....	32

CHAPITRE 2 : LES LEVURES

Figure 6 : Métabolisme des levures, oxydatif et fermentaire.....	45
Figure 7 : La glycolyse et le cycle de Krebs.....	45

PARTIE 3 : RESULTAT ET DISCUSSION

Figure 8 : Production de bioéthanol.....	66
Figure 9 : L'observation macroscopique des souches isolées.....	67
Figure 10 : Observation microscopique des souches S1 (a)(b), S2 (c)(d) et S3 (e)(f) sur milieu YMA (X40 ET X100).....	68
Figure 11 : Croissance des levures en présence de différentes concentrations de NaCl.	71
Figure 12 : Sélection des souches de levures productrice de l'éthanol à partir de mélasse de canne à sucre à 30°C et après 24h d'incubation.....	77
Figure 13 : Absorbance mesurée à 600 nm pendant les 46 h de fermentation du milieu synthétique.....	81
Figure 14 : Cinétique de consommation du glucose (a) et de production de l'éthanol (b).....	82
Figure 15 : Comparaison du rendement en éthanol et de l'efficacité au cours de cultures uniques de S2, S3 et de leur co-culture dans un milieu modèle synthétique d'algues (15 g.L ⁻¹ glucoses et 1,37 mol.L ⁻¹ NaCl).....	83
Figure 16 : Cinétique de consommation des sucres au cours de la fermentation de la mélasse (270g/l) (a), (150g/l) (b).....	86
Figure 17 : Croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dans la mélasse à brix 15° et brix 27°	88
Figure 18 : Concentration de l'éthanol (a) et du glycérol (b) au cours de la fermentation brix 15°, par <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89
Figure 19 : Concentration de l'éthanol (c) et du glycérol (d) au cours de la fermentation brix 27°, par <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89
Figure 20 : Spectre obtenu par GCMS du distillat du moût de fermentation.....	92
Figure 21 : Graphique Pareto.....	94
Figure 22 : Valeurs réelles et valeurs prédites.....	95
Figure 23 : Graphique de contour pour le rendement en bioéthanol prédit à partir du modèle.....	96

LISTE DES ABREVIATIONS

BTL : Biofuel To Liquid .

CCD: Central composite design (Plan composite centré).

CDER : Centre de développement des Energies Renouvelables.

DCO : Demande Chimique en Oxygène.

DME : Diméthyléther.

DO : Densité optique.

EMGA : Esters méthyliques d'acides gras.

EMHV : Ester méthylique d'huile végétale.

EtOH : Ethanol.

GC MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

GES : Gaz à effet de serre.

Gt : Gigatonnes.

HEFA : Hydrotreated esters and fatty acids.

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

HVO : Hydrotreated vegetable oil.

NaCl : Chlorure de sodium.

OGM : Organismes modifiés génétiquement.

PCR : Polymerase chain reaction.

pH: Potentiel Hydrogène.

RSM: Response Surface Methodology (Méthodologie des Surfaces de Réponse).

rpm : Rotation par minute.

Y_{EtOH} : Rendement en éthanol (g éthanol / g de glucose).

Y_{Gly} : Rendement en glycérol (g glycérol / g de glucose).

YMA : Yeast malt agar.

INTRODUCTION GENERALE

Alors que la demande mondiale d'énergie continue d'augmenter, les émissions de dioxyde de carbone devraient atteindre un nouveau record, passant de 31 Gt en 2011 à environ 37 Gt en 2035 (Stocker ,2014).

Aujourd'hui, les énergies renouvelables représentent 13% de la consommation totale d'énergie dans le monde, la bioénergie n'en représente que 10%. La bioénergie désigne le contenu énergétique des produits solides, liquides et gazeux dérivés de matières premières biologiques (Eisentraut, 2010).

Dans un contexte de protection de l'environnement par la réduction des émissions de gaz à effet de serre et d'accroissement de l'indépendance énergétique, la plupart des pays s'efforcent à promouvoir ou exploitent déjà les énergies renouvelables telles que les biocarburants issus de plantations énergétiques et même de déchets agro-forestiers.

La production et l'utilisation de ces biocarburants ont donné le jour à de nombreuses critiques en raison de concurrence avec le secteur alimentaire et à l'utilisation des sols à des fins énergétiques (Alalwan et al, 2019)

Cependant, la biomasse est actuellement considérée comme l'une des alternatives les plus prometteuses pour le remplacement des combustibles fossiles conventionnels, en raison de l'abondance des ressources. Pour pallier au phénomène de concurrence avec le secteur alimentaire, on se tourne de plus en plus aux biocarburants de deuxième génération qui n'utilisent pas les parties de la biomasse destinées à l'alimentation humaine. La bioénergie offre également de bonnes opportunités pour exploiter toutes sortes des déchets organiques.

L'Algérie amorce une dynamique d'énergie verte en lançant un programme ambitieux de développement des énergies renouvelables et d'efficacité énergétique. Notre pays s'engage avec détermination dans une transition énergétique afin d'apporter en même temps des solutions globales et durables aux défis environnementaux (Haddoum et al ,2018). Les filières énergétiques sont à même d'assurer un développement économique durable permettant d'entrevoir un nouveau modèle de croissance économique.

Le bioéthanol est le biocarburant alcoolisé le plus populaire disponible sur le marché mondial actuel. Henry Ford a utilisé le terme «carburant du futur» en faisant référence à l'éthanol.

En effet, il présente de nombreux avantages en tant que carburant alternatif. En raison de sa teneur en oxygène, il peut améliorer, dans le cas d'un mélange, les performances de l'essence en diminuant les problèmes de combustion à hauts régimes, en diminuant la production de monoxyde de carbone, les quantités d'hydrocarbures non brûlés qui participent à la formation de l'ozone dans les couches inférieures de l'atmosphère et les particules émises responsables de nombreux troubles respiratoires et du noircissement des bâtiments.

Les substrats utilisables pour la production d'éthanol sont très variés, le choix dépend du coût et de la rentabilité du procédé de conversion.

Le rendement de la production d'éthanol par fermentation microbienne dépend de l'utilisation d'une souche microbienne idéale, d'un substrat de fermentation approprié et d'une technologie de traitement appropriée (Chniti et al, 2014).

Une grande variété de microorganismes a la capacité de produire de l'éthanol à partir de polysaccharides. Un micro-organisme idéal utilisé pour la production d'éthanol doit avoir un potentiel fermentaire rapide, une capacité de floculation améliorée, une osmotolérance appréciable, une tolérance accrue à l'éthanol et une bonne thermotolérance (Brooks, 2008).

Saccharomyces cerevisiae (Sheoran et al, 1998), *Kluyveromyces marxianus* (Limtong et al, 2007), *Escherichia coli* et *Klebsiella oxytocastrain* (da Silva et al, 2005), *Zymomonas mobilis* (Gunasekaran et al, 1999), *Zygosaccharomyces rouxii* et *Candida pelliculosa* (Chniti et al, 2014) ont été étudiés pour la production d'éthanol. Ces levures sont très répandues dans la nature et peuvent être récupérées à partir d'un large éventail de sources terrestres et marines. Les levures peuvent être plus ou moins omniprésentes où elles peuvent apparaître restreintes à des habitats très spécifiques (Chandrasena et al, 2006). Plus de 95% de la production mondiale d'éthanol par fermentation utilise la levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* et ses espèces apparentées (Russell et al, 1987), sa tolérance à l'éthanol est l'une des principales caractéristiques de sa sélection pour la fermentation alcoolique (Mobini et al, 2007) (Patrascu et al, 2009).

Le choix des levures a un impact significatif sur la rentabilité de la production d'éthanol et la viabilité à long terme (Knauf et al, 2006). Les levures tolérantes à des températures élevées, à des taux élevés d'éthanol et aux concentrations élevées en sucre semblent donc très attractives pour l'industrie des alcools (Ylittervo et al, 2011).

Divers micro-organismes de souches indigènes capables de produire de l'éthanol ont été isolés de différentes sources locales telles que les dattes (Djelal et al, 2017), différents fruits (Lee et al ,2011), le lactosérum (Boujema et al, 2016), la canne à sucre et la mélasse de betterave (Hamouda et al, 2016). Les souches isolées du substrat naturel ont donné de bien meilleures performances que les souches commerciales (Djelal, et al., 2017).

C'est dans ce cadre que s'insère ce travail qui vise à isoler des souches de levure locales , provenant de différentes sources, les identifier et ensuite évaluer leur capacité de production de bioéthanol à partir de différents milieux synthétiques et à partir de mélasse de canne à sucre.

Dans ce manuscrit, la première partie présente une étude bibliographique divisée en deux chapitres distincts : le premier rapporte des données générales sur les différentes techniques de conversion de la biomasse ainsi que sur les biocarburants. La deuxième portera sur les levures et leurs métabolismes.

La deuxième partie est consacrée aux matériels et protocoles expérimentaux mis en place pour la réalisation de ce travail de thèse.

La troisième partie représente et discute l'ensemble des résultats obtenus à la suite de cette étude.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale et envisage des perspectives possibles à la poursuite de ce travail.

PARTIE 1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
LA BIOMASSE ENERGIE

1.1.1. Introduction

La biomasse énergie a été définie dans la Directive 2009/28/CE du Parlement européen et du Conseil relative à l'énergie produite à partir de sources renouvelables comme suit : « la fraction biodégradable des produits, des déchets et des résidus d'origine biologique provenant de l'agriculture (y compris les substances végétales et animales), de la sylviculture et des industries connexes, y compris la pêche et l'aquaculture, ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et municipaux » (Barchmann, 2012)

1.1.2. Techniques de conversion de la biomasse

La biomasse est un combustible difficilement exploitable dans son état brut. Sa transformation permet d'obtenir des combustibles plus intéressants sous forme :

- Solide comme les granulés, les plaquettes, le charbon de bois, etc. ;
- Liquide comme l'éthanol, le biodiesel, les bio-huiles de pyrolyse ;
- Gazeuse comme les gaz de décharge, le biogaz, le gaz de bois ou d'autres résidus utilisables dans des moteurs, chaudières ou turbines.

La conversion énergétique de la biomasse repose essentiellement sur deux familles de procédés de conversion à savoir : (figure 1)

- Voie thermochimique ou voie sèche (combustion, gazéification, pyrolyse, etc.) ;
- Voie biochimique ou voie humide (digestion, fermentation, etc.).

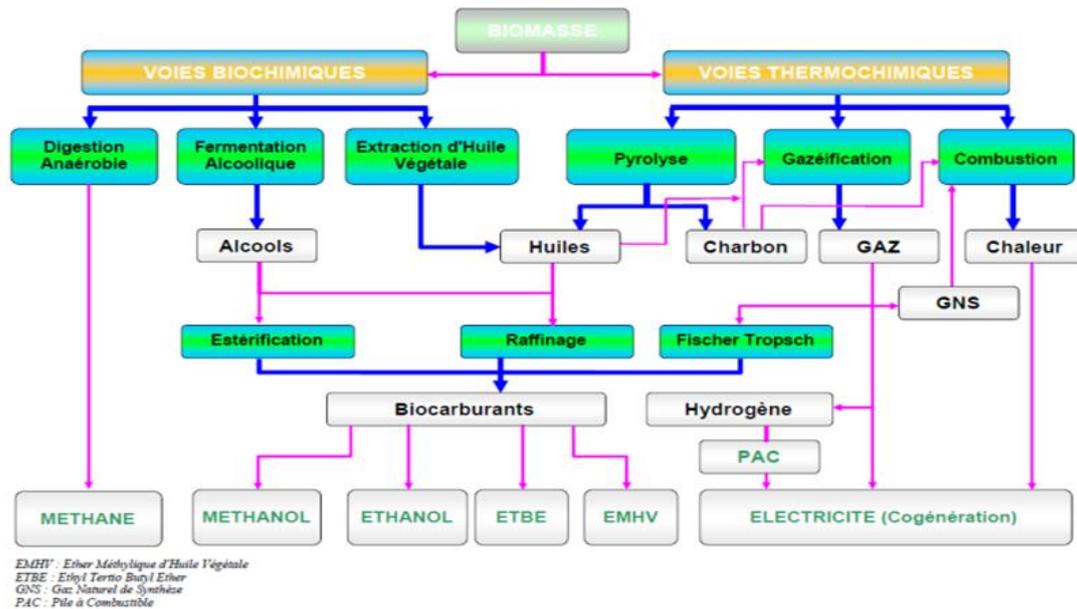


Figure 1 : Procèdes de conversion de la biomasse pour l'obtention du carburant (Sikarwar, 2017).

Chaque voie de valorisation possède des caractéristiques spécifiques, y compris la gamme de matières premières et des produits, coproduits, coûts, l'échelle et le stade de développement de la technologie. Le choix dépendra du type et de la quantité de biomasse disponible, du type d'énergie finale souhaitée, des conditions économiques, environnementales et d'autres facteurs. (Siedlecki, 2011)

1.1.2.1. Voies thermochimiques

La voie thermochimique ou BTL (biofuel to liquid) désigne la filière de valorisation de la biomasse par gazéification puis synthèse. Ces voies sont les plus difficiles à maîtriser.

Le produit final peut être du Diesel, du DME (diméthyléther), du méthanol ou encore de l'éthanol.

La conversion de la biomasse en biocarburants par voie thermochimique se fait à travers les étapes suivantes :

- Prétraitement de la biomasse.
- La gazéification.
- L'épuration de gaz.
- Le conditionnement en gaz de synthèse.
- La synthèse d'hydrocarbure.

Cependant, les composés produits par conversion thermochimique de la biomasse et leurs quantités relatives dépendent typiquement des conditions du procédé, température, pression, vitesse d'alimentation, temps de chauffage, granulométrie de la biomasse (Probstein, 2006).

La synthèse de L'éthanol est encore au stade de la recherche et les rendements annoncés par voie thermochimique ne sont pas meilleurs que ceux par voie fermentaire.

La synthèse Fischer-Tropsch est la plus prometteuse car elle permet la production d'un biodiesel très pur, compatible avec les moteurs actuels, doté d'un bon indice de cétane (70 à 75), et ne contenant ni soufre, ni composés aromatiques, contrairement au gazole issu du pétrole (Dufour, 2008).

1.1.2.2.Voie biochimique

Il existe plusieurs voies de transformation biologique de la biomasse à des fin énergétiques, la production de l'éthanol est certainement la plus intéressante du point de vue environnemental. La conversion biochimique de la biomasse implique l'utilisation de bactéries, de micro-organismes et d'enzymes pour décomposer la biomasse en combustibles gazeux ou liquides, tels que le biogaz ou le bioéthanol.

La conversion biochimique implique essentiellement l'hydrolyse des polysaccharides de la biomasse, et la fermentation des sucres qui en résultent en éthanol

Les technologies biochimiques les plus populaires sont la digestion anaérobie (ou biométhanisation) et la fermentation.

La digestion anaérobie est une série de réactions chimiques au cours desquelles la matière organique est décomposée par les voies métaboliques de microorganismes naturels dans un environnement appauvri en oxygène. Les déchets de biomasse peuvent également produire des combustibles liquides, tels que l'éthanol, qui peut être utilisé pour remplacer les carburants à base de pétrole.

D'autres filières de valorisation énergétique de la biomasse sont très avancées dans leurs développement industriel comme la fermentation méthanique et la fermentation acétonobutylique, ou n'en sont encore qu'au stade de la recherche en laboratoire comme la production d'éthanol à partir du gaz de synthèse ou la synthèse d'hydrogène par voie biologique (Wainaina et al, 2019).

1.1.3. Les biocarburants

Un biocarburant est défini comme tout carburant dont l'énergie est obtenue par un processus de fixation biologique du carbone. Il constitue une alternative aux combustibles fossiles, tels que le charbon et le pétrole, qui sont produits par des processus géologiques.

Issus d'une matière première renouvelable (biomasse) qui constitue un « puits » de CO₂ par photosynthèse, le développement des biocarburants peut contribuer à la lutte contre les émissions de gaz à effet de serre. En effet cette biomasse renouvelable, à la différence des énergies fossiles (pétrole, charbon, etc.), utilise pour sa croissance et ses besoins énergétiques le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère. Par ailleurs, l'utilisation de ces carburants en mélange dans les carburants conventionnels permet d'envisager un gain au niveau des émissions de gaz à effet de serre par le secteur des transports, sans modification majeure des infrastructures de distribution, ni modification des véhicules. L'évaluation des émissions de gaz à effet de serre du puits à la roue, c'est-à-dire de la production de la matière première à la combustion des produits finaux, montre que l'utilisation des biocarburants permet une réduction nette des émissions par rapport aux carburants traditionnels (Olah, 2005) (Dayma, 2007). Cependant, il est important de préciser que ces nouveaux carburants ne représentent pas les seules solutions aux problèmes des émissions polluantes.

Les biocarburants se substituant aux carburants conventionnels doivent donc avoir des propriétés telles qu'ils soient compatibles, au moins à un certain taux d'incorporation, avec les moteurs existants. Ainsi, l'éthanol a été promu comme substituant à l'essence et les esters méthyliques d'acides gras (EMGA) ont été privilégiés comme substituant au gazole. En outre, les huiles végétales hydrotraitées (aussi appelées HVO pour *hydrotreated vegetable oil* ou HEFA pour *hydrotreated esters and fatty acids*) sont incorporées dans le gazole (Ballerini, 2006).

Trois générations de biocarburants peuvent être caractérisées en fonction des matières premières et de la technologie de conversion de la biomasse (Ho, 2014) (Surriya, 2015). Les biocarburants de première génération sont produits à partir de cultures agricoles. Les biocarburants de deuxième génération sont fabriqués à partir de biomasse lignocellulosique. Les biocarburants de troisième génération sont produits à partir d'algues (Aro, 2016).

1.1.3.1. La première génération

Elle regroupe selon le mode de production utilisé deux grands types de produits. Le biodiesel et le bioéthanol (Voloshin, 2016). Le biodiesel est un carburant qui peut être utilisé pur ou en mélange dans le gazole pour les moteurs Diesel. Il est constitué d'esters méthyliques d'huiles végétales (EMHV), eux-mêmes provenant d'huiles végétales (tournesol, colza, palme, soja, etc.). En effet, les esters sont des hydrocarbures obtenus par réaction de transestérification entre les triglycérides et les alcools (El-Araby, 2017). Ces esters possèdent des caractéristiques à la combustion similaires à celles des gazoles (viscosité, indice de cétane, etc.). L'indice de cétane est l'un des principaux indicateurs de la qualité du gazole et caractérise le délai d'allumage du carburant au moment de son injection dans la chambre de combustion (Sivaramakrishnan, 2012). Les alcools (principalement l'éthanol) sont produits à partir des plantes sucrières (betterave, canne à sucre) et des céréales (blé, maïs, orge) (Surriya, 2015). Ils sont utilisés pour la reformulation des essences commerciales à des proportions variables selon les pays. Les alcools, de formule R-OH, présentent de nombreuses caractéristiques intéressantes notamment des indices d'octane élevés (l'indice d'octane indique la résistance au cliquetis d'un carburant dans un moteur à allumage commandé) (Balat, 2007). Les perspectives de développement de ces biocarburants de première génération sont réelles, mais leur production à grande échelle est très controversée en raison de la concurrence qu'ils créent avec les besoins alimentaires des populations. De plus, les quantités produites de nos jours restent encore limitées et ne peuvent se substituer qu'à une faible proportion du carburant d'origine fossile (DÉAUT, 2015)

1.1.3.2. La deuxième génération

Afin de résoudre l'épineux problème de compétition entre les différents usages des ressources agricoles, les biocarburants dits de seconde génération sont apparus (Haque, 2015). Dans ce cas, les matières premières sont sous la forme de biomasse lignocellulosique. Il s'agit essentiellement de résidus d'origine agricole non consommables (pailles, tiges de maïs), de résidus forestiers et de sous-produits issus de la transformation du bois. Les déchets organiques des industries papetières et agroalimentaires constituent également d'importantes ressources (Gomez, 2008).

La production du biocarburant de deuxième génération comprend généralement les étapes suivantes : (Tomás, 2013) (figure 2)

- Prétraitement : procédé par lequel les glucides structuraux composant la biomasse sont rendus plus accessibles pour les étapes suivantes ;
- Hydrolyse enzymatique : décomposition des glucides polymériques en simple sucres qui peuvent être fermentés par les micro-organismes en éthanol ;
- Fermentation : conversion des glucides en éthanol par le biais de microorganismes.
- Récupération de l'éthanol du bouillon de fermentation (généralement par distillation) et la gestion des flux restants.

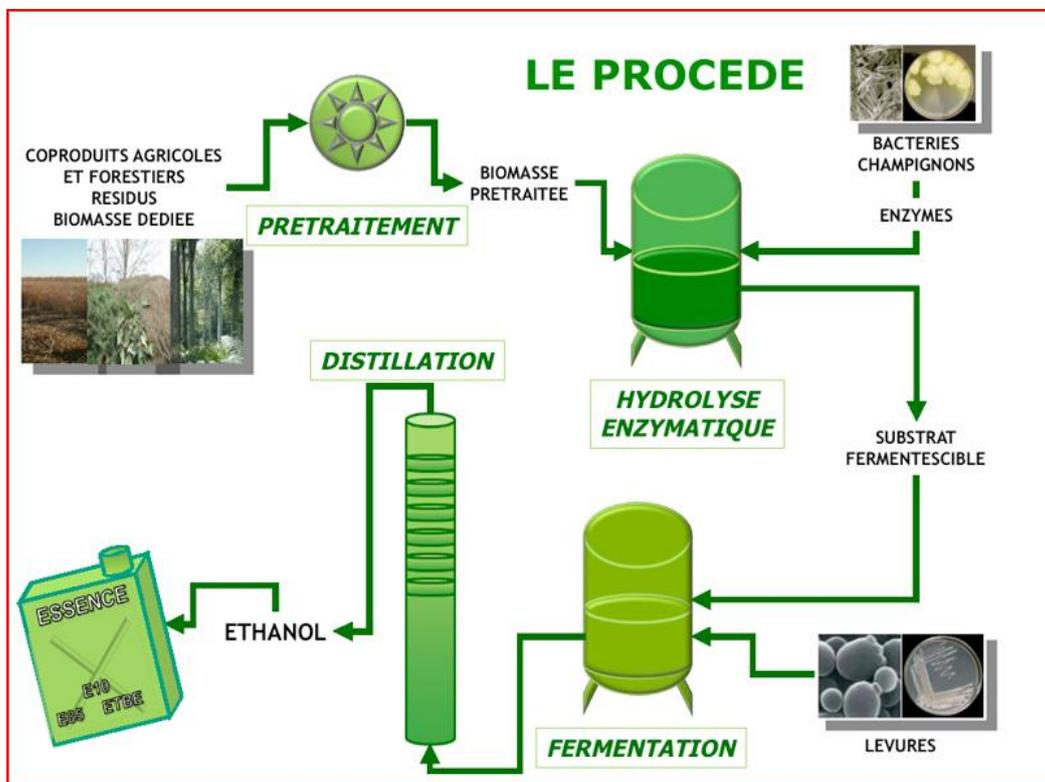


Figure 2 : Schéma général de production du bioéthanol de deuxième génération (Tomás, 2013).

1.1.3.3. Troisième génération

Les biocarburants de 3ème génération sont obtenus par conversion de la biomasse algale (micro ou Macro algues, ou organismes marins) (Raheem, 2015). La biomasse algale est un peu particulière car des milliers d'espèces sont encore méconnues. Cependant différentes espèces de microalgues ont été étudiées pour leur potentiel de production de biocarburants.

Le tableau 1 montre quelques espèces de microalgues ainsi que les macroalgues actuellement utilisées pour synthétiser différents types de biocarburant.

Le processus de conversion dépend de différents facteurs relatifs à la composition de la biomasse, au type de biocarburant souhaité, à la durée du procédé, à des considérations des coûts et conditions de fonctionnement.

De multiples recherches ont été menées sur les biocarburants à base de microalgues, y compris le bioéthanol, le biodiesel, le biohydrogène et le gaz de synthèse (Skorupskaite, 2015) (Li et al ,2014).

La biomasse des cellules de microalgues est également utilisée pour produire du biohydrogène et du biométhane à partir de la digestion anaérobie et fermentation (Mussnug, 2010) .

Tableau 1 : Quelques espèces d'algues productrices de carburant.

Espèces	Carburant produit	Rendement en éthanol	références
macroalgues			
<i>Laminaria hyperborea</i>	bioéthanol	0.43 g éthanol / g biomasse	(Horn, 2000)
<i>Laminaria hyperborea</i>	bioéthanol	0.32 g éthanol / g biomasse	(Adams, 2009)
<i>Gracilaria salicornia</i>	bioéthanol	0.23 g éthanol / g biomasse	(Wang X. L., 2011)
<i>Ulva pertusa Kjellman</i>	bioéthanol	0.45 g éthanol / g biomasse	(Choi, 2012)
<i>Ulva lactuca</i>	bioéthanol	0.30 g éthanol / g biomasse	(Van der Wal, 2013)
microalgues			
<i>Chlorococcum sp</i>	bioéthanol	0.38 g éthanol / g biomasse	(Harun, 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	bioéthanol	0.40 g éthanol / g biomasse	(Lee S. O., 2011)

1.1.4. Le bioéthanol

L'éthanol, également connu sous le nom d'alcool éthylique de formule chimique C_2H_5OH , est un composé chimique inflammable, clair, incolore et légèrement toxique avec une odeur agréable (Licht, 2015).

Il peut être produit soit à partir de synthèse pétrochimique, soit par fermentation de la biomasse à l'échelle mondiale, l'éthanol synthétique représente environ 3-4% de la production totale, tandis que le reste provient de la fermentation de la biomasse (Licht, 2015) .

Le bioéthanol peut être obtenu à partir d'une variété de matières premières comprenant des sources cellulosiques, amylacées et sucrées (Gomez, 2008) (Surriya, 2015).

1.1.4.1.Synthèse pétrochimique (Chauvel, 1985)

Les procédés de synthèse à partir d'éthylène fait appel à :

- L'hydratation indirecte par addition d'acide sulfurique, suivie de l'hydrolyse des esters formés.
- L'hydratation catalytique directe, une solution alcoolique diluée est obtenue directement en présence d'un catalyseur composé d'acide phosphorique adsorbé sur un support poreux.

1.1.4.2. Synthèse microbienne

La fermentation alcoolique consiste en la dégradation du sucre pour produire de l'éthanol et du dioxyde de carbone à l'aide de microorganismes (levures, bactéries, etc.) . Sa réaction chimique globale menée par les microorganismes peut être représentée par la figure3 (Guiraud et al, 2004).

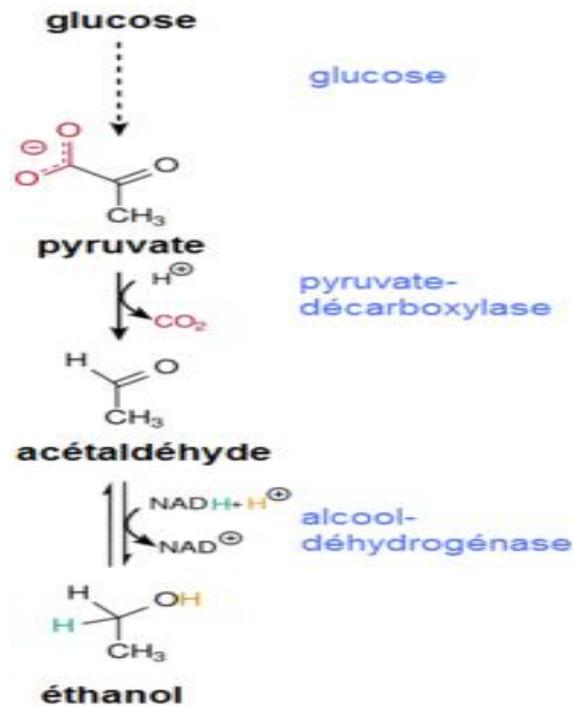


Figure 3 : Biosynthèse de l'éthanol (Guiraud J. P., 2004)

1.1.5. Schéma général de production du bioéthanol

Le processus de production du bioéthanol diffère selon la matière première utilisée : (Vohra, 2014) (figure 4).

A- Matières amylacées

Pour cette catégorie de matières premières, la technologie de conversion commence généralement par la séparation, le nettoyage et la mouture du grain. Ensuite, l'amidon est converti typiquement en sucres au moyen d'un processus enzymatique à température élevée (Kumar, 2010). Les sucres libérés sont alors, fermentés par des levures et le liquide résultant est distillé pour la séparation du bioéthanol. Il existe de nombreuses espèces de microalgues riches en amidon qui, une fois hydrolysée suivent les étapes classiques d'une production de bioéthanol.

B- Matières riches en sucres simples

La canne et la betterave, sont des végétaux qui englobent énormément de sucre simples, le caroube représente un énorme potentiel pour la production du bioéthanol, il existe des matières premières sous forme de déchets pouvant être transformées en bioéthanol, tel que le lactosérum, les rebuts de datte et la mélasse de canne à sucre qui est le substrat principal de notre étude.

C- Matières cellulosiques et lignocellulosique :

La biomasse lignocellulosique est un substrat complexe, constitué des trois principales fractions que sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Le procédé de production d'éthanol consiste à récupérer par hydrolyse le maximum de sucres issus à la fois des fractions cellulosique et hemicellulosiques, puis fermenter ces sucres en éthanol (Vohra, 2014).

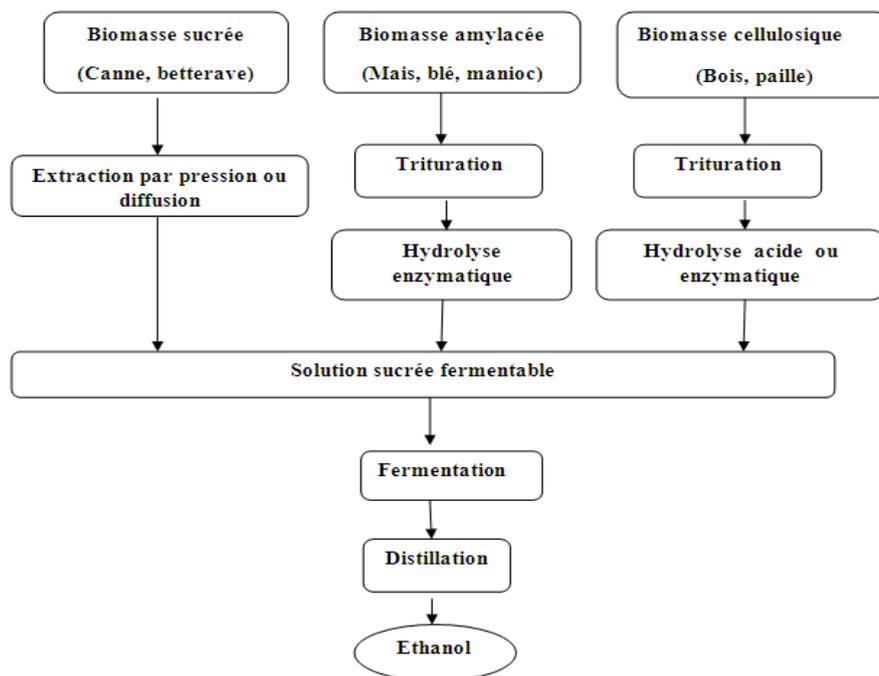


Figure 4 Schéma explicatif de production du bioéthanol à partir de plusieurs sources de sucres.(Nogueira et al, 2008) .

1.1.6. Procédés de fermentation alcoolique

La fermentation de la biomasse pour production du bioéthanol, se déroule dans des bioréacteurs ou fermenteurs, les conditions de fermentation sont contrôlés dans ce cas (pH, température, agitation, aération) et on peut donc optimiser le rendement de production.

Il existe différents modes de conduite des bioréacteurs pour l'alimentation et le soutirage du milieu de cultures (Keim, 1983) (Fadel, 2013).

1.1.6.1. Les procédés discontinus

La fabrication d'éthanol peut être réalisée à l'aide de procédés discontinus, aussi appelés batch, dans des bioréacteurs de grands volumes. Les cultures discontinues constituent des systèmes clos pour la phase liquide. Normalement, il n'y a pas d'addition d'éléments au milieu et la culture se développe jusqu'à ce qu'il y ait carence d'au moins un nutriment essentiel ou jusqu'à ce qu'une modification importante de l'environnement (pH, accumulation de produits toxiques...) bloque la croissance. Cependant, il est possible d'agir sur le milieu de fermentation en régulant par exemple le pH ou le niveau de mousse, le système n'est donc pas totalement clos.

Ces types de cultures n'ont pas des rendements constants tout au long du procédé car la composition du milieu évolue au cours de la fermentation. Les cultures en batch imposent des temps morts lors du remplissage et de la vidange des cuves. De plus il est nécessaire de stériliser l'installation entre chaque fermentation. (Bourat, 1992)

1.1.6.2. Les procédés fed-batch

Les techniques semi-continues appelées fed-batch obéissent aux mêmes principes, mais au cours de la fermentation, certains composants du milieu comme le substrat ou certains précurseurs sont additionnés de façon contrôlée et une partie des produits peut être enlevée du milieu. Ces procédés sont dit semi-continus et permettent de limiter à la fois les inhibitions dues au substrat ou aux produits de fermentation par la régulation de l'alimentation du réacteur.

Le fed batch permet un gain de temps, une augmentation de productivité et une possibilité de modification du milieu en cours de culture mais le risque de contamination est élevé. (Longobardi, 1994)

1.1.6.3. Les procédés continus

Les systèmes continus sont des systèmes ouverts dans lesquels la population cellulaire est maintenue constamment dans un environnement stable et un état de croissance équilibrée, en retirant une partie de la culture et en la remplaçant par du milieu frais (Ward, 1989). Il existe deux types de systèmes continus :

- Le chémostat, dans lequel un facteur nutritif limitant est ajouté à un taux constant.
- Le turbidostat, dans lequel la densité de cellules est maintenue constante.

La fermentation en mode continu permet l'obtention de productivités élevées, facilite le contrôle du procédé et la maîtrise des rendements. Les inconvénients de ce mode de conduite est la limitation du taux de dilution afin d'éviter le lessivage du réacteur ainsi que l'inhibition du métabolisme (croissance et production) par les produits de la réaction biochimique et la perte de viabilité (De Vasconcelos, 2004).

1.1.6.4. Les fermentations à haute densité

L'éthanol en tant que carburant alternatif peut être produit à partir de nombreuses ressources renouvelables de biomasse. Afin d'augmenter la productivité et diminuer les coûts de la production d'éthanol, de nombreuses recherches ont été menées sur la fermentation à haute densité (Neves, 2006) . Ces fermentations sont dites à haute densité car les milieux utilisés contiennent plus de 250 g.L⁻¹ de sucre ce qui permet d'obtenir en théorie en fin de fermentation plus de 15 % (v/v) d'éthanol contrairement aux 10 à 12 % généralement obtenus dans la plupart des distilleries à travers le monde (Puligundla, 2011).

Les procédés de production utilisables sont les mêmes que ceux utilisés en fermentation classique. Néanmoins, l'utilisation de milieux à haute densité fait que ces fermentations sont très sensibles à la température, à la concentration et la viabilité cellulaire, à la composition du milieu, à la présence d'oxygène et à la concentration en éthanol (D'Amore, 1989). Chacun de ces critères a une influence notable sur la productivité de la fermentation (D'Amore, 1992).

1.1.6.4.1. Intérêts et défis techniques des fermentations à haute densité

Les fermentations à haute densité possèdent de nombreux avantages. En effet, ces fermentations permettent (Laopaiboon et al, 2009) (Puligundla, 2011).

- d'augmenter les capacités de production sans modification de la structure de production.
- d'augmenter la concentration en éthanol dans le milieu.
- de diminuer la consommation en eau et la quantité d'effluents à traiter.

Tous ces facteurs ont un impact direct et significatif sur les coûts de production de l'éthanol et pourraient donc augmenter la compétitivité de ce carburant vis-à-vis de l'essence. Cette technique de fermentation pourrait aussi permettre une amélioration significative de la balance énergétique de ce biocarburant et diminuer aussi la quantité de gaz à effet de serre (GES) émis pour sa production.

Néanmoins, les fermentations à haute densité présentent des inconvénients majeurs, (Jones et al, 2007); (Pidcocke, 2009) comme :

- la forte pression osmotique en début de fermentation et la concentration élevée en éthanol dans le milieu en fin de fermentation, ce qui affecte le développement des levures et diminuent la viabilité cellulaire en fragilisant les cellules.
- l'augmentation de la durée de fermentation
- l'utilisation incomplète du substrat et l'augmentation de la production d'acides organiques et de glycérol
- la limitation des nutriments
- l'augmentation de la viscosité, donc plus d'énergie est nécessaire pour l'agitation et l'aération
- la diminution de la solubilité de l'oxygène.

Tous ces effets néfastes, provoqués par l'utilisation de milieux à haute densité, ont une influence sur la diminution des performances de fermentation. Cependant, ces inconvénients ne sont pas insurmontables et ne sont que des défis techniques. Il existe trois possibilités pour surmonter ces problèmes :

- utiliser des souches hautement résistantes aux fortes pressions osmotiques et aux fortes concentrations en éthanol, ce qui implique l'utilisation de souche d'organisme génétiquement modifié OGM.
- utiliser des milieux de cultures satisfaisant au mieux les besoins de *Saccharomyces cerevisiae* dans les conditions appliquées en termes de nutriments, de température ou encore d'acidité, En

effet, tous les paramètres peuvent permettre de limiter les conséquences néfastes de la fermentation à haute densité (Puligundla, 2011) .

- utiliser des procédés de fermentation adaptés à ce type de fermentation.

1.1.7. Récupération de l'éthanol

Après fermentation, l'éthanol se trouve dans un moût contenant principalement de l'eau et des composés provenant de la dégradation de la biomasse, des substances ajoutées au cours du procédé mais également d'autres molécules produites par les microorganismes simultanément à la production de l'éthanol, comme les alcools supérieurs, glycérol et acide acétique.

L'éthanol utilisé comme carburant doit être pur et anhydre s'il est mélangé à l'essence, ou contenir moins de 5 % (v/v) d'eau s'il est utilisé seul pour la carburation. Les différents procédés de fermentations permettent l'obtention d'un moût contenant entre 10 et 12 % d'éthanol dans le cas des plantes saccharifères et jusqu'à 18 % pour les plantes amylacées, il est donc nécessaire de le concentrer au préalable et de le purifier par distillation et rectification. Ensuite, il convient de procéder à une déshydratation pour éliminer toute trace d'eau.

1.1.7.1.La distillation

C'est la première étape de récupération de l'éthanol, cette opération de séparation, basée sur la volatilité de l'alcool, permet de passer d'une solution de 10 à 94 ° GL en éthanol. Cependant, à 78° l'éthanol n'est pas le seul élément volatil présent dans le mout fermenté (Walker G. , 2010). D'autres composés sont volatilisés lors de la distillation : des acides gras, des alcools des éthers mais aussi de l'eau et le CO₂ (Didderen et al, 2008).

1.1.7.2.La rectification

Le flegme, issu de la distillation, contient encore de nombreux composés autres que l'éthanol. La rectification permet de séparer l'éthanol concentré de ces impuretés. Celles-ci sont classées en deux catégories selon leur capacité à être distillées respectivement avant et après l'éthanol : les produits de tête et les produits de queue.

La rectification est donc une distillation fractionnée des différents produits présents dans le condensat (Didderen et al, 2008).

1.1.7.3.La déshydratation

Avant tout usage, l'éthanol doit être déshydraté. En effet, les alcools issus de la rectification sont des alcools à 94°GL. Une déshydratation jusqu'à 99.7°GL est nécessaire, elle peut être

réalisée via diverses techniques : ajout de réactifs déshydratants tels que la chaux ou la baryte, déshydratation sous vide, déshydratation extractive mais la plus employée reste la déshydratation par entraîneur azéotropique (Didden et al, 2008).

1.1.8. Production mondiale du bioéthanol

Le graphique ci-dessous (**figure 5**), illustre le volume de production d'éthanol selon les pays en 2018, en milliards de litres.

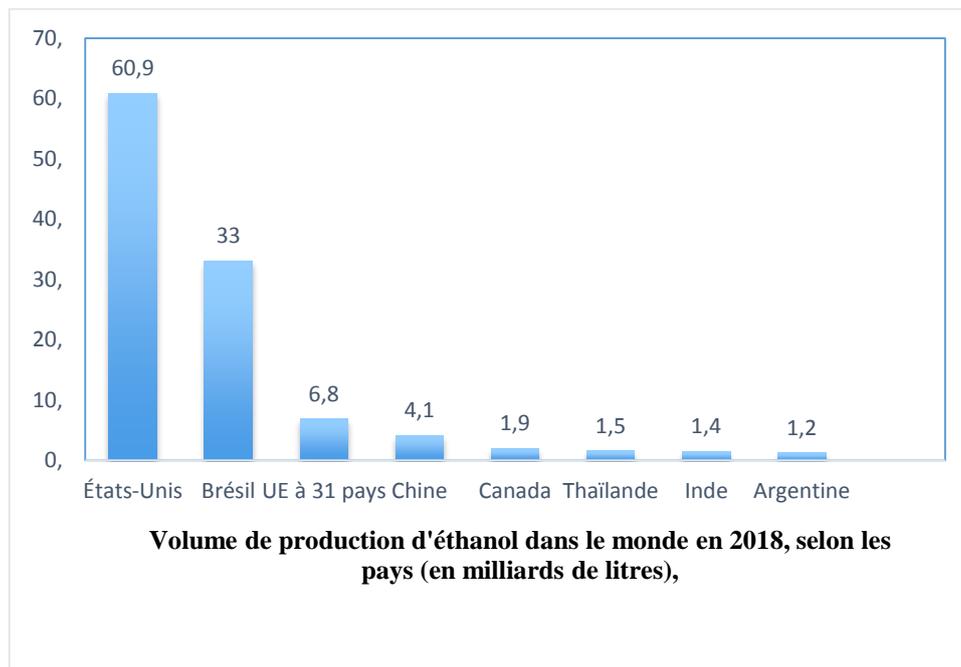


Figure 5 : Production mondiale du biocarburant, le bioéthanol en 2018. (Renewables 2019 Global Status Report)

Les États-Unis sont le leader mondial de la production de bioéthanol avec 61 milliards de litres d'éthanol, suivis du Brésil avec 33 milliards de litres.

Aux États-Unis, le bioéthanol est principalement utilisé comme additif à hauteur de 10% vol dans l'essence. E10 est le carburant standard, cependant le E15 est disponible dans les stations-service depuis 2011.

Au Brésil, il est proposé à la fois sous forme de carburant pur (E100) et mélangé à de l'essence classique avec une teneur de 20 à 25 vol.%. Environ 90% des nouveaux véhicules immatriculés au Brésil sont des véhicules à carburant modulable (FFV), qui peuvent fonctionner à l'essence ordinaire, au bioéthanol ou un mélange des deux.

À la suite de la directive de l'Union Européenne de 2003 sur les biocarburants, l'utilisation et la production de bioéthanol ont augmenté de manière constante dans l'UE. En raison de la baisse de la demande d'essence dans l'UE et du fait que les obligations en matière de mélange ont peu ou pas évolué, la consommation d'éthanol a encore diminué de 1,7% en 2016 pour atteindre 5,2 millions de m³. L'UE a également vu sa production légèrement baisser jusqu'à 6,8 millions de m³ en 2016. Par conséquent, le potentiel du bioéthanol à réduire les gaz à effet de serre de manière rapide et rentable n'est toujours pas pleinement utilisé. Avec la mise en œuvre de la "directive sur les énergies renouvelables", qui prescrit une partie obligatoire de 10% d'énergies renouvelables dans le secteur des transports d'ici 2020, la consommation de bioéthanol dans l'UE devrait augmenter. (Renewables 2019 Global Status Report)

1.1.9. Production du bioéthanol en Algérie :

L'Algérie importe des quantités importantes d'alcool éthylique par an, afin de couvrir ses différents besoins.

De ce fait, un programme expérimental au niveau des différents laboratoires du pays, notamment au niveau du CDER, a été entrepris afin d'étudier la capacité de quelques déchets et ressources naturelles locales, à produire du bioéthanol, les résultats obtenus ont démontré la faisabilité du procédé aussi bien sur le plan technique qu'économique. Le (tableau 2), résume quelques dernières recherches effectuées dans ce sens.

Tableau 2 : Quelques études récentes sur la production du bioéthanol en Algérie.

Auteurs	Substrat	Concentration maximale du bioéthanol obtenu
(Kechkar et al, 2019)	- Mélasse de canne à sucre - Milieu synthétique d'algue verte.	- 74 g/l - 3,9 g/l
(Mehani et al ,2019)	- Rebut de dattes	Etude économique.
(Boudjema et al 2015)	- Lactosérum	- 18,53 g/l
(Benoumhani et al 2020)	- Déchet d'olive	- Etude de faisabilité
Mansouri et al 2019	- Sous-produits agricoles	- 160 g/l
(Djeddou et al 2018)	- Dechet de pomme de terre	73 g/l d'éthanol
(Fennouche et al 2019)	- Betterave sucriere - Datte de moindre qualité.	- 36,5 g/l d'éthanol - 78,2g /l d'éthanol

1.1.10. Impact environnemental, Avantages et inconvénients du bioéthanol

Le bioéthanol présente de nombreux avantages comme résumé, de manière non exhaustive dans le (tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison des avantages et inconvénients de l'utilisation du bioéthanol en tant que carburant (Didden et al, 2008).

Avantages	Inconvénients
Diminution des émissions de dioxyde de carbone et meilleur rendement énergétique des moteurs à explosion	Les véhicules utilisant l'E85 produisent des émissions plus élevées d'oxyde d'azote, d'éthylène et d'acétaldéhyde que les véhicules à essence.
Indice d'octane élevé permettant une meilleure efficacité des moteurs à explosions	Indice de cétane faible
Diminution des émissions de particules, de soufre, de benzène et de butadiène 1-3	Augmentation des émissions d'hydrocarbures par évaporation nécessitant un réglage de la pression de vapeur du carburant
Risque moins élevé de formation d'ozone que l'essence et le diesel	Emission d'acide acétique en cas de réaction entre le catalyseur et le carburant résiduel à l'échappement
Biodégradable	Corrosion des pièces en contact avec l'éthanol
Utilisation flexible de 0 à 100%	Problèmes de stabilité de phase dans le mélange d'essence en cas de présence d'eau (miscibilité).
Capacité énergétique inférieure à celle de l'essence (21285 kJ.kg-1 pour l'éthanol contre 32020 kJ.kg-1 pour l'essence)	Augmentation de la consommation volumique de carburant
Diminution de la dépendance aux sources d'énergie fossile	Prix encore élevé
Stimulation du milieu rural	Concurrence entre alimentation et énergie

Sa formule chimique étant C_2H_5OH , il est qualifié de carburant oxygéné.

Un litre d'éthanol contient environ les deux tiers de l'énergie contenue dans un litre d'essence. Cependant, l'éthanol ayant un fort indice d'octane, il peut améliorer, dans le cas d'un mélange, les performances de l'essence en diminuant les problèmes de combustion à hauts régimes (Easterly, 2007).

L'oxygène contenu dans l'éthanol améliore la combustion du carburant, en diminuant la production de monoxyde de carbone, les quantités d'hydrocarbures non brûlés qui participent à la formation de l'ozone dans les couches inférieures de l'atmosphère et les particules émises responsables de nombreux troubles respiratoires et du noircissement des bâtiments. De plus, il contient des quantités infimes de soufre par rapport aux carburants fossiles. Donc sa combustion ne produit qu'une infime quantité d'oxyde de soufre. Ces derniers sont à l'origine des pluies

acides. Néanmoins, la combustion de l'éthanol peut provoquer la formation d'oxyde d'azote (NOx) formant alors de l'ozone dans les couches inférieures de l'atmosphère.

Le bioéthanol étant produit à partir de la biomasse créée par photosynthèse, l'hypothèse admise est que le dioxyde de carbone créé pendant la combustion est équivalent à celui qui a été fixé par la plante, d'où le bilan nul sur l'étape combustion du véhicule dans le moteur pour le biocarburant.

Cependant le bilan GES global sur l'ensemble du cycle de vie du biocarburant n'est pas nul car les procédés de production, de transformation ou de transport sont aussi à prendre en compte. Il ne s'agit donc que d'une réduction des émissions de GES par rapport à l'essence.

L'éthanol étant un solvant hygroscopique, il pose aussi le problème de la corrosion de certaines pièces métalliques et la dégradation de certains caoutchoucs ou plastiques.

Son utilisation nécessite donc une adaptation des matériaux utilisés pour la construction du circuit d'alimentation en essence des véhicules utilisant l'éthanol pur ou le superéthanol. L'éthanol étant aussi miscible à l'eau, il peut se produire une séparation de phase dans les mélanges essence-éthanol.

D'autres avantages d'ordre plus économique et stratégique, sont la contribution à la diminution de la dépendance aux pays producteurs de pétrole ou encore la stimulation agricole en créant des débouchés diversifiés pour les produits agricoles.

Comme il est possible de le voir dans le tableau, un certain nombre d'inconvénients sont associés à l'utilisation du bioéthanol. Mais les industriels mettent en avant les contributions positives de ce carburant sur la qualité de l'air, la diversification de l'approvisionnement énergétique et le développement de l'économie rurale. Même s'il est vrai que l'éthanol est encore un carburant coûteux à produire, et les procédés sont encore améliorables. De plus, afin de diminuer les coûts de production du bioéthanol, la valorisation des différents coproduits est recherchée. Le bioéthanol pourrait donc apporter sa contribution à la diversification énergétique dans le secteur des transports tout en permettant la diminution des émissions de gaz à effet de serre (Didderen et al, 2008).

1.1.11. Produits de la fermentation alcoolique autres que l'éthanol

En plus de l'éthanol, de nombreux produits, mais en quantité moindre, sont aussi produits, il s'agit essentiellement des alcools supérieurs, d'acides gras, d'esters, d'aldéhyde et cétones (Guiraud J. , 1998). Nous mentionnerons plus particulièrement le glycérol et l'acide acétique en raison de leurs effets sur le métabolisme des souches utilisées.

1.1.11.1. Glycérol :

Le glycérol est un sous-produit de la fermentation du sucre en éthanol dans un procédé neutre en oxydo-réduction. Le rôle de la formation de glycérol consommant du NADH est de maintenir l'équilibre rédox cytosolique, en particulier dans des conditions anaérobies. Le glycérol produit joue un rôle majeur dans l'osmoadaptation au stress chez *S. cerevisiae*, il est particulièrement important dans l'adaptation au stress osmotique (Djelal et al, 2006).

1.1.11.2. Acide acétique :

Co-métabolite du métabolisme oxydo-réductif, il semble être plus toxique pour la levure que l'éthanol (Ferreira et al, 2004).

La production d'acide acétique pendant la fermentation alcoolique semble avoir un effet inhibiteur de la croissance cellulaire en provoquant une diminution de la production de biomasse (Giannattasio, 2005).

En milieu acide, les acides faibles non dissociés peuvent diffuser à travers la membrane plasmique, dans un environnement intracellulaire plus alcalin (cytoplasme) où la dissociation a lieu (Pampulha, 2000). Lors de cultures à pH 4, du fait du gradient de pH transmembranaire au niveau de la membrane plasmique, la concentration de la forme anionique de l'acide acétique intracellulaire est supérieure à la concentration extracellulaire. L'augmentation de la concentration intracellulaire de l'acide acétique dissocié peut perturber l'activité cellulaire en exerçant par exemple un effet découplant sur la respiration ou l'inhibition sur l'activité de certaines enzymes (Guillouet, 1995).

1.1.12. Microorganismes utilisés pour la production du bioéthanol

Une grande variété de micro-organismes produit de l'éthanol à partir de polysaccharides (tableau 4). Mais le micro-organisme idéal utilisé pour la production d'éthanol doit avoir un potentiel fermentaire rapide, une capacité de floculation améliorée, une osmotolérance appréciable, une tolérance accrue à l'éthanol et une bonne thermotolérance (Brooks, 2008).

Tableau 4 : Différentes espèces productrice d'éthanol.

Microorganismes	Rendement de l'éthanol	Références
Saccharomyces cerevisiae CFTR 01 and SG	39–48 g/l	(Ratnavathi, 2010)
Fermax yeast (Saccharomyces cerevisiae)	77.07–79.58 g/l	(Kundiyana, 2010)
Saccharomyces cerevisiae 424A (LNH-ST)	42.3 g/l	(Li B. Z., 2010)
Saccharomyces cerevisiae 522D	38 g/l	(Chniti S. D., 2014)
Zygosaccharomyces rouxii (IP 2021.92)	29 g/l	(Chniti S. D., 2014)
Candida Pelliculosa (IP 820.63)	34 g/l	(Chniti S. D., 2014)
<i>Zymomonas mobilis</i>	86 g/l	(Chen X. K., 2016)
Pichia veronae	48 g/l	(Hamouda H. I.-S.-G.-G., 2016)
Candida tropicalis	41 g/l	(Hamouda H. I.-S.-G.-G., 2016)
Bacillus amyloliquefaciens	32 g/l	(Djelal H. C., 2017)

De nombreux types de microorganismes tels que *Saccharomyces cerevisiae* (Sheoran, 1998), *Kluyveromyces marxianus* (Limtong, 2007), *Escherichia coli* et *Klebsiella oxytocastrain* (Silva, 2005), *Zymomonas mobilis* (Chen et al,2016), *Zygosaccharomyces rouxii* et *Candida pelliculosa* (Chniti ,2014) ont été étudiés pour la production d'éthanol. Les levures sont très répandues dans la nature et peuvent être récupérées à partir d'un large éventail de sources terrestres et marines. Les levures peuvent être plus ou moins omniprésentes où elles peuvent apparaître restreintes à des habitats très spécifiques (Chandrasena ,2006) . Parmi eux, plus de 95% de la production mondiale d'éthanol par fermentation utilise la levure *Saccharomyces cerevisiae* et ses espèces apparentées, sa tolérance à l'éthanol est l'une des principales raisons de sa sélection pour la fermentation alcoolique (Mobini-Dehkordi, 2007) (Patrascu ,2009).

Le choix des levures a un impact significatif sur la rentabilité de la production d'éthanol et la viabilité à long terme (Knauf et al, 2006). Les levures tolérantes à des températures élevées, des taux d'éthanol élevés et des concentrations en sucres semblent donc très attractives pour l'industrie des alcools combustibles (Ylitervo, 2011).

Divers micro-organismes de souches indigènes capables de produire de l'éthanol ont été isolés de différentes sources locales telles que les dattes (Djelal et al, 2017), différents fruits (Lee et al, 2011), le lactosérum (Boudjema et al, 2016), la canne à sucre et la mélasse de betterave (Hamouda et al, 2016). Cependant, les souches isolées du substrat naturel ont donné de bien meilleures performances que les souches commerciales (Djelal et al, 2017).

CHAPITRE II

Les levures

1.2.1. Caractéristiques structurelles

1.2.1.1. La paroi

Les levures sont des microorganismes unicellulaires qui ont une forme ovale ou sphérique et leur morphologie peut varier selon les conditions de leur environnement ou leur état physiologique.

La structure cellulaire des levures est de type eucaryote et possède une paroi épaisse et rigide, un noyau limité par une membrane nucléaire, un cytoplasme contenant divers organites et inclusions dont des mitochondries et une grande vacuole (Leveau, 1979) .

La paroi cellulaire de la levure et d'autres champignons détermine la forme et l'intégrité de l'organisme pendant la croissance et la division cellulaire .Trois groupes principaux de polysaccharides forment la paroi cellulaire: polymères de mannose (mannoprotéines, environ 40% de la masse sèche des cellules), des polymères de glucose (β -glucane, environ 60% de la masse sèche de la paroi cellulaire) et les polymères de N-acétylglucosamine (chitine, environ 2% de la masse sèche de la paroi cellulaire).

La paroi cellulaire est une structure dynamique qui peut s'adapter aux changements physiologiques et morphologiques (conjugaison, sporulation ou croissance pseudohyphale) (Martin-Yken, 2002).

Par ailleurs, un mécanisme de compensation de la paroi cellulaire est activé en réponse aux agents perturbant la paroi cellulaire ou aux mutations de la paroi cellulaire, ce qui permet le remodelage de la paroi cellulaire pour lutter contre la lyse cellulaire (Klis, 2002) .

1.2.1.2. Membrane plasmique

La membrane plasmique forme une bicouche lipidique d'environ 7,5 nm de large. Elle contient un mélange de lipides polaires et de protéines qui par leur interaction, assurent la structure de la membrane, ces protéines peuvent aussi assurer le transport des solutés, et la synthèse de composants extérieurs de la membrane (Cot, 2007) .

La composition lipidique pourrait avoir un rôle important dans la tolérance aux stress en général (Swan, 1999) (Chi, 1999) ont montré qu'une souche *S. cerevisiae* est plus tolérante à l'éthanol lorsque le ratio ergostérol/phospholipides est élevé.

1.2.2. Les exigences nutritionnelles

Les levures ont besoin pour leur développement de sources carbonées de composés azotés et d'éléments minéraux variés, les besoins en vitamines varient d'une espèce à une autre (Jones R. P., 1981)

1.2.2.1. Source de carbone

Les composés carbonés fournissent l'énergie nécessaire pour la biosynthèse de constituants cellulaires et l'énergie nécessaire à son fonctionnement.

Les monosaccharides sont les glucides les plus utilisés par rapport aux disaccharides ainsi que les trisaccharides, par ailleurs, il existe d'autres sources de carbone dites non conventionnelles telles que les alcools, les acides organiques (Oteng-Gyang, 1984).

(Waldron, 2010), a réalisé des travaux avec des glucides peu coûteux tel que les pentoses et les polysaccharides.

Les sources de carbones pouvant être utilisées par les levures sont résumées dans le (Tableau 5) (Walker G. M., 2017).

Tableau 5 : Les sources de carbones pouvant être utilisés par les levures.

Sources de carbones	exemples
Hexoses	D- glucose, D- galactose, D-fructose
Disaccharides	Maltose ,saccharose, lactose, melbiose
Trisaccharides	Raffinose, maltotriose
Polysaccharides	Inuline,cellulose, chitine
Oligosaccharides	maltotetraose
Pentoses	L-arabinose, D-xylose
Alcool	Methanol, ethanol, glycerol
Acide organiques	Acetate, citrate, lactate
Acides gras	Oléate,palmitate
Hydrocarbones	alcanes
Composés aromatiques	Phenol,cresol,quinol

1.2.2.2.Source d'azote

La plupart des levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ions ammonium et d'urée, par ailleurs les levures peuvent utiliser d'autres sources tels que les acides aminés et les peptides (Russell, 2003). L'azote entre dans la composition de plusieurs molécules nécessaires au fonctionnement de la cellule comme les coenzymes, les acides aminés et les nucléotides (Ljungdahl, 2012).

1.2.2.3.Source de phosphore

Saccharomyces cerevisiae utilise l'orthophosphate, préférentiellement sous forme d'ion monovalent, comme unique source de phosphore (Winter, 1989). Il sert à la synthèse des lipides, des hydrates de carbone et participe au maintien de l'intégrité membranaire (Jones R. P., 1981), ainsi qu'à la synthèse des lipides et des hydrates de carbone (Winter, 1989).

1.2.2.4.Sources d'Oligo –éléments

Les oligo- éléments sont nécessaires à la croissance et la multiplication des levures. Les rôles des principaux oligo-éléments sont rassemblés dans le tableau ci-dessous (tableau 6).

1.2.2.5.Les vitamines

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est auxotrophe aux acides nicotinique et pantothénique, à la biotine, à la pyridoxine, au myo-inositol et les acides pantothénique et nicotinique conditionnent les futures capacités de croissance et de production de la levure (Winter, 1989). Ces vitamines jouent un rôle majeur dans la tolérance à l'éthanol et leur mode d'apport conditionne également le paramètre « tolérance » (Alfenore, 2002).

Tableau 6 : Récapitulatif des principaux oligo-éléments utilisés par les levures (Jones R. P., 1981).

Classe	Ions	Rôles
Macro-éléments	K ⁺	Participe à la régulation du pH intracellulaire.
		L'excrétion de K ⁺ sert à contrebalancer l'entrée d'ions du type Zn ²⁺ et Co ²⁺ .
	Mg ²⁺	
	Ca ²⁺	Ca ²⁺ est incorporé dans les protéines membranaires et participe à la protection de la levure contre les agressions environnementales.
	Zn ²⁺	
	Mn ²⁺	Stimule la synthèse des protéines.
	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	Participent aux sites de certaines protéines.
	Na ⁺	Diffuse passivement à travers la cellule.
		Stimule le transport des sucres.
Cl ⁻	Joue le rôle de régulateur avec les ions positifs.	
Mico-éléments	Mo	Stimulent la croissance pour de faibles concentrations.
	Co	
	B	

1.2.3. Métabolisme chez les levures

Les sucres sont des sources de carbone préférentielles pour les levures, beaucoup d'informations sont disponibles maintenant sur les voies d'utilisation du sucre dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

La glycolyse est la voie générale de la conversion du glucose en pyruvate et de l'énergie, tandis qu'un mode alternatif d'oxydation du glucose est la voie de l'hexose phosphate également connue sous le nom de cycle de pentose phosphate.

En fonction de la façon dont les levures dégradent la source carbonée, on distingue trois comportements métaboliques : oxydatif, fermentaire et respiro-fermentaire (Botton, 1991).(figure 6).

1.2.3.1.Métabolisme oxydatif

Ce métabolisme aboutit à l'oxydation complète du substrat carboné en présence d'oxygène, à travers les voies métaboliques de la glycolyse, du cycle de Krebs (figure 7) et de la phosphorylation oxydative.

Durant ce métabolisme, la concentration du substrat doit être limitée (150 mg.L⁻¹ environ) afin d'éviter un changement métabolique vers la production d'éthanol et d'autres co-métabolites (effet Crabtree).

Le bilan énergétique théorique maximal de cette voie métabolique est décrit par l'équation suivante :



L'efficacité de la chaîne respiratoire est représentée par le rapport P /O qui est le nombre de moles d'ATP formées par atome d'oxygène consommé, il est également variable selon le microorganisme, la valeur du rapport P /O est fréquemment sujette à discussion.

Pour *Saccharomyces cerevisiae*, une valeur inférieure à 2 est souvent rapportée pour ce rapport (Bruinenberg, 1985) .

(Nielsen, 2003) a rapporté dans une étude que la valeur moyenne du rapport P/O peut varier entre 1,2 et 1,3 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur différents substrats en culture aérobie.

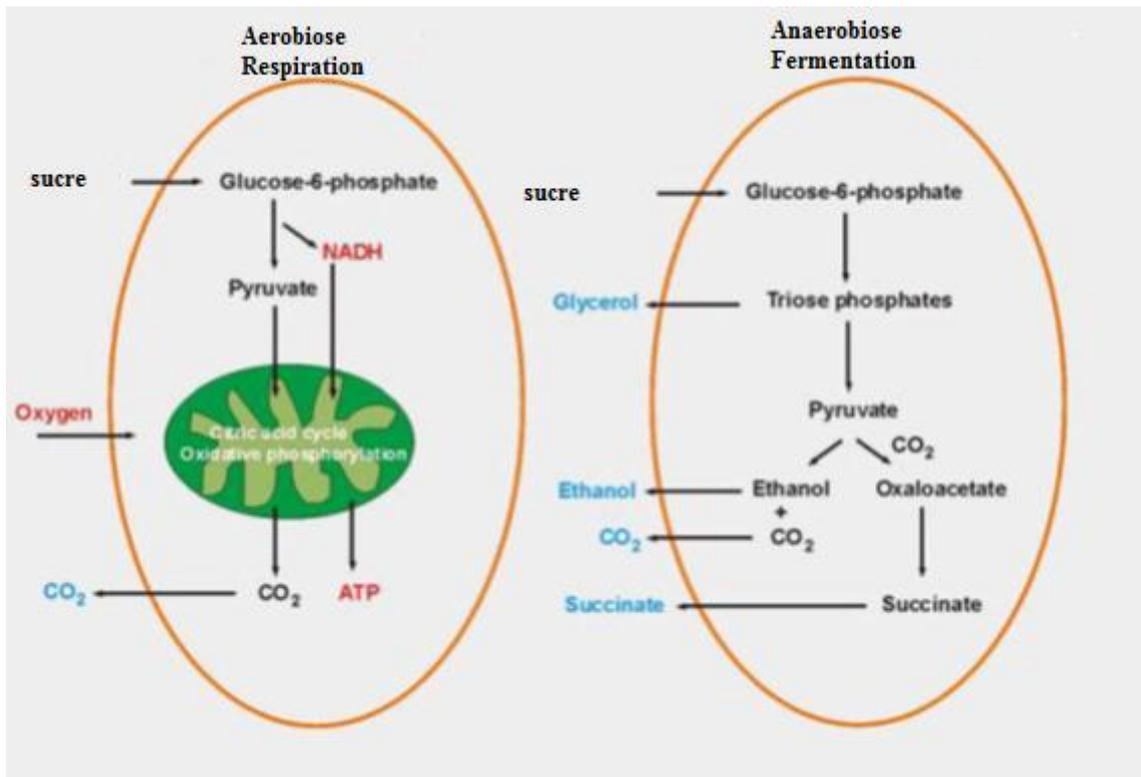


Figure 6 : Métabolisme des levures, oxydatif et fermentaire (Oura, 1997).

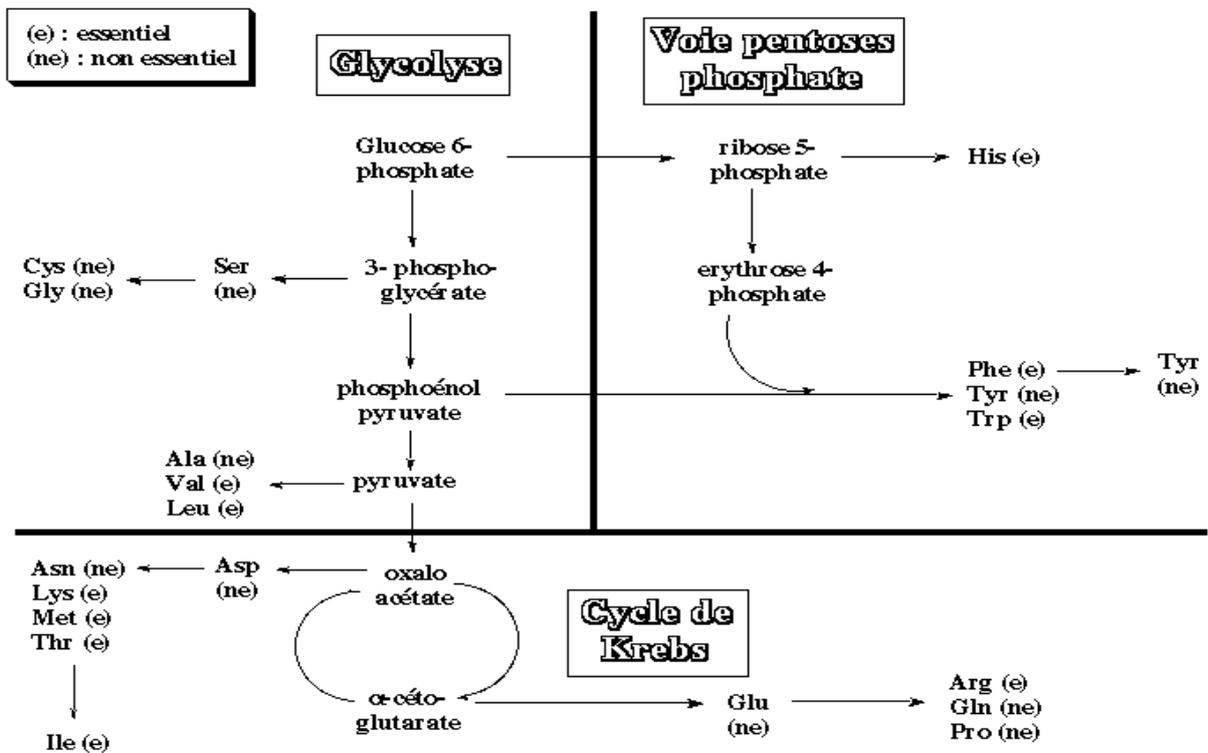
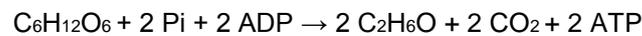


Figure 7: La glycolyse et le cycle de Krebs. (Prescott L. M.-C., 2003)

1.2.3.2.Métabolisme fermentaire

Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (Guiraud J. P., 2004). Le pyruvate résultant de la glycolyse est décarboxylé en acétaldéhyde (éthanal) qui est réduit en éthanol.

En anaérobiose, les levures sont capables de fermenter le glucose en éthanol, en dioxyde de carbone, avec coproduction de glycérol et de certains acides et esters. Le bilan énergétique de transformation du glucose est donné comme suit :



Le rendement théorique limite ($Y_{P/S}$) de conversion de glucose en éthanol est de 0,511 gramme d'éthanol par gramme de glucose. Les rendements obtenus expérimentalement sont en général moins élevés de l'ordre de $0,4 \text{ g.g}^{-1}$ (Bideaux et al, 2006) (Jeihanipour, 2009) cela est dû au fait qu'une partie du glucose est transformée en biomasse et en co-produit.

1.2.3.3.Métabolisme respiro-fermentaire

Lorsque la levure se trouve dans un milieu en aérobiose elle peut produire de l'éthanol simultanément avec une activité respiratoire, cela peut avoir plusieurs explications : (Lei, 2001) Ce type de métabolisme peut-être obtenu en excès de glucose en condition de limitation en oxygène chez les levures sensibles au glucose, ces dernières sont appelées crabtree positive telle que *Saccharomyces cerevisia*, *Schizomyces pombe*. Les événements régulateurs que pourraient expliquer l'effet Crabtree restent encore inconnus.

Cependant, en présence d'oxygène et d'une concentration faible du glucose, une augmentation du développement des levures et une diminution de la production d'alcool par la fermentation alcoolique sont provoquées, la « respiration » inhibe la fermentation alcoolique, c'est l'effet pasteur.

1.2.4. Métabolisme des sucres

1.2.4.1. Métabolisme des monosaccharides

Ces sucres sont utilisés par toute la levure et leur catabolisme laisse distinguer : les levures à métabolisme uniquement respiratoire où le pyruvate formé à partir de ces sucres est oxydé par le cycle de krebs et les levures à métabolisme aéro-anaérobie où l'utilisation des sucres se fait par la voie de la glycolyse qui a eu lieu dans le cytosol.

En anaérobiose, ces sucres sont métabolisés en éthanol et en dioxyde de carbone. La concentration des sucres n'a pas d'effet sur ce métabolisme. En revanche, en aérobiose, la concentration de ces sucres est importante et peut inhiber chez certaines levures la respiration. Le métabolisme est alors orienté vers la voie fermentaire même en présence d'oxygène. C'est ainsi que la respiration et la fermentation contribuent à la dégradation de ces sucres.

1.2.4.2. Métabolisme des disaccharides

Les disaccharides sont utilisés selon deux manières :

- La première, où après avoir traversé la membrane plasmique le sucre est hydrolysé dans le cytoplasme, c'est le cas pour le maltose.
- La deuxième où les sucres sont hydrolysés dans l'espace périplasmique par l'invertase pour le saccharose.

Ainsi les monosaccharides obtenus après hydrolyse sont utilisés par la levure comme décrit précédemment.

1.2.4.3. Métabolisme de polysaccharide

Les polysaccharides nécessitent pour leur hydrolyse des enzymes extracellulaires que la plupart des souches de levure, en particulier *S.cerevisiae*, ne possèdent pas. Cependant d'autres enzymes hétérologues telles que amylases sont exprimés chez *S.cerevisiae* afin qu'elle puisse fermenter un nombre de carbohydrates plus large. C'est le cas de l'amidon qui est une ressource biologique renouvelable importante.

1.2.5. Stress chez les levures

1.2.5.1. Facteurs influençant le métabolisme de la levure

Le changement des conditions environnementales, ainsi que la composition du milieu de culture de la levure peut provoquer un stress pour des levures, et à différents niveaux (macroscopique, microscopique, moléculaire) (Sainz, 2003).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, un certain nombre de paramètres, peut influencer le métabolisme et les capacités dynamiques de cette levure. On pourra citer la composition du milieu de culture (Wang F. Q., 2007), la pression osmotique (Yokozeki, 2006) (Djelal et al, 2005), l'accumulation d'éthanol (Hirasawa, 2007), la température (Aldiguier, 2004) .

Ces conditions de stress, impactent le comportement des levures en affectant leurs capacités de croissance et leurs productions, causant ainsi un dysfonctionnement pouvant aller jusqu'à la mort des cellules (Estruch, 2000) (Hohmann, 2002).

Il est important que les cellules disposent de moyens pour faire face à ces stress afin de résister à ces dommages.

Lors de stress, une augmentation de la concentration intracellulaire de glycérol est souvent mentionnée (Aldiguier, 2004); (Bideaux et al, 2006) , ainsi qu'une diminution de l'activité métabolique entraînant une moindre utilisation du glucose ; par conséquent une baisse de la vitesse de croissance et de la production est souvent observée (Martini, 2004) .

a) Effet de la concentration en substrat

En général, l'inhibition par le substrat se manifeste de façon importante pour des concentrations qui varient entre 150 et 250 g.L⁻¹ de glucose et à 400 g.L⁻¹ la croissance est totalement stoppée (Wang, 1979).

Un effet secondaire important de la teneur en sucre plus élevée est la répression catabolique des voies oxydatives. À très faible concentration de substrat, la productivité de levure diminue (Levenspiel, 1980).

Des teneurs élevées en sucres sont associées à une formation accrue d'acide acétique par *S. cerevisiae* (Michnick, 1997) (Pigeau, 2005) (Pigeau, 2007).

En présence d'oxygène et de glucose à forte concentration, la fermentation et la respiration coexistent avec une proportion plus élevée pour la fermentation. Le métabolisme respi-fermentaire se caractérise par une diminution du rendement de la biomasse, la production de métabolites secondaires tels que l'éthanol, le glycérol et l'acétate et une vitesse spécifique de

consommation d'oxygène réduite. En métabolisme respiro-fermentaire, environ 3% des atomes de carbone sont consommés par respiration (Gancedo, 1998) (Rodrigues, 2006).

b) Effets de la température et du pH

Comme tout organisme vivant, la levure ne peut fonctionner que dans une gamme de température « optimale » et jusqu'à une température critique au-delà de laquelle elle ne peut survivre.

Une étude réalisée par (Aldiguié, 2004) montre l'évolution des rendements chez *Saccharomyces cerevisiae* en fonction de la température lors de culture fed-batch aérée. D'après cette étude, les rendements substrat/biomasse ($Y_{X/S}$) et substrat/éthanol ($Y_{P/S}$) ne subissent pas de la même façon l'augmentation de la température.

Le rendement $Y_{X/S}$ décroît au fur et à mesure que la température augmente à partir de 27°C, la température minimale testée alors que le rendement $Y_{P/S}$ augmente jusque 33°C puis diminue jusqu'à la température maximale testée (39°C) (Aldiguié, 2004) .

Pour des températures supérieures à 30°C, des diminutions de la capacité de croissance et de la quantité finale de biomasse sont observées, l'effet néfaste des stress s'accroît (chocs osmotiques, inhibition par l'éthanol en entraînant une diminution de la viabilité (Beney, 2001) et de l'activité cellulaire (Marechal, 1999).

c) Effet de l'oxygène et de dioxyde de carbone

La concentration en oxygène dissous dans le milieu de culture est un paramètre important qui va orienter (en fonction de la souche utilisée, du mode de conduite, ...) le métabolisme du microorganisme considéré. Djelal et al,(2006) ont démontré que la tolérance à l'éthanol peut augmenter notablement lorsqu'on maintient un apport de faibles quantités d'oxygène dans le système. A noter que l'oxygène dissous est consommé très rapidement ; sa concentration devient quasi nulle après seulement 30 heures de croissance, s'il n'est pas apporté en continu (Russell, 2003).

La solubilité du dioxyde de carbone (par conséquent sa concentration dans le milieu) peut être influencée par plusieurs facteurs tels que le pH ou la température.

La présence du CO₂ dans le milieu a un effet négatif sur le métabolisme microbien, en inhibant la croissance et la production (Aguilera, 2005). Le CO₂ peut être à la fois activateur et inhibiteur du métabolisme levurien (Hirasawa, 2007) .

Par ailleurs, une augmentation trop importante de la pression partielle en gaz carbonique semble entraîner une chute de la viabilité cellulaire (Chaabane, 2006).

d) Effet de la concentration de l'éthanol

Lors de sa croissance, en fermentation alcoolique en particulier, la levure produit de l'éthanol qui représente la principale cause de stress pendant la culture en batch car il s'accumule dans le milieu (Martini, 2004). La levure selon son espèce peut résister à des taux d'alcool de 5 à 23 % (V/V) (Fugelsang, 2006).

Une fois la concentration de l'éthanol augmente dans le milieu de culture, on assiste à une diminution de la vitesse de croissance, de la viabilité cellulaire, de l'activité métabolique et de la capacité de production de la levure, de nombreux travaux ont confirmé ces phénomènes, en particulier chez *Saccharomyces cerevisiae* (Wang, 2007) (Hirasawa, 2007) (Kitagaki, 2007).

Au fur et à mesure que l'éthanol est excrété dans le milieu, par son accumulation, il ralentit le développement des levures et peut causer des dommages irréversibles (Wang, 2007).

e) Effet de l'acide acétique

La production d'acide acétique pendant la fermentation alcoolique semble avoir un effet inhibiteur de la croissance cellulaire en provoquant une diminution de la production de biomasse (Giannattasio, 2005). Lors de cultures à pH 4, du fait du gradient de pH transmembranaire au niveau de la membrane plasmique, la concentration de la forme anionique de l'acide acétique intracellulaire est supérieure à la concentration extracellulaire. L'augmentation de la concentration intracellulaire de l'acide acétique dissocié peut perturber l'activité cellulaire en exerçant par exemple un effet découplant sur la respiration ou l'inhibition sur l'activité de certaines enzymes.

L'ajout de l'acide acétique dans le milieu de culture peut provoquer la mort programmée chez les levures (Knorre, 2005); (Gourlay, 2006); (Zadrag, 2006). Un effet synergique de l'acide acétique et de l'éthanol induisant le décès cellulaire a été proposé dans les travaux de (Chaabane, 2006) en bioréacteur bi-étagé à recyclage cellulaire, en mentionnant une diminution de la viabilité cellulaire lorsque la concentration en acétate est supérieure à 2 g.L^{-1} alors que la concentration en éthanol ne dépasse pas 60 g.L^{-1} .

f) Effet de la pression osmotique

Les micro-organismes tels que la levure, *Saccharomyces cerevisiae*, développent des systèmes pour contrecarrer l'effet du stress osmotique tel que le stress salin (NaCl) (Andreishcheva, 1999). Le stress induit par le sel entraîne deux phénomènes différents : la toxicité ionique et le stress osmotique (Mager, 2002) . Chez certaines levures, l'adaptation à une salinité plus élevée s'accompagne d'une augmentation de la viscosité des membranes due à une augmentation du taux d'acides gras insaturés ou à une augmentation de la longueur des résidus d'acides gras (Gostinčar, 2008).

Certaines levures sont osmotolérantes, telles que *Candida pelliculosa* (Djelal et al, 2012) , *Zygosaccharomyces rouxii* (Dakal, 2014) , *Debaryomyces hansenii* et *Pichia farinosa* (Bubnová, 2014) , *Kluyveromyces marxianus* (Sayed, 2018). Ces levures peuvent supporter des pressions osmotiques élevées, des pressions sous lesquelles aucun autre microorganisme ne peut se développer. Les mécanismes de résistance se manifestent par l'accumulation de polyols afin de minimiser la différence de pression osmotique entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire.

PARTIE 2
Matériel et Méthodes

2.1. Isolement et identification des levures productrices d'éthanol :

2.1.1. Matériel biologique

Le présent travail porte sur l'isolement de souches levuriennes à partir de plusieurs échantillons biologiques récoltés en Algérie : datte à faible valeur marchande (Mech degla), figue sèche (du marché), mélasse de canne à sucre (de chez CEVITAL), et la sélection des isolats les plus performants pour la production d'éthanol sur diverses sources de carbone. Par ailleurs une souche de référence a été utilisée en parallèle *Saccharomyces cerevisiae* CLIB 95, obtenue auprès du CIRM (Centre National de Ressources Microbiennes, France), pour le test comparatif.

2.1.2. Isolement des levures

L'isolement a été réalisé selon la méthode (Guiraud, 1998), les échantillons de datte et figue ont été broyés et homogénéisés dans de la verrerie stérile, un gramme de ces échantillons (datte, figue, mélasse de canne à sucre) est suspendu dans 9 ml d'eau physiologique stérile et homogénéisé pendant 10min. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1mL de la solution précédente à 9 mL d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-4} .

Chaque dilution est étalée à la surface des milieux gélosés (YMA) (annexe 1) avec l'addition de Gentamicine (0.04g/L) afin d'inhiber la croissance de bactéries Gram+ et Gram-. L'ensemencement est fait en surface, par étalement de 0.1 ml de culture en strie transversale (Tsuyoshi, 2005) . Les boites de Pétri sont incubées à 30°C, pendant 24 à 72 h (Tortora, 2003) , puis observées au microscope (Objectif 40), pour vérifier la morphologie et l'homogénéité des cellules.

2.1.3. Purification des levures

Après isolement, les isolats de levures ont été purifiés par ensemencements répétés jusqu'à l'obtention d'une culture pure. La colonie parfaitement isolée, peut être ensuite, prélevée et transférée dans de nouvelles boites de Pétri.

L'incubation de toutes les boites est effectuée à 30°C jusqu'à l'obtention de colonies apparentes (MADIGAN, 2005) .

2.1.4. Conservation des levures

Les cultures sont incubées pendant 3 à 5 jours, pour permettre une croissance maximale, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (Arora, 2017) des repiquages réguliers sont effectués tous les 1 à 2 mois, pour une conservation plus longue les isolats sont conservés dans du glycérol / YMA (20/80%) (V / v) à – 20°C (Rezki et al ,2015) .

2.1.5. Sélection des souches

2.1.5.1. Capacité de production d'éthanol

Les souches isolées ont été testées pour leur capacité à produire de l'éthanol sur un substrat de glucose (30 g.L⁻¹), les souches ont été inoculées à 1% v / v dans des bouteilles hermétiques de 250 ml contenant 100 ml du milieu de fermentation, la peptone (5g.L⁻¹) a été utilisée comme source d'azote. L'incubation était à 30 ° C pendant 48h.

2.1.6. Identification des isolats levuriens sélectionnés

2.1.6.1. Méthode conventionnelle

L'identification des levures isolées, selon les méthodes conventionnelles, repose sur la détermination de divers caractères cultureux, morphologiques et physiologiques (Kurtzman, 2011).

2.1.6.1.1. Les caractéristiques culturelles

Leur étude est faite en milieu liquide (milieux YM) et sur milieu solide incliné. Les cultures sont incubées pendant 3 jours à 30°C, puis examinées quotidiennement pendant plusieurs semaines. Les caractéristiques des cultures sont notées (l'aspect des cultures, la couleur, la forme des colonies) (Delarras, 2007) (Prescott L. H., 2010).

2.1.6.1.2. Caractères biochimiques et physiologiques

a) Fermentation des sucres

La fermentation de quelques sucres est testé : glucose,galactose,fructose,saccharose,lactose, xylose et arabinose . Les sucres sont dissous à 2 % (masse /volume) dans un milieu Wikerham (annexe 2), conditionné avec une Cloche de Durham. Les tubes sontensemencés avec quelques

gouttes d'une suspension de levure, les cultures sont incubées à 30°C, pendant 48 h à 3 semaines.

Le test est positif, s'il y a dégagement de CO₂ dans la clochette, révélé par des bulles de gaz et négatif s'il n'y a pas dégagement de gaz (Wickerham, 1951) . Ce test a été dupliqué.

b) Test d'assimilation

(Galerie API 20 C AUX)

La galerie API 20 C AUX (annexe 3), est constituée de 20 cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent d'effectuer 19 tests d'assimilation. Un volume de 100 µL de la suspension levurienne (10⁷cellules/ ml) est inoculé dans chaque cupule. La lecture de ces réactions se fait après 24- 72h, par comparaison à la cupule 0 (témoin négatif). Une cupule plus trouble que le témoin indique une réaction positive (assimilation des substrats par la levure). L'identification est obtenue à l'aide du logiciel d'identification. API 20C test kit (Biomérieux, Marcy l'Etoile, FRANCE) .

2.1.6.2. Identification moléculaire

Les souches isolées ont été identifiées par LABOCEA - Fougères, FRANCE avec la méthode MALDI TOF (VITEK MS) (Blättel, 2013) (Moothoo-Padayachie, 2013). Afin d'affiner les résultats précédemment obtenus, les souches ont également été identifiées par extraction de l'ADN et la PCR mini / micro satellite amorcée. Cette identification a été effectuée à EQUASA (Technopole Brest-IROISE, Plouzane, France) cette méthode est décrite par (Redou et al, 2016).

2.1.7. Effet de quelques stress sur la croissance des levures isolées

2.1.7.1.Effet du stress salin

Le stress salin est provoqué par ajout de l'agent salin NaCl (0.5M, 1M, 1.5M) dans le milieu YMA, les cultures sont incubées à 30°C pendant 72h, la densité optique est mesurée chaque 24 h à 620 nm afin de suivre la croissance des levures (Abdel A, 2010).

2.1.7.2. Effet de la température

Les souches sont incubées dans un milieu YMA à différentes températures 25,30 et 37°C, pendant 48 h afin de suivre l'effet de la température.

2.1.7.3. Test de tolérance à l'éthanol

Les souches isolées ont été inoculées dans 10 ml YM, pour tester la tolérance à l'éthanol. Différentes concentrations d'éthanol ont été utilisées (5, 7, 9, 10, 12, 14, 16 et 20%). Les tubes ont été incubés à 30 ° C pendant 48 h. Après incubation, la viabilité des cellules de levure a été vérifiée par dilution en série avec de l'eau distillée stérile et ensemencée sur un milieu gélose.

2.2. Production du bioéthanol

2.2.1. Préparation des précultures

Les travaux sont réalisés avec des souches de levures, 3 souches nommées S1 S2 et S3 isolées respectivement de mélasse de canne à sucre, figue et datte.

Les pré-cultures des trois souches levuriennes sont obtenues par inoculation des fioles de 250 mL, contenant 100 mL du milieu YMA. Ces préparations sont incubées à 30° C sous agitation de 150 rpm pendant 24h, les pré-cultures obtenues sont utilisées comme inoculum pour la production de l'éthanol. Après l'obtention d'une culture dont l'absorbance à 620 nm correspond à 1 unité d'absorbance, la suspension est utilisée pour ensemercer les cultures.

2.2.2. Milieux utilisés pour la fermentation

2.2.2.1. Milieu synthétique à base glucose

Le milieu synthétique utilisé est constitué d'une concentration de 30 g/ L en glucose et 5 g /l de peptone. Les flacons stérilisés à une température de 120°C durant 20 minutes sous pression de 1 bar, ont étéensemencés avec les 3 levures isolées S1, S2 et S3 et incubés à 30°C, durant 72 h sous une agitation de 180 rpm.

Ce milieu est utilisé pour démontrer la capacité de nos 3 souches à produire de l'éthanol.

2.2.2.2. Milieux synthétique enrichi en NaCl

Le milieu synthétique utilisé est constitué d'un seul sucre (glucose, 15 g.L⁻¹) et de sels (NaCl 1,37 M) à des niveaux proches de ceux des algues vertes. Ce milieu est enrichi en minéraux, dont la composition et les quantités sont les suivantes : KH₂PO₄ 5200 (mg/l) ; MgSO₄, 7H₂O 1200 (mg/l) ; CaCl₂, 6H₂O 150 (mg/l) ; FeSO₄, 7H₂O 100 (mg/l); ZnSO₄, 7H₂O 30 (mg/l); CuSO₄, 5H₂O 0,79(mg/l); H₃BO₃ 15(mg/l); KI 2(mg/l); Na₂MoO₄, 2H₂O 5(mg/l); MnSO₄, H₂O 32(mg/l); CoCl₂, 6H₂O 5,2(mg/l); EDTA 100(mg/l) , et en peptone (5 g/l). Le pH est ajusté à 6. Ce milieu synthétique est utilisé pour démontrer l'influence des sels sur les activités des souches, et parce que les algues vertes, ou plus exactement les hydrolysats d'algues vertes sont prospectés en tant que matière première pour le bioéthanol.

2.2.2.3. La mélasse de canne à sucre

La mélasse de canne à sucre a été utilisée comme substrat, elle provient de l'industrie sucrière Algérienne (CEVITAL) et stockée à 4°C jusqu'à utilisation.

2.2.3. Les Fermentations

Les fermentations alcooliques présentées dans notre étude sont réalisées en mode batch et en aéro-anaérobiose durant 72h. Les essais de fermentations sont dupliqués dans des Erlens de 500 ml fermés par du coton cardé, contenant 250 ml de milieu. Les différents milieux sont inoculés avec 10 % de suspension de levure et incubés par la suite dans un Shaker à 30°C, sous une agitation de 180 rpm.

2.2.4. Co-culture S2 et S3

Pour vérifier si la co-culture améliore la production d'éthanol, un test a été effectué avec un milieu contenant : glucose 15 gL⁻¹ et NaCl 1,37 M. Les souches S2 et S3 ont été choisies pour leur tolérance aux sels et à l'éthanol.

2.2.5. Influences de quelques paramètres sur la production du bioéthanol

2.2.5.1. Analyse statistique

La méthodologie de surface de réponse a été utilisée pour étudier l'influence de différentes variables du processus de fermentation sur le rendement en bioéthanol.

La conception composite centrale CCD a été appliquée à des variables indépendantes. Deux variables indépendantes ont été choisies : le degré Brix (X₁), le volume de l'inoculum (X₂). Selon ce CCD, 11 expériences ont été réalisées (tableau 7).

La réponse dans cette étude est représentée par la concentration de bioéthanol produit en g/l.

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de Statistica © (module «Design of Experiment»).

Tableau 7 : Les niveaux des variables indépendantes utilisés dans la CCD.

Variables indépendantes	Les niveaux				
	Point étoile du niveau inférieur $\alpha = -1.141$	Point factoriel du niveau inférieur (-1)	Point central (0)	Point factoriel du niveau supérieur (+1)	Point étoile du niveau inférieur $\alpha = +1.141$
Brix (°) X1	12.93	15	20	25	27.07
Volume de l'inoculum (%) X2	2.93	5	10	15	17.07

2.3. Techniques analytiques

2.3.1. Caractérisation de la mélasse

2.3.1.1. Analyses physicochimiques

a) Mesure du pH (AFNOR ,1986)

La mesure du pH est basée sur la différence du potentiel existant entre deux électrodes plongées dans la solution à analyser. Le pH-mètre utilisé est de marque OHAUS modèle STARTER 3100C.

b) Mesure du contenu en solides solubles (SS) ou degré Brix (°B)

La teneur en solides solubles est déterminée à l'aide d'un réfractomètre manuel (Scihemtech) muni d'une échelle indiquant le pourcentage de SS.

c) Détermination de la teneur en cendres (AFNOR,1986)

Le dosage des cendres est basé sur la destruction de toute la matière organique sous l'effet de la température élevée ($500\pm 25^{\circ}\text{C}$). Des capsules d'incinération vides sont pesées. 5 g de matière fraîche ou 1 g de matière sèche sont ajoutés et la masse de l'ensemble est notée. Les échantillons sont alors soumis à une température de 550°C dans un four à moufle de type Wise Therm, pendant 6 heures. Après refroidissement dans un dessiccateur, les capsules contenant les cendres sont pesées à nouveau. Le dosage est réalisé en triplicata pour chaque échantillon. La teneur en cendres des échantillons est calculée selon la formule suivante :

Avec :

$$C\% = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0}$$

C (%) : teneur en cendres.

M0 : masse en g de la capsule vide.

M1 : masse en g de la capsule et les échantillons (avant incinération).

M2 : masse en g de la capsule avec les cendres (après incinération)

d) Dosage de la matière grasse

La méthode normée du Soxhlet (NF EN ISO 659) a servi de référence pour l'extraction et la détermination de la teneur en matière grasse. Cette méthode consiste en une extraction de l'huile par un solvant organique (hexane) sur une matrice solide (broyat du matériel végétal).

L'extraction est réalisée en enceinte fermée selon un processus semi continu à partir de 20g de broyat. Cette technique permet de renouveler le solvant sans intervenir sur le dispositif. Cette méthode est longue (24h) et plusieurs extractions sont nécessaires pour extraire la totalité de l'huile.

$$MG\% = \frac{M2 - M1}{Pe} * 100$$

M1 : Masse de ballon vide.

M2 : Masse de ballon après extraction et évaporation de l'hexane.

e) Dosage des éléments minéraux

Le dosage des sels minéraux potassium et calcium est réalisé par spectrophotométrie d'absorption atomique De type PU9200 X Philips. Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de concentration connue pour chaque élément. La solution à analyser est diluée à différentes concentrations avec de l'eau distillée en présence de lanthane 0,2%.

Les échantillons et les gammes étalons sont introduits dans le spectrophotomètre d'absorption atomique. Les raies d'absorption pour le Ca et K sont respectivement 422,7 nm ; et 766,5 nm. Les densités optiques sont mesurées, et une courbe étalon de la densité optique en fonction de la concentration est établie pour chaque élément. La concentration en éléments des échantillons est alors déduite en comparant leurs densités optiques à la courbe d'étalonnage convenable.

Le dosage du phosphore est effectué selon la méthode décrite par Colombie (2005) en utilisant le molybdate d'ammonium. la lecture se fait par spectrophotométrie à 720 nm.

Tandis que chlorure sont dosés par méthode de titrimétrie de Charpentier Volhard décrite par AFNOR (1980).

f) Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO)

La mesure de la DCO se fait à l'aide des kits spécifique, 2 ml de l'échantillon à analyser sont introduits dans le tube contenant le kit spécifique du dosage de la DCO, ce tube est ensuite chauffé à 150°C pendant 2 heures puis laissé à refroidir pendant 20 minutes. La gamme de mesure est de 0 à 1500 mg/l. La densité optique de l'échantillon est obtenue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 610 nm (Rejsek, 2002).

g) Dosage de l'azote par la méthode Kjeldahl

La teneur en azote totale est déterminée par la méthode de Kjeldhal. Elle consiste à détruire toute trace de matières organiques par l'acide sulfurique concentré à l'ébullition en présence d'un catalyseur avec formation de sulfate d'ammonium puis de l'ammoniaque. Ce dernier déplacé par une base fixe (la lessive de soude), est entraîné par la vapeur d'eau dans une solution d'acide fort. (Hamon et al., 1990) .

h) Dosage des sucres totaux et réducteurs

Les différents sucres sont analysés par HPLC, le Chromatographe utilisé est une chaîne WATERS ® (BIO-RAD, Hercules, CA, USA), équipé d'une pompe (Milford, MA, USA). La séparation des différents composés est effectuée au sein d'une colonne d'exclusion d'ions HPX-87 H (300 x 7,8 mm, BIORAD).

Cette colonne est maintenue à 45°C dans un four (Cro-Cir TM, Cluzeau Info-Labo, ste Foy La Grande, France), en sortie de la colonne, un réfractomètre différentiel ERC 7512 permet le suivi des différents composés.

La phase mobile utilisée est une phase polaire d'un mélange d'acide sulfurique (H₂SO₄) dans de l'eau ultrapure (Merck MILLIPORE). La concentration en acide sulfurique est de 0,01 N. L'éluant est préalablement dégazé sous vide. Le débit de la phase mobile est fixé à 0,7 mL.min.

2.3.2. Les prélèvements

Le suivi des fermentations est réalisé, en effectuant des points de prélèvements de 5 ml à des intervalles de temps durant la fermentation. Les prélèvements sont ainsi effectués dans des tubes et conservés à -20°C en attente du dosage. La mesure du pH, le dosage des sucres ainsi que le suivi de la croissance sont effectués pour chaque prélèvement.

2.3.2.1. Suivi de la croissance

Le suivi de la croissance se fait par lecture de l'absorbance des suspensions de levures, juste après le prélèvement, à l'aide d'un spectrophotomètre (PERKEN Elmer Lambda 25) à 620 nm.

2.3.3. Evaluation de la fermentation

a) Rendement en éthanol et en glycérol

Y_{EtOH} s'exprime en « quantité d'éthanol produite (EtOH) par quantité de substrat (S) consommé

$$Y_{EtOH} = \frac{\Delta EtOH}{\Delta Substrat consommé} \text{ (g. g}^{-1}\text{)}$$

Y_{Gly} s'exprime en « quantité de Glycérol produite (Gly) par quantité de substrat (S) consommé

$$Y_{gly} = \frac{\Delta glycerol}{\Delta Substrat consommé} \text{ (g. g}^{-1}\text{)}$$

b) Productivités volumiques horaire globale (ou productivité d'éthanol) r_p (g /l/h)

Elle est définie comme étant la quantité d'éthanol formé sur la durée de la fermentation alcoolique. Elle est exprimée en g /L /h :

$$r_p = \frac{E - E_0}{T - T_0} \text{ g/l/h}$$

c) L'efficacité fermentaire

L'efficacité fermentaire est calculée selon l'équation

$$\text{Efficacité \%} = \frac{\text{rendement effectif}}{\text{rendement théorique}} \times 100$$

d) Vitesse moyenne de consommation du sucres r_s (g /L /h)

Elle est définie comme étant la quantité totale de sucre consommée divisée par la durée de la fermentation alcoolique. Elle est exprimée en g /L /h

$$r_s (\text{g/L/h}) = r_p = \frac{S-S_0}{t-t_0}$$

2.3.4. La distillation

A la fin de la fermentation, les moûts de fermentations obtenus, sont soumis à une distillation à 78°C au chauffe-ballon (le dispositif de distillation est présenté en Annexe 4). Après chauffage, les vapeurs sont éjectées sous pression de la base de la colonne de distillation et progressent vers le haut en traversant successivement tous les plateaux de la colonne de distillation puis elles sont refroidies dans le condenseur (réfrigérant) avant d'être recueillies à l'état liquide.

2.3.4.1. Analyse du bioéthanol distillé

Afin d'effectuer une analyse qualitative du bioéthanol distillé, nous avons utilisé un chromatographe Thermo (TRACE 1310) couplé à un spectromètre de masse Thermo scientific TSQ Duo. Les paramètres d'utilisation du chromatographe et du spectromètre de masse sont mentionnés sur les tableaux 8 et 9.

Tableau 8 : Paramètres d'utilisation du chromatographe.

injecteur	
Température	220°C
Mode d'injection	Split100/1
Colonne	
Type	hp-5MS
Dimensions	long : 30 m, diamètre intérieur : 0.25 mm, épaisseur du film : 0.25 µm
Phase stationnaire	5% Phenyl, 95% dimethylpolysiloxane
Température du four	40°C pendant 10 min, palier 15°C/min jusqu'à 220°C, isotherme pendant 10 min
Gaz vecteur	Hélium pureté N 6
Débit GV	0.5 ml/min

Tableau 9 : Paramètres d'utilisation du détecteur de masse

Mode d'analyse	Scan (de 34 à 350)
Température de l'interface	280°C
Type d'ionisation	Impact électronique
Intensité du filament	70 ev
Type de l'analyseur de masse	Quadripôle
Température du quadripôle	150°C
Température de la source	230°C

PARTIE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Isolement et identification des levures

3.1.1. Sélection et Identification des souches de levures productrices de bioéthanol

3.1.1.1. Sélection

Trois levures ont été choisies parmi les isolats, les souches ont été codifiées, S1 S2 et S3 isolées respectivement de la mélasse de canne à sucre, les dattes et les figes.

Ces isolats sont sélectionnés et considérés comme des souches performantes pour la production de bioéthanol. Effectivement, les trois souches présentent pratiquement la même capacité de production d'éthanol (figure 8), telle que celle de la souche de référence *Saccharomyces cerevisiae* CLIB95 ; par conséquent, toutes les souches étaient considérées pour des expériences ultérieures.

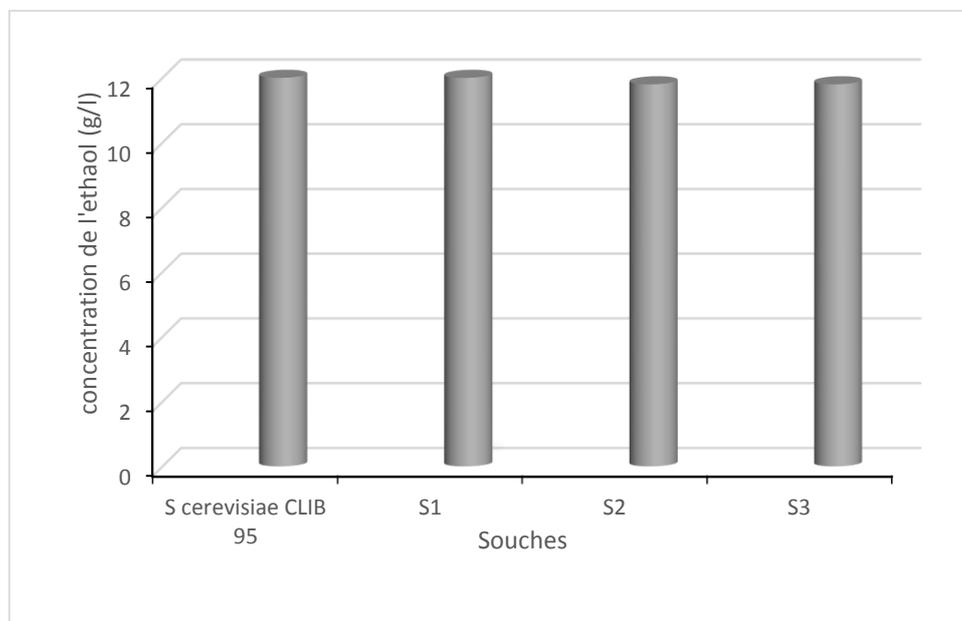


Figure 8 : Sélection des souches de levure productrice de bioéthanol.

3.1.1.2. Caractérisation morphologique

a) Identification macroscopique

L'observation macroscopique des cultures en milieu liquide et sur milieu solide a pu révéler les caractères suivants : des colonies de couleur blanche et de forme circulaire à ovale de surface lisse (figure 9), culture abondante sur gélose inclinée, la culture en milieu liquide présente un culot au fond du tube, absence de voile et d'anneau .

Des résultats similaires ont été rapportés par (Tikka, 2013). Des souches ont été observées avec des caractéristiques de la forme des cellules ovales et sur les quinze isolats, sept isolats présentaient une forme de cellule ovale avec un caractère bourgeonnant.

Petrea, (2008) a rapporté aussi que la morphologie des colonies de *S. cerevisiae* était semblable à des colonies de couleur crème, au profil convexe avec un périmètre circulaire, lorsqu'elles sont étalées sur YPGA (Levure-Pepton-Glucose Agar).

La morphologie des colonies est influencée par plusieurs paramètres environnementaux, la concentration d'agar, peut influencer la morphologie des colonies en changeant les propriétés physiques et chimiques du substrat (par exemple la tension superficielle, l'hydrophobicité de surface, etc.). D'autres paramètres, tels que la source de carbone, agissent probablement, au moins en partie, en modifiant la physiologie de la levure. En raison de ces paramètres multiples, Voordeckers (2012) a émis l'hypothèse que la morphologie des colonies est probablement régulée par plusieurs processus physiologiques complexes impliquant de nombreux produits géniques.

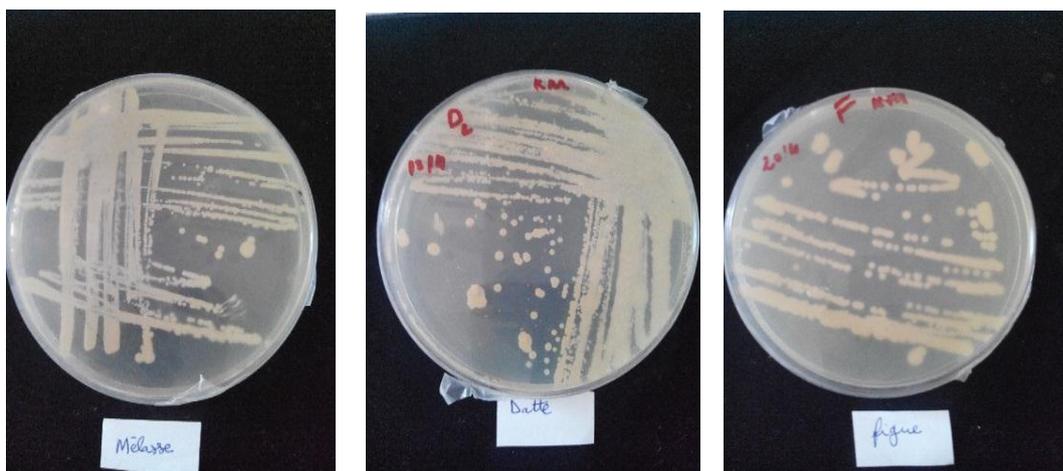


Figure 9 : Observation macroscopique des souches isolées.

b) Identification microscopique

L'observation microscopique effectuée sous microscope optique Carl Zeiss Axiostar X40 et X100 révèle des cellules de forme ronde à ovale avec un mode de reproduction végétative qui s'effectue par bourgeonnement (Figure 10).

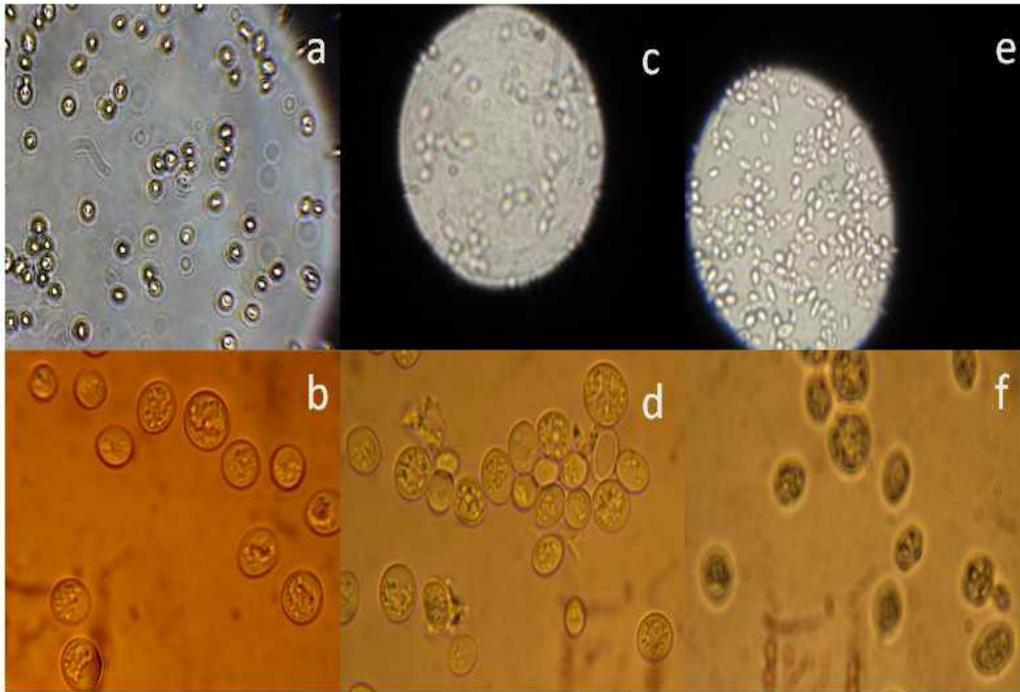


Figure 10 : observation microscopique des souches S1 (a)(b), S2 (c)(d) et S3 (e)(f) sur milieu YMA (X40 ET X100).

Les auteurs Hamouda H.I (2016), Patil SK (2010) et Techaparin (2017) ont isolé des levures de la mélasse de canne à sucre, de la pomme de pin et de l'orange, avec les mêmes caractéristiques morphologiques et appartenant au genre *Saccharomyces*.

D'après Kurtzman (1998) , les isolats de levures sélectionnées appartiennent probablement au genre des *Saccharomyces*. Il est bien connu que la levure est omniprésente et qu'elle peut se développer sur différents substrats (Tikka, 2013).

3.1.1.3. Caractérisation biochimique

a) Test d'assimilation (galerie API 20 C AUX)

D'après les résultats d'assimilation des sucres par les trois souches étudiées, nous remarquons qu'elles présentent toutes l'aptitude d'assimiler le glucose, le galactose le maltose et le raffinose en revanche, elles n'assimilent pas le lactose et le glycérol. Par ailleurs, l'assimilation des autres sources de carbone est variable.

D'après le logiciel (API 20C test kit, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) les trois souches étudiées peuvent appartenir, au Genre *Saccharomyces*.

Des résultats d'assimilation, similaire ont été trouvés par certain auteurs ; Mishra (2018) a ainsi identifié des souches de levures, isolées à partir de boisson alcoolisée à base de riz comme étant des *Saccharomyces cereviviae* (Mishra, 2018). Ferreira et al (2016) ont isolé des levures à partir de purée de pêche, identifiées comme étant également du genre *Saccharomyces cerevisiae*.

b) Test de fermentation des sucres

Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, les souches S1, S2 et S3 présentent une aptitude à fermenter certains sucres comme le glucose, galactose, saccharose, maltose et fructose, les autres sucres comme le lactose, xylose et arabinose ne sont pas fermentable (tableau 10).

Tableau 10 : Fermentation de différents hydrates de carbone par les souches isolées sélectionnées.

	glucose	galactose	saccharose	lactose	fructose	xylose	maltose	arabinose
S1	+	+	+	-	+	-	+	-
S2	+	+	+	-	+	-	+	-
S3	+	+	+	-	+	-	+	-

Ces fermentations positives des sucres sont caractérisées par production des gaz dans la cloche de Durham, traduisant ainsi, l'aptitude de ces souches à fermenter les substrats glucidiques testés.

L'importance de cette caractérisation revêt un intérêt industriel pour l'obtention de souches capables de fermenter plusieurs sucres autres que le glucose (Bai, 2008). Il a été démontré que le type sauvage de *S. cerevisiae* utilise plusieurs types de sucres tels que le maltose, le saccharose, le glucose, le mannose, le fructose et le galactose, mais pas le xylose et l'arabinose de *S. cerevisiae* (Van Maris, 2006).

Ylivero P. F (2011) ont rapporté que tous les isolats de levure fermentent au moins un type de sucre. Cependant, une majorité des isolats qui fermentent le glucose, le galactose, le maltose, le saccharose et le raffinose appartenaient au genre *S. cerevisiae* (Dash, 2015).

3.1.1.4. Effet de différents stress sur les souches isolées

Les levures rencontrent au cours de leur croissance et leur cycle de reproduction différentes contraintes. Elles sont exposées à un ensemble de stress tels que les stress osmotique, oxydatif, thermique, stress à l'éthanol. Ces conditions de stress, impactent leur comportement en affectant leurs capacités de croissance et leurs productions, causant ainsi un dysfonctionnement pouvant aller jusqu'à la mort des cellules (Estruch, 2000) et (Hohmann, 2002). Il est important que les cellules disposent de moyens pour faire face à ces stress afin de résister à ces dommages.

a) Stress salin

La pression osmotique provoquée par la forte concentration de sel dans le milieu affecte significativement la viabilité et la croissance cellulaire de plusieurs micro-organismes (Rodríguez-Navarro, 1982). Cette influence dépend du type et de l'espèce du micro-organisme. L'obtention des souches tolérantes au sel conduit à surmonter la limitation rencontrée pendant la fermentation et la production d'éthanol. Afin de déterminer l'efficacité des souches isolées à tolérer la salinité, elles ont été inoculées dans du YM liquide avec des salinités différentes (entre 0,5 M et 1,5 M de NaCl).

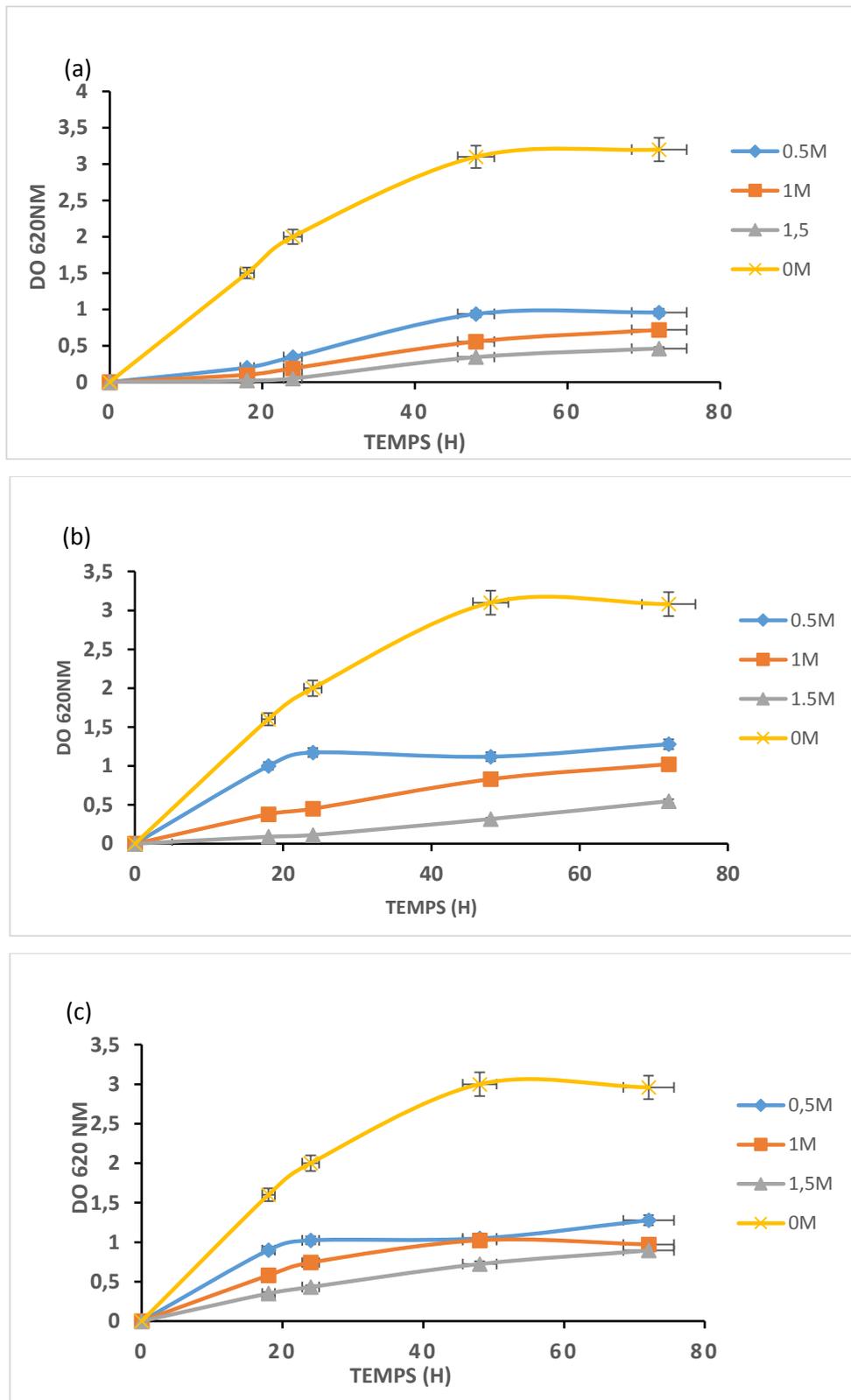


Figure 11 : Croissance des levures en présence de différentes concentrations de NaCl. (a)S1, (b) S2, (c)S3.

D'après les résultats obtenus (figure 11), nos souches peuvent croître dans de telles conditions et donc semblent tolérer des concentrations de NaCl (pouvant aller jusqu'à 1,5 M).

Cependant, comme cela a été observé, la présence de sel dans le milieu réduit considérablement la croissance des souches isolées. La diminution de la croissance des levures était de 70,5%, 60,8% et 61,32% pour les souches S1, S2 et S3, respectivement, en présence de 0,5 M de sel. Par ailleurs, la diminution de la croissance est importante en présence de 1,5M de NaCl elle était de 85,7%, 74,09% et 73,05% pour les souches S1, S2 et S3, respectivement.

L'étude de Wastson et al (1970) , montre que l'augmentation de la salinité de la culture milieu chez *S. cerevisiae* entraîne une augmentation de l'énergie de maintenance. L'énergie de maintien a été multipliée par 4 lorsque 1 M de NaCl a été ajouté au milieu de culture et que la croissance de *S. cerevisiae* a été affectée en conséquence.

On peut également voir à partir de nos résultats que les souches isolées ont une tolérance aux concentrations élevées de sel, étant donné leur capacité à survivre et à croître. Des résultats similaires ont été observés dans plusieurs études. Ainsi, Babu et al. (Babu, 2017) ont isolé une souche de *Saccharomyces cerevisiae* du sédiment de mangrove qui tolère une salinité comprise entre 0,5 et 1,5 M de NaCl.

Tekarslan- Sahin (2018) ont trouvé dans leur étude, que la souche mutante T8 résistant au NaCl pourrait tolérer une concentration maximale de 1,45 M de NaCl ; la résistance au NaCl de cette souche était 700 fois supérieure à celle de la souche de référence (Tekarslan-Sahin, 2018) .

Dhar et al (2011) ont étudié la croissance de la souche de *S. cerevisiae* BY4741 sous stress continu au NaCl (0,5 M) et ont montré que l'adaptation de la levure au stress salin est associée à une augmentation de la taille du génome et à des modifications modérées de l'expression de plusieurs gènes (Dhar, 2011) . Shaghaghi-Moghaddam et al. (2018) ont observé que la souche industrielle de *S. cerevisiae* présentait une résistance supérieure à la pression osmotique du bouillon fermenté par rapport à la souche de levure de boulanger traditionnelle. Ces résultats sont encourageants et permettent d'étudier plus tard la capacité de ces souches à tolérer différentes concentrations de NaCl.

b) Stress thermique

Les souches isolées ont été inoculées dans YMA et incubées à différentes températures (25,30 et 37 ° C).

D'après les résultats obtenus, sur boîte Pétri, nous observons une croissance des levures isolées et cela pour les différentes températures comprises entre 25 et 37 ° C.

Par ailleurs, D'Amore et al. (1989) ont observé qu'à une température de 30 à 37 ° C, les levures croissent et se multiplient plus rapidement, mais que la croissance des levures diminue à mesure que la température augmente davantage (D'amore, 1989).

De plus Osman et al (2011) ont rapporté que la production maximale de l'éthanol et de biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* est obtenue dans la gamme de 28 à 30 °C (Osman, 2011). Au contraire, Duhan et al (2013) ont signalé une température de 35 ° C comme optimale pour la production de bioéthanol sur pomme de terre en utilisant *Saccharomyces cerevisiae* MTCC-170. (Duhan, 2013)

Des températures allant de 25 à 40°C ont été étudiées Babu (2017), en vue de rechercher la température optimale pour la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*. La croissance maximale a été notée à 30°C dans un milieu de pH 6 et contenant 3% de saccharose ,0.5% d'extrait de levure (Babu M, 2017).

c) Tolérance à l'éthanol

La capacité à tolérer divers stress (osmolarité et éthanol) est l'un des principaux critères de sélection des souches pour une fermentation efficace à l'éthanol. Le défi commun des souches peut être surmonté en utilisant des levures tolérantes à l'éthanol ; il est donc important de sélectionner des souches hautement résistantes à l'éthanol. Cependant, la capacité de tolérance à l'éthanol dépend du type du microorganisme. Pour l'évaluation de la capacité de tolérance à l'éthanol, les souches isolées ont été inoculées dans du YMA contenant différentes concentrations d'éthanol (5, 7, 9, 10, 12, 14, 16 et 20%) .

Tableau 11: Tolérance des souches isolées à l'éthanol.

Ethanol tolerance				
Concentration de l'éthanol (%)	S1	S2	S3	<i>S. cerevisiae</i>
5	+	+	+	+
7	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	+	+	+	+
12	+	+	+	+
14	W	+	+	-
16	-	+	+	-
20	-	+	+	-

+: Positive; -: Negative; W: Weakley (faible)positive

Le tableau (11) représente l'effet de l'augmentation des concentrations éthanol sur les différentes souches comparativement à la souche de référence *S. cerevisiae* CLIB 95. Les résultats ont montré que toutes les souches se développent à 5, 7, 9, 10 et 12% de concentration d'éthanol. Au-dessus de cette concentration, aucune croissance n'a été observée pour la souche de référence ; l'éthanol inhibe la croissance de la levure, la division cellulaire, et diminue le volume cellulaire et le taux de croissance spécifique, et des concentrations élevées réduisent la vitalité cellulaire et augmentent la mort cellulaire (Birch, 2000) . Concernant les souches isolées, S1 tolérait jusqu'à 14% (v / v) d'éthanol, alors que les isolats S2 et S3 étaient très tolérants, jusqu'à 20% (v / v) d'éthanol.

Selon Negi et al. (2013) Les souches résistantes peuvent être isolées à partir de ressources naturelles et les différences de tolérance à l'éthanol peuvent être dues à des différences dans leur habitat naturel (Negi, 2013) . Effectivement ils ont isolé des souches de différentes régions de l'Himachal Pradesh en Inde. Parmi les 14 souches identifiées comme *S. cerevisiae*, une seule tolérait jusqu'à 12% v / v d'éthanol. La tolérance à l'éthanol manifestée par les souches isolées dans cette étude était en accord avec celles de Nwachukwu et al. (2006) qui ont trouvé une tolérance maximale et minimale à l'éthanol de 20% et 10% pour leurs souches. (Nwachukwu, 2006). Par ailleurs, parmi 234 isolats de levure, Techaparin et al (2017) ont trouvé que la

majorité des isolats toléraient des concentrations d'éthanol allant jusqu'à 10% (v / v). Effectivement, cinq levures isolées étaient très tolérantes à des concentrations d'éthanol allant jusqu'à 13% (v / v). (Techaparin, 2017).

L'utilisation de souches de levures efficaces avec une forte tolérance à l'éthanol pour améliorer les rendements en éthanol dans le produit de fermentation (mélasse de canne) réduirait les coûts de distillation et donc la rentabilité du processus global (Chandrasena et al, 2006).

Une étude sur le dépistage de *S. cerevisiae* pour une tolérance élevée à l'éthanol a montré que la tolérance était doublée pour les souches irradiées par des rayons gamma, comparé à l'utilisation de la souche initiale de *S. cerevisiae* (Mehdikhani, 2011). Des levures naturellement tolérantes à l'éthanol peuvent avoir un intérêt fondamental pour les scientifiques, et économiques pour les industriels. Effectivement, cela pourra améliorer les rendements en éthanol dans le produit de fermentation, permettrait de réduire les coûts de distillation et donc la rentabilité du processus global (Chandrasena et al, 2006).

3.1.1.5. Identification moléculaire

En règle générale, l'identification moléculaire est effectuée pour confirmer les résultats des identifications morphologique et biochimique.

La technique basée sur la spectrométrie de masse MALDI TOF a permis de confirmer que toutes les souches appartiennent à *Saccharomyces cerevisiae*. Le pourcentage d'identification était supérieur à 99% (Annexe 5).

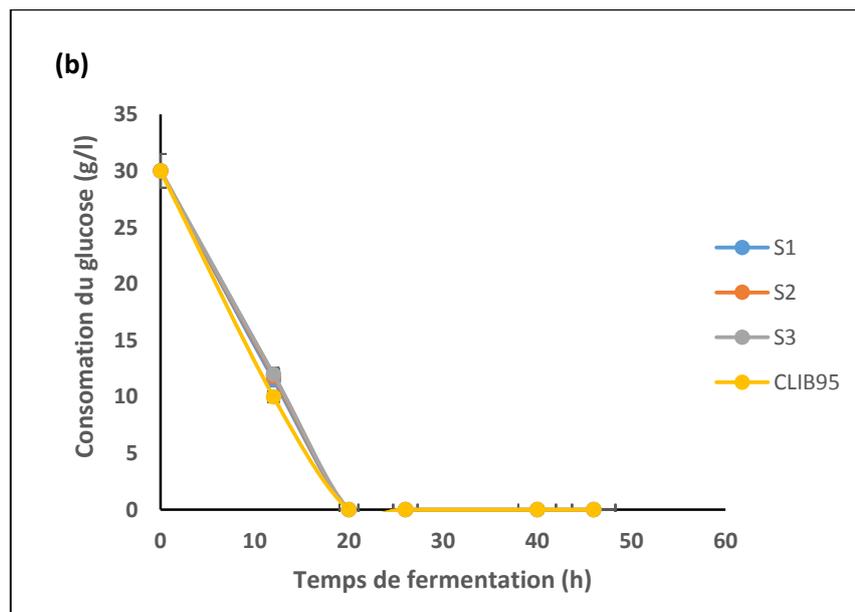
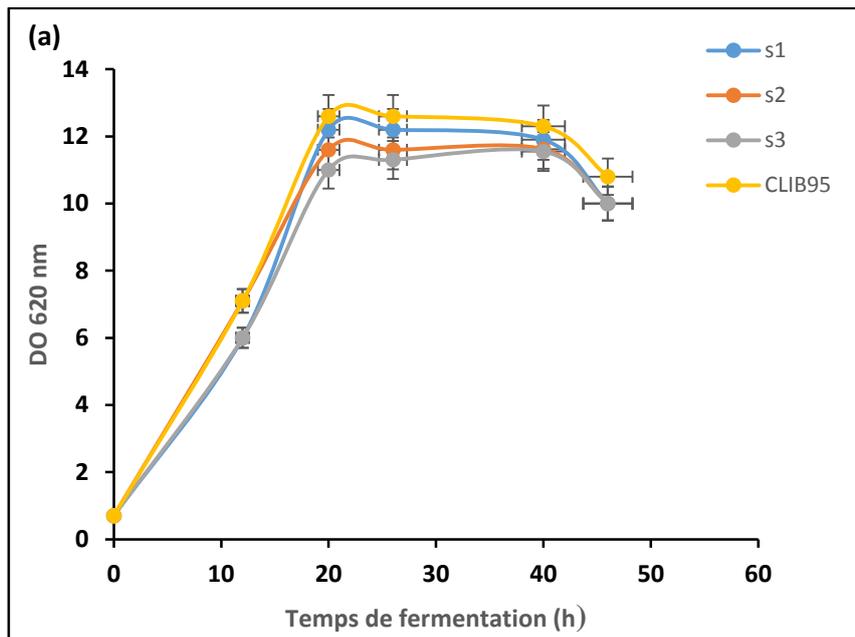
La PCR d'analyse Mini / Micro-Satellite Primed est réalisée sur les 3 souches et un témoin (*Saccharomyces cerevisiae* DSM70449). Sur la base des profils génétiques, le logiciel GelJ a été utilisé pour produire un dendrogramme spécifiant la similitude des souches témoins.

Les souches *S. cerevisiae* S2 et S3 sont très similaires (80% similaires) tandis que la souche *Saccharomyces cerevisiae* S1 forme un groupe distinct.

3.2. Production du bioéthanol

3.2.1. Production d'éthanol dans un milieu synthétique à base de glucose

La production d'éthanol des souches isolées dans le milieu de culture contenant 30 g.L^{-1} de glucose a été examinée après incubation à 28°C pendant 46 h afin de sélectionner les souches qui ont la capacité de produire de l'éthanol à des concentrations importantes. *S. cerevisiae* CLIB 95 a été utilisée pour comparaison.



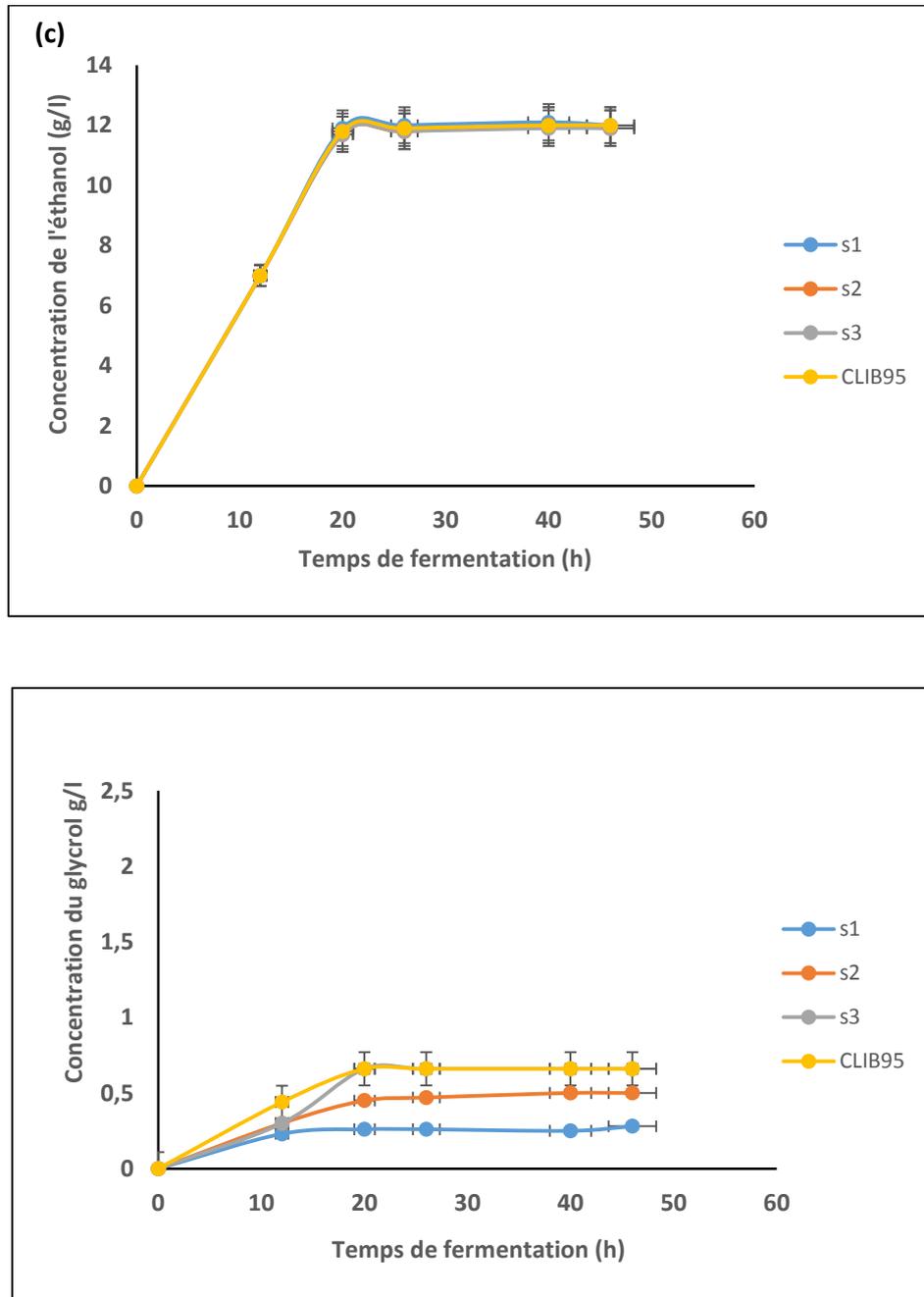


Figure 12 : Sélection des souches de levures productrices de l'éthanol dans un milieu synthétique (30g/L).

(A) : Absorbance, (B) : consommation de glucose, (C) : production d'éthanol, (D) : production de glycérol.

La figure 12, montre que les souches présentent pratiquement la même capacité fermentaire. D'autre part, la figure (12 A) montre que les trois souches étudiées ont conduit à la même croissance cellulaire la plus élevée et à la même quantité de biomasse finale. Aucune différence significative en ce qui concerne la consommation de glucose et de la production d'éthanol (environ 12 g.L⁻¹ d'éthanol pour les souches) n'est à révéler. Les souches de levure ont également sécrété du glycérol pendant la fermentation (Figure 12 D). S1 est le plus faible producteur de glycérol (0,28 g.L⁻¹), tandis que S3 et la souche de référence ont produits les concentrations les plus élevées de glycérol (0,66 g.L⁻¹). Les rendements en éthanol à 20 h de fermentation étaient proches de 0.40 g.g⁻¹ pour toutes les souches et les productivités étaient de 0,58 g.L⁻¹.h⁻¹.

Techaparin et al. (2017) ont testé la production d'éthanol avec des levures thermotolérantes isolées, en utilisant du glucose comme substrat, et ont démontré que les 26 souches testées produisaient toutes de l'éthanol; les concentrations, les productivités et les rendements en éthanol étaient compris entre 37,47 et 72,69 g.L⁻¹, 0,78 et 1,59 g.L⁻¹.h⁻¹ et 0,27 à 0,44 g.g⁻¹, respectivement. Dash et al. (2015) ont également étudié la capacité de production d'éthanol de certaines souches isolées sur différents substrats naturels, tels que le jus de canne à sucre, le jus de fleurs de Mahua, le jus de raisin; toutes les souches ont produit de l'éthanol, mais la capacité de fermentation variait considérablement avec le substrat utilisé.

Brooks (2008) a examiné la capacité des souches isolées à produire de l'éthanol en utilisant le milieu de fermentation composé de pelure de banane additionné de 10% (p / v) de glucose et enrichis en peptone et extrait de levure. Il a constaté que toutes les souches produisent de l'éthanol; mais la capacité de production dépend du milieu de fermentation et des souches utilisées.

3.2.2. Production du bioéthanol avec un milieu synthétique d'algue

Après examen de la tolérance des souches à la salinité et de leur aptitude à produire de l'éthanol, une fermentation de ces souches sur un milieu synthétique d'hydrolysats d'algues vertes (*Ulva lactuca*), potentiel substrat intéressant pour la production de bioéthanol d'algues a été réalisée.

Ce milieu contient des sels qui pourraient influencer sur les performances des souches par leur impact sur la pression osmotique. La supplémentation en milieu synthétique (15 g.L⁻¹ glucose) de chlorure de sodium à des concentrations similaires à celles trouvées dans les hydrolysats (NaCl 1,37 M) du CEVA (Centre d'Étude et de Valorisation des Algues), basé à Pleubian dans

les Côtes d'Armor) devrait permettre d'étudier la production d'éthanol des trois souches de levure sélectionnées confrontées à ce changement d'osmolarité.

La production d'éthanol et la consommation de glucose sont observées pour les trois souches isolées et la souche de référence dans le milieu de culture (Tableau 12).

Tableau 12 : Comparaison de la consommation et de la production entre les trois souches isolées après 46 h de fermentation en milieu synthétique simulant un hydrolysats d'algues (15 g.L⁻¹ glucose et 1,37 M de NaCl)

	Consommation du Glucose (g.l ⁻¹)	production de l'éthanol (g.l ⁻¹)	Efficacité %	Absorbance (600nm)	Rendement en éthanol (g.g ⁻¹)	Rendement en glycérol (g.g ⁻¹)	Rendement en acide acétique (g.g ⁻¹)
S1	13.80	2.30	32	1.53	0.16	0.21	0.04
S2	14.26	3.68	52	1.89	0.27	0.19	0.05
S3	12.88	3.68	58	1.89	0.29	0.20	0.05
<i>S.cerevisiae</i>	13.34	2.30	31	1.33	0.16	0.20	0.03

Après 46h de fermentation, presque tout le glucose est consommé ; le taux de consommation est très lent le premier jour de culture, un milieu modifié avec des niveaux de salinité plus élevés est une source de stress osmotique (Djelal et al, 2005). Une diminution de densité cellulaire est observée dans le milieu en présence de sel par rapport à celui qui contient que le glucose, tout cela s'explique par le fait que la pression osmotique entrave le développement de la levure et inhibe donc partiellement l'assimilation du glucose (Djelal et al., 2012).

Un comportement similaire a été déjà observé avec *Hansenula anomala* (Djelal et al, 2006), *Pichia farinosa* (Vijaikishore et Karanth, 1984) et *Dekkera bruxellensis* (Galalafassi et al, 2013). Malgré la présence d'une grande quantité de sel, les souches produisaient encore de l'éthanol. C'est encourageant pour les travaux futurs notamment sur les hydrolysats d'algues.

Dans notre étude, les souches S2 et S3, ont eu une production d'éthanol élevée (3,8 et 3,9 g.L⁻¹ respectivement) par rapport à celle de S1 et *Saccharomyces* de référence (2,2 et 2,1 respectivement) ; cela peut être du à la sensibilité de ces derniers, à la pression osmotique, en effet il a été reporté que le NaCl avait un effet inhibiteur sur la production de l'éthanol (Djelal et al, 2005). Cette perte de production d'éthanol devrait être compensée par une augmentation de la production de glycérol.

Les souches ont tenté de réduire le potentiel osmotique du cytoplasme et de réintégrer une partie de l'eau perdue par la production de glycérol ($0,2 \text{ g.g}^{-1}$), en ce qui concerne l'acide acétique des rendements similaires ont été trouvés pour les souches ($0,05 \text{ g.g}^{-1}$). Comme le glycérol, l'acide acétique joue également un rôle dans l'osmorégulation. (Blomberg and Adler, 1989 ; Blomberg and Adler, 1992). Dans notre étude nous remarquons que les souches S1, S2 et S3 isolées respectivement de la mélasse, datte et figue, présentent des comportements différents par rapport à la tolérance des sels, notamment en termes de rendement en éthanol produit ($0,16$ pour S1, $0,27$ et $0,29 \text{ gg}^{-1}$ respectivement pour S2 et S3) et d'efficacité de la fermentation (32% pour S1, 52 et 58% pour S2 et S3).

Nasir et al. (2017), ont établi dans leur étude, que la souche isolée d'ananas tolérait avec succès jusqu'à 9% de sel de chlorure de sodium, tandis que *Saccharomyces cerevisiae* tolérait une concentration de sel de chlorure de sodium supérieure à 12% .

Ainsi, en comparant nos trois souches à la souche de référence, il a été observé que la souche S1 représente des résultats pratiquement similaires à ceux obtenus avec *Saccharomyces cerevisiae* de référence, tandis que S2 et S3 présentaient une meilleure capacité de fermentation en présence de ces conditions stressantes.

Des micro-organismes capables de produire de l'éthanol, dans des conditions de stress (température, osmolarité, tolérance à l'éthanol), ont été isolés de diverses sources. En effet, Ramos et al, (2013) ont évalué les performances fermentatives à partir du jus de canne à sucre de 66 souches indigènes de *Saccharomyces cerevisiae* dans des conditions stressantes (tolérance à la température, à l'osmolarité, aux sulfites et à l'éthanol). Les valeurs les plus élevées ont été obtenues par quatre souches, l'une isolée de fruits ($0,46$) et les autres de canne à sucre ($0,45$, $0,44$ et $0,43$). Ces valeurs étaient supérieures à celles obtenues avec la levure traditionnelle ($0,38$) actuellement utilisée dans l'industrie brésilienne du bioéthanol.

3.2.3. Co-culture S2 avec S3

La bioconversion par co-culture offre la possibilité de maximiser le taux d'utilisation du substrat, d'augmenter le rendement en éthanol et le taux de production et de réduire les coûts de traitement (Singh et Bishnoi, 2012 ; Chen, 2011).

Pour vérifier si la co-culture améliore la production d'éthanol, la fermentation a été effectuée dans les mêmes conditions que la monoculture, à savoir le glucose à 15 g.L^{-1} et le NaCl $1,37 \text{ M}$. Les souches S2 et S3 ont été choisies pour leur tolérance aux sels et pour le taux de production d'éthanol. La même quantité de chaque souche a été utilisée dans la fermentation à savoir 10 \% v/v .

La co-culture a permis d'améliorer le rendement en éthanol et l'efficacité de la fermentation par rapport à la fermentation en monoculture.

En effet, la figure 13 montre que la croissance de la co-culture est plus importante que celle d'une seule culture. Cette croissance est liée probablement à la consommation de glucose.

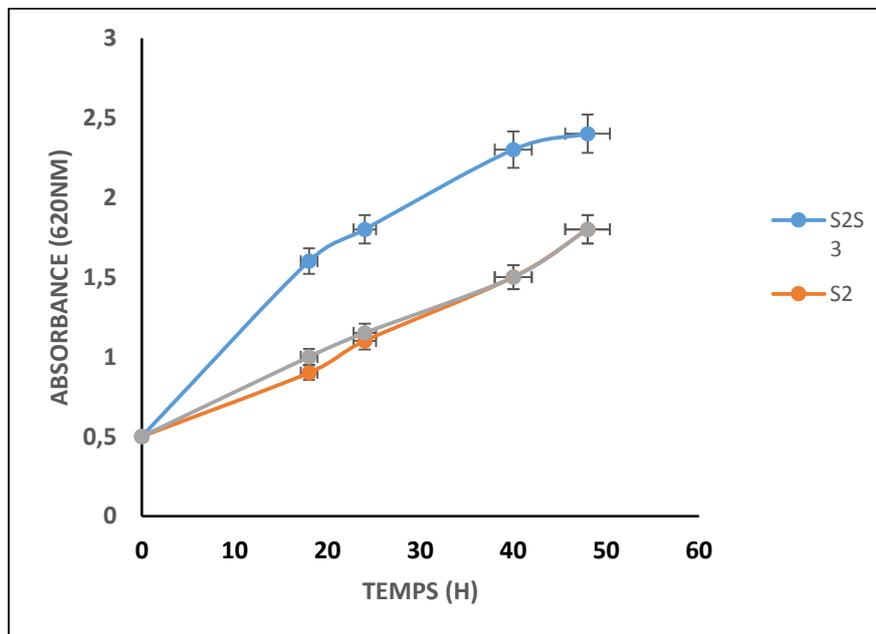


Figure 13 : Absorbance mesurée à 600 nm pendant les 46 h de fermentation du milieu synthétique.

En fait, on peut constater sur la figure 14 (a), que l'utilisation du consortium est plus efficace pour la production d'éthanol. Il a été observé qu'après 24 heures, la consommation de glucose des souches S1 et S2 était respectivement de 2 et 4 g.L⁻¹ (figure 14 (b)) Alors que, la consommation de glucose dans le cas d'un consortium a été doublée à 7 g.L⁻¹. Cela conduit à une production d'éthanol de 5.25 g/L. Ces résultats montrent que l'utilisation simultanée des deux souches a eu un effet positif sur leur croissance et sur la production d'éthanol.

Les rendements en éthanol étaient de 0,35 g.g⁻¹ pour la co-culture et de 0,27 et 0,29 g.g⁻¹ pour les cultures pures de S2 et S3, respectivement.

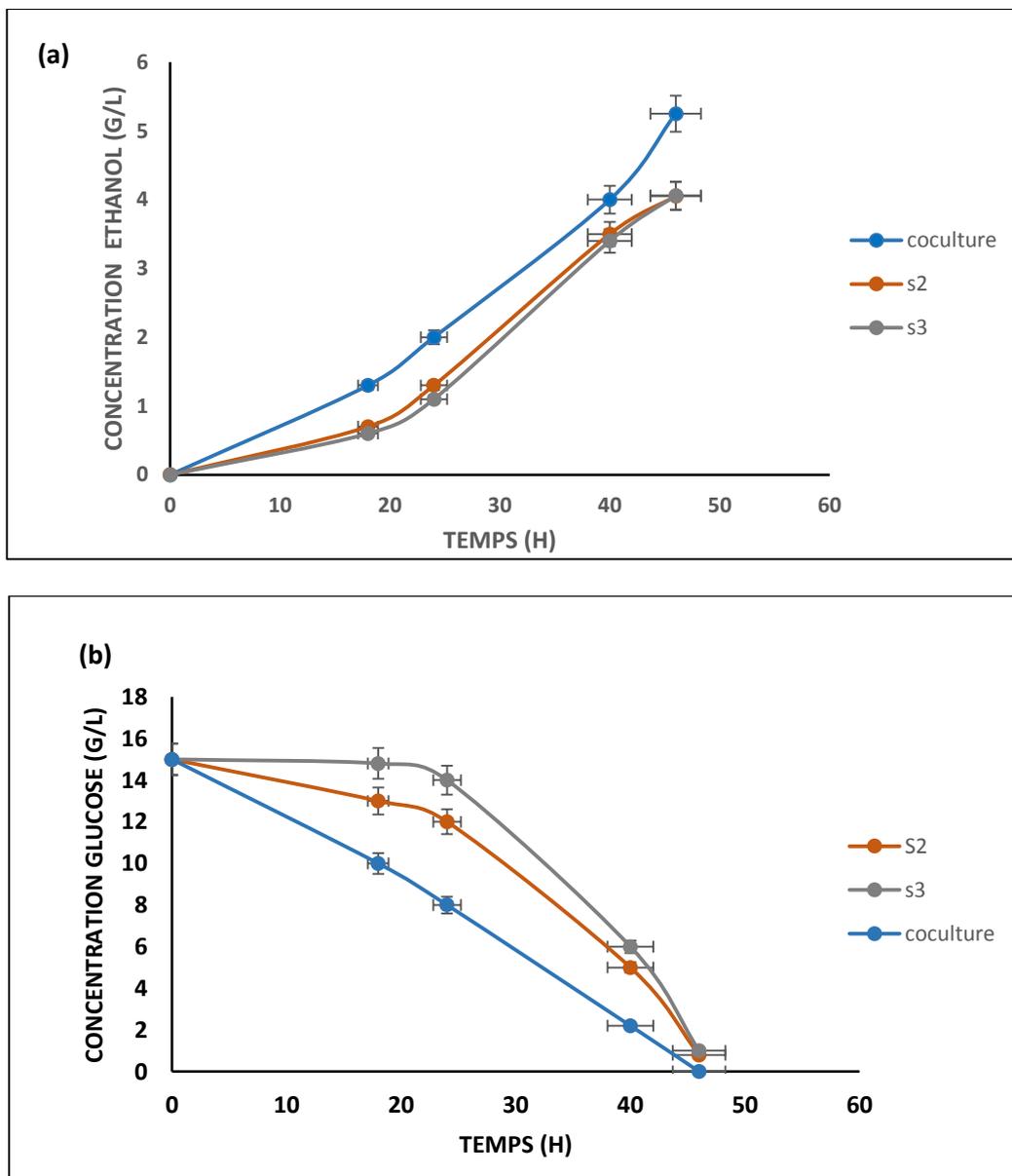


Figure 14 : Cinétique de production de l'éthanol (a) et de consommation du glucose et de (b).

En ce qui concerne l'efficacité, elle est passée de 52 et 59% pour S2 et S3 respectivement dans la monoculture à 68% pour la co-culture de S2 et S3 (figure 15).

Djelal et al. (2017) ont montré que la fermentation de sous-produits de dattes par des co-cultures de la souche isolée *B. amyloliquefaciens* et *Z. rouxii* montrait une augmentation du rendement en éthanol de 12,5% comparativement à la culture unique. Kalyani et al. (2013) ont observé que la co-culture de *S. cerevisiae* et de *Pichia stipitis* produisait 23% et 38% de plus d'éthanol que les quantités produites par *S. cerevisiae* et *P. stipitis* dans des cultures pures. Harish et al. (2010) ont obtenu un rendement en éthanol de 0,41g.g⁻¹ lors de la co-culture de *Clostridium thermocellum* et de *Clostridium thermosaccharolyticum* sur un hydrolysate de banane, soit 36 à 59% de plus que la culture pure correspondante de *Clostridium thermocellum*.

Ces résultats prometteurs montrent que la co-culture offre un potentiel considérable pour la conversion efficace en éthanol des algues vertes.

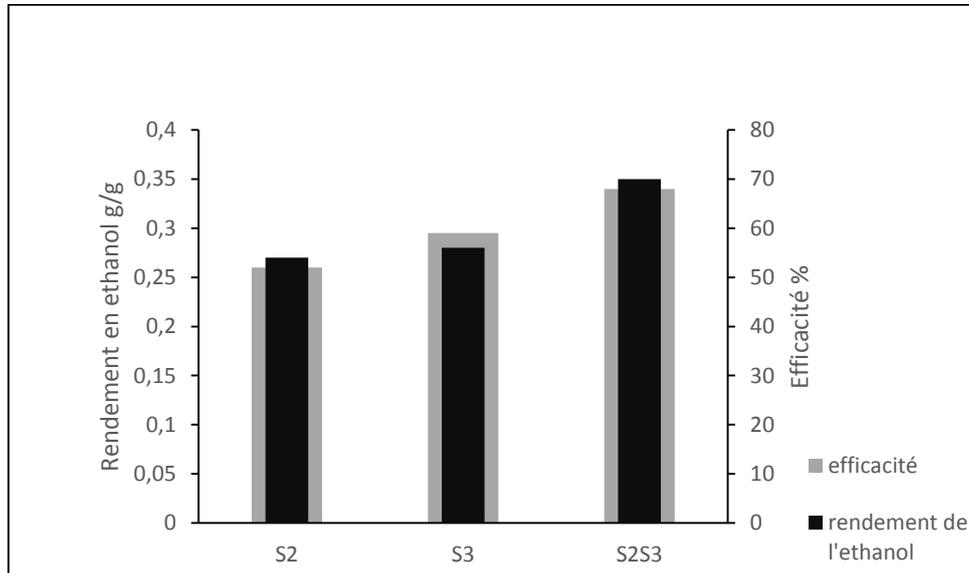


Figure 15 : Comparaison du rendement en éthanol de l'efficacité au cours de cultures uniques de S2, S3 et de leur co-culture dans un milieu modèle synthétique d'algues (15 g.L⁻¹ glucose et 1,37 mol.L⁻¹ NaCl).

3.2.4. Production de l'éthanol à partir de la mélasse de canne à sucre

3.2.4.1. Caractérisation de la mélasse de canne à sucre

Les caractéristiques physicochimiques de la mélasse de canne à sucre sont données dans le tableau 13.

Tableau 13 : Caractérisation de la mélasse.

Paramètres	Valeurs
Brix	83 %
Densité	1,43
pH	6,40
Sucre totaux	79 %
Sucres réducteurs (glucose+fructose)	17%
Saccharose	62%
Taux de cendre	6,04 %
Protéine	0,80 %
Lipides	0 %
Chlorure	1580 mg /kg
Phosphore	0,65 mg / kg
Potassium	146,23 g/kg
Calcium	0,3 %

La plupart des paramètres chimiques indiqués dans ce tableau sont en accord avec ceux rapportés par Abubaker et al, (2012), qui ont trouvé 83,2% de matières solides solubles totales, 17,8% de sucres réducteurs. Quelques différences sont à relever en ce qui concerne la composition en minéraux.

De plus, notre mélasse possède une composition similaire à celle utilisée par (Caldwell, 1998) Il apparaît clairement que la mélasse est une source riche, elle contient des quantités importantes de différents composants chimiques, comme des sucres sous une forme facilement fermentable, elle est de ce fait considérée comme une matière première idéale pour la production de bioéthanol (Abubaker et al, 2012).

Chen and chou (2003) ont trouvé que la mélasse contenait 52% de sucres totaux, 16% de sucres réducteurs, 34% de saccharose, 12% de cendres et un pH de 5,0.

Nous remarquons également, que notre mélasse de canne à sucre est caractérisée par une teneur relativement élevée de sucres réducteurs.

La mélasse est en outre une source riche en minéraux, en la comparant avec d'autres sources d'énergie alimentaire couramment utilisées (Abubaker et al, 2012).

Par conséquent, la teneur en éléments nutritifs, la saveur, la couleur et la viscosité de la mélasse peuvent varier considérablement, le saccharose reste le principal sucre présent.

La différence de composition de mélasse rapportée par différents auteurs peut être liée à la localisation géographique de la matière première, au type de mélasse, et aux conditions de traitement industriel appliqué (El-Gendy, 2013).

3.2.4.2. Fermentation de la mélasse de canne à sucre

Afin d'étudier la production du bioéthanol à partir de la canne à sucre, nous avons utilisé la souche S1 et des concentrations en mélasse de 150 et 270 g/L afin d'étudier le comportement de la souche à des degrés Brix différents.

La souche S1 a été choisie pour ses caractéristiques similaires à la souche de référence *Saccharomyces cerevisiae* CLIB 95.

a) Consommation de sucre

Saccharomyces cerevisiae préfère le glucose au fructose (Chniti et al.2015) *Saccharomyces cerevisiae* a un comportement différent en ce qui concerne la consommation de glucose, de fructose et de saccharose (Phowchinda, 1999). C'est ce que nous avons observé dans notre étude, effectivement, la souche isolée *Saccharomyces cerevisiae*, présente des comportements différents vis-à-vis de la consommation de glucose, de fructose et de saccharose comme on peut le voir sur la (figure 16).

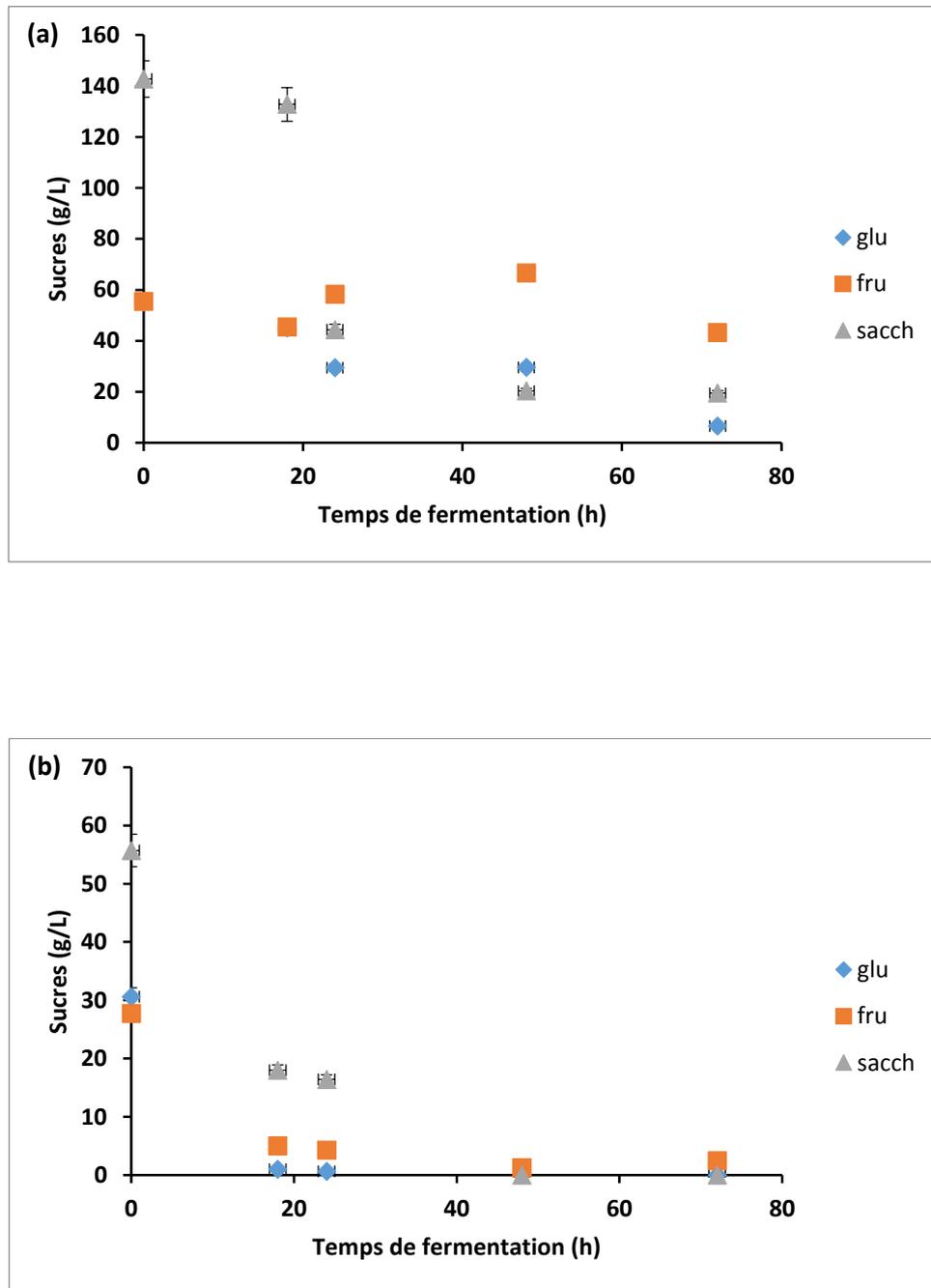


Figure 16 : Cinétique de consommation des sucres au cours de la fermentation de la mélasse (270g/l) (a), (150g/l) (b).

En effet, après 72h, les sucres n'étaient pas entièrement consommés ; l'hydrolyse du saccharose en fructose et en glucose après 24 h doit également être remarquée. *Saccharomyces cerevisiae* peut hydrolyser le saccharose selon deux mécanismes différents : dans le premier, le saccharose est hydrolysé par une invertase extracellulaire, l'hydrolyse produit du glucose et du fructose, qui pénètrent dans la cellule par diffusion facilitée via des transporteurs d'hexose.

Dans le deuxième mécanisme, le saccharose peut être activement transporté dans les cellules par un mécanisme d'importation de protons et hydrolysé par voie intracellulaire (Stambuk, 2000) (Batista, 2004).

Nous pouvons conclure que la *Saccharomyces cerevisiae* isolée a une caractéristique glucophile, ce qui est rapporté dans les travaux de (Sudibyo, 2017) (Tronchoni, 2009) , (Berthels, 2008) . Ces derniers ont montré que les différences de consommation de glucose / fructose étaient liées à différentes propriétés cinétiques de l'hexokinase des souches de *Saccharomyces*. La mélasse de canne à sucre est principalement composée de saccharose, tandis que le fructose et le glucose sont présents à de plus faibles teneurs. Après 42 h de fermentation, les sucres sont totalement consommés par la levure *Saccharomyces cerevisiae* S1 ; cela peut être attribué à la faible quantité de sucres, ce qui laisse supposer que la levure n'était pas dans des conditions de stress (Muruaga et al.2016).

Saccharomyces cerevisiae est une levure fortement "Crabtree positive", c'est-à-dire qu'au-dessus de 100 à 150 mg/L de glucose dans le milieu (Verduyn, 1984) ,cette levure produit de l'éthanol même en conditions aérobies alors que les autres levures ne peuvent en supporter que de 20 à 50 g / L.

b) Croissance des levures au cours des fermentations

Sur la figure (17), la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* isolée est représentée sur de la mélasse pour un brix initial de 15 ° et 27 °. Comme on peut le constater, la croissance a montré des tendances presque similaires sur les deux mélasses.

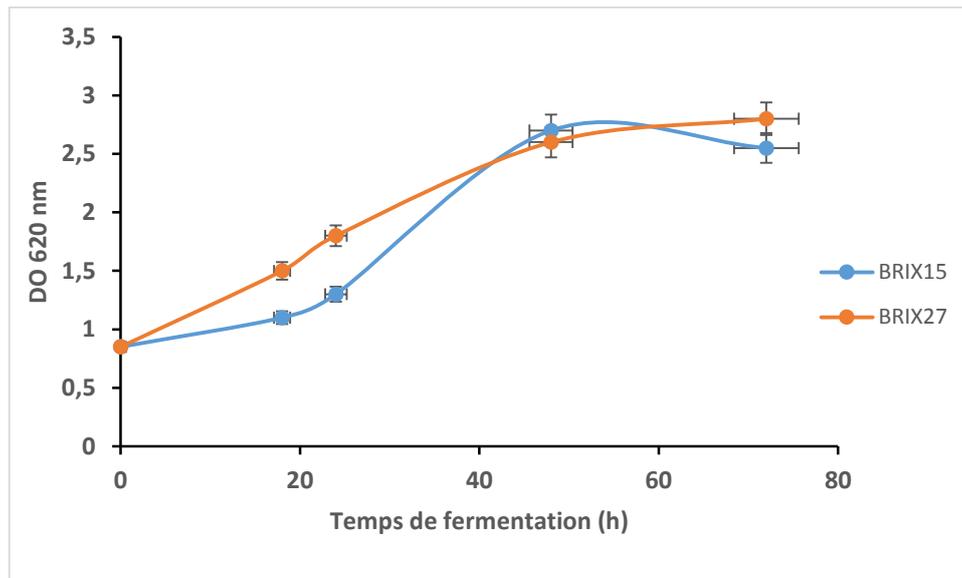


Figure 17 : Croissance de *Saccharomyces cerevisiae* dans la mélasse à brix 15° et brix 27°.

Cependant, une légère baisse de croissance à 15 ° brix a été observée en fin de fermentation, ce qui peut être lié à la consommation totale de sucre. En effet, après 72h de fermentation, la souche a consommé 98,33% du sucre présent dans le milieu à brix 15 °, alors qu'elle ne consomme que 72,72% dans le milieu à brix 27 °.

c) Production du bioéthanol et du glycérol

Les figures (18) et (19), montrent que l'éthanol et le glycérol sont produits tout au long de la fermentation alcoolique, parallèlement à la consommation des sucres. Les quantités d'éthanol produites sont sensibles à la concentration initiale en sucres ; elles augmentent de 42,05 g.L⁻¹ pour le milieu Brix 15° à 74,24 g.L⁻¹ pour le milieu à Brix 27°. Il est à noter qu'en plus de la production d'éthanol, certaines études ont montré la coproduction de composés à valeur ajoutée tels que le glycérol (Djelal et al, 2006) et des composés volatils (Sarris et al, 2009).

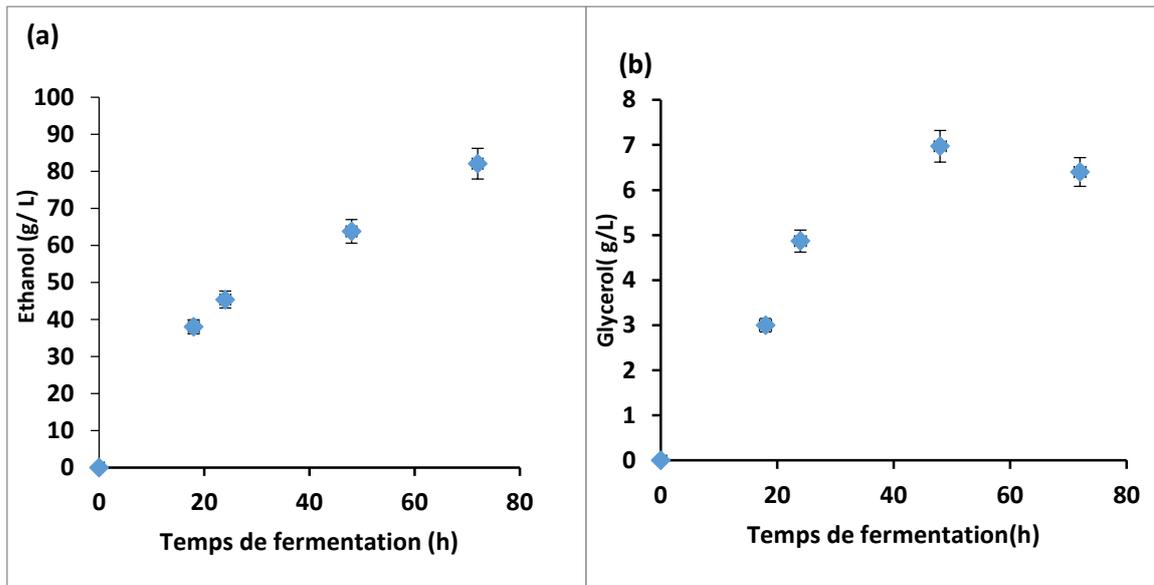


Figure 18 : concentration de l'éthanol (a) et du glycérol (b) au cours de la fermentation brix 27°, par *Saccharomyces cerevisiae* .

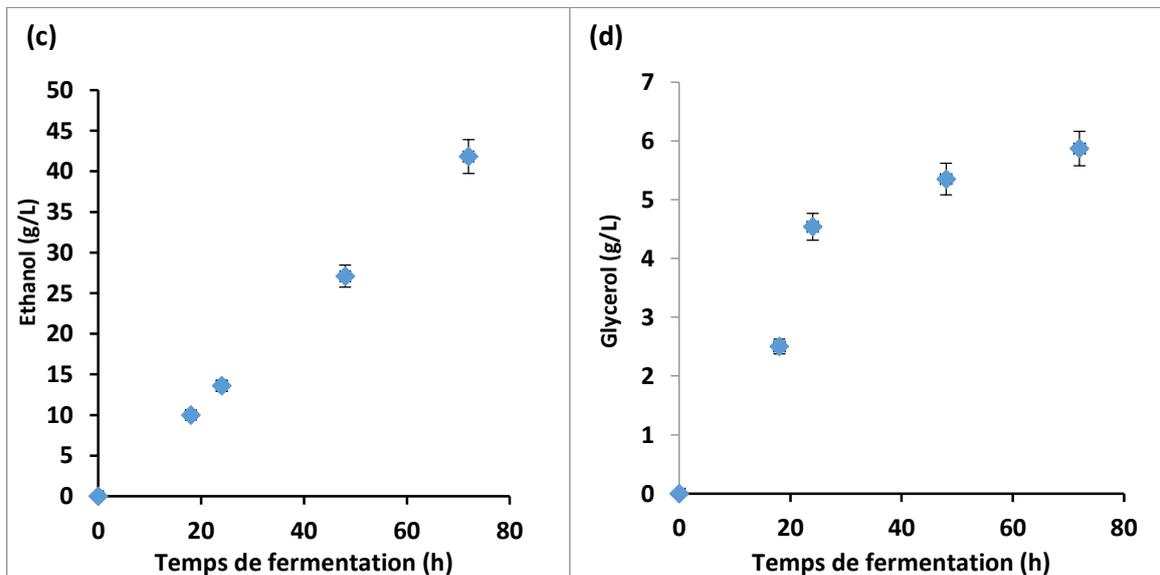


Figure 19 : concentration de l'éthanol (c) et du glycérol (d) au cours de la fermentation brix 15°, par *Saccharomyces cerevisiae* .

Dans notre étude, des quantités de glycérol similaires à celles qui ont été rapportées par d'autres auteurs ont été produites au bout de 24 heures de fermentation, dans les deux milieux, cette production était plus élevée lorsque la teneur en sucre est la plus élevée (27 ° Brix) après 48 h de fermentation.

Des résultats similaires ont été rapportés par un auteur chercheur (Phukoetphim, 2017) qui note que la concentration en glycérol augmentait avec la concentration en sucres.

Une diminution a été observée à 27 ° Brix en fin de fermentation ; ceci serait dû à la production de polyols intracellulaires autres que le glycérol qui équilibrent la pression osmotique externe (Sasano, 2012) (Djelal et al, 2005).

La souche isolée est ainsi capable de produire de l'éthanol à partir de mélasse et de consommer les trois sucres contenus dans le milieu (glucose, fructose et saccharose). Attfield et al. (1997) et Jiménez-Martí et al.(2011) ont indiqué que, dans un environnement particulier, les levures doivent faire face au stress osmotique provoqué par des concentrations élevées de sucre; une partie du sucre assimilé est utilisée pour le maintien des cellules afin de produire du glycérol sous forme d'osmolyte. Il est à noter qu'en plus de la production d'éthanol, certaines études ont montré la coproduction de composés à valeur ajoutée tels que le glycérol (Djelal et al, 2006) et les composés volatils (Sarris et al, 2009).

Les paramètres cinétiques de croissance et de production de bioéthanol sont résumés dans le (Tableau 14).

Tableau 14 : Paramètres des cinétiques de production du bioéthanol et du glycérol.

	Rendement éthanol $y_{p/s}$ (g/g)	Productivité de l'Éthanol r_p g/L/h	Vitesse moyenne de consommation des sucres r_s g/L/h	Efficacité %	Rendement en Glycerol g/g
Brix 15°	0.28	0.58	1.25	54	0.03
Brix 27°	0.40	1.03	1.52	74	0.04

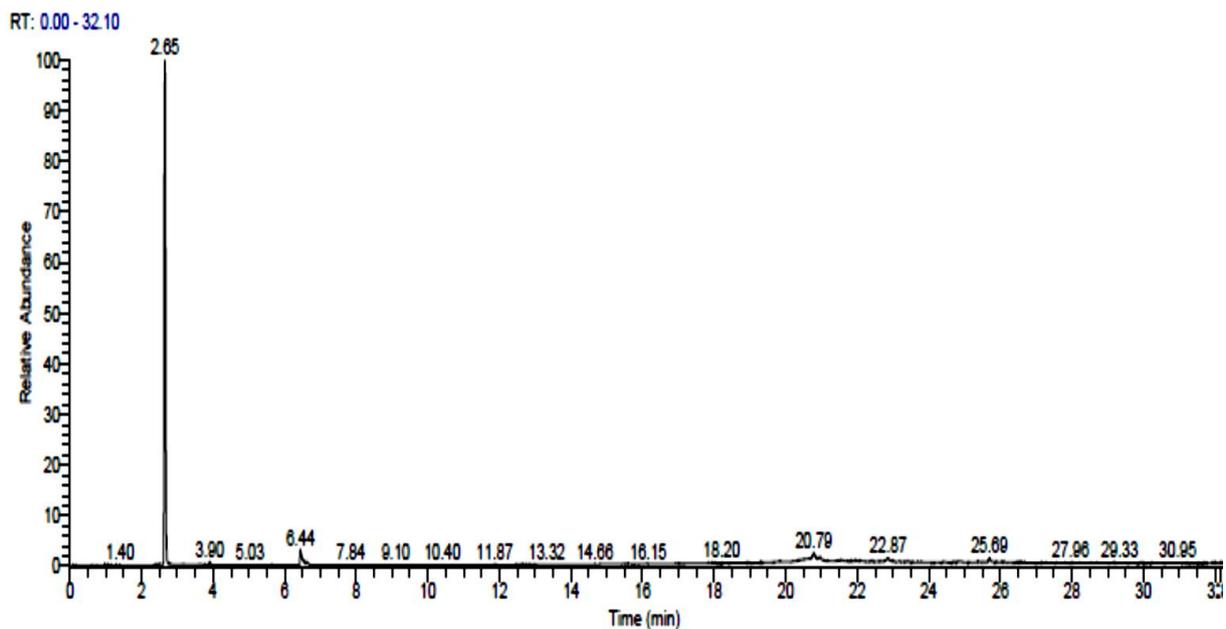
La valeur maximale de la production est obtenue avec un Brix de 27 °, un rendement en éthanol de 0,4 g / g et une consommation de sucre de 1,52 g / L / h. Le Rendement en glycérol est de 0,04 g / g.

Mayzuhroh et al, (2016) ont obtenu un rendement en éthanol de 0,378 g/g, en utilisant de la mélasse et une levure commerciale du genre *Saccharomyces*, ces résultats sont très proches à ceux que nous avons obtenus ce qui nous laisse à confirmer la performance de notre souche.

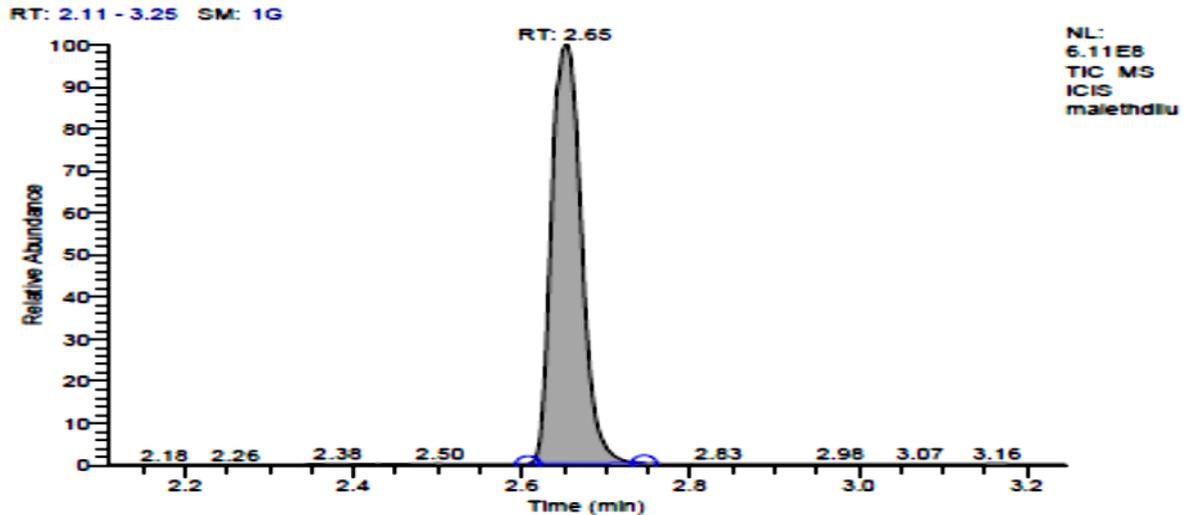
Ramos et al. (2013) ont évalué les performances fermentatives dans le jus de canne à sucre de 66 souches indigènes de *Saccharomyces cerevisiae* dans des conditions stressantes (température, osmolarité, tolérance aux sulfites et à l'éthanol) ; ils ont observé que les valeurs Y_p / s les plus élevées dans le jus de canne à sucre étaient comprises entre 0,43 et 0,46 obtenues pour quatre souches, soit légèrement plus que la valeur obtenue dans le présent travail, 0,4.

3.2.4.3. Analyse par GC MS du bioéthanol obtenu après distillation

Le bioéthanol produit a été identifié par spectrométrie de masse. Dans les conditions opératoires utilisées, l'éthanol est élué au bout de 2,65 min. Le chromatogramme est donné sur la figure (20 a). Le spectre de masse de l'éthanol est donné sur la figure (20 b).



(a)



(b)

Figure 20 : Spectre obtenu par GCMS du distillat du moût de fermentation.

3.2.4.4. Optimisation du rendement en bioalcool

L'étude bibliographique ainsi que nos résultats montrent que la conversion de la biomasse par voie biologique est influencée par plusieurs paramètres. Afin de réaliser un rendement maximal de bioalcool, nous avons mis en œuvre une planification d'expériences en vue d'identifier les effets des principaux facteurs pouvant affecter significativement ce rendement.

La méthodologie des surfaces de réponse (MSR) a été adoptée pour résoudre ce problème d'optimisation. A cet effet, un plan composite centré (PCC) a été mise en œuvre pour évaluer l'influence de deux variables indépendantes, le degré Brix (BRX), et la concentration en inoculum (INOC) sur le rendement en bioéthanol durant le processus de fermentation.

Le Tableau 15 montre la matrice d'expériences qui comporte 11 essais, dont 3 répétitifs au centre du domaine exploré servant à évaluer l'erreur expérimentale.

Cette méthodologie permet d'élaborer des modèles mathématiques traduisant la variation de la réponse (ici le rendement en alcool) en fonction des deux variables indépendantes mentionnées plus haut. Le tracé des surfaces de réponses permet alors de repérer les régions du domaine exploré pour ces deux variables qui assurent les meilleurs rendements.

Les résultats de nos essais, au nombre de 11, montrent que les valeurs prédites par le modèle sont proches des valeurs observées expérimentalement.

Le tableau 15 montre également les domaines explorés pour le degré Brix et le volume d'inoculum. Les valeurs enregistrées pour le rendement au cours des onze essais varient de 26,27 à 74,24 g/L.

Tableau 15 : matrice du plan de surface.

Run order	Coded levels		Real value		Ethanol concentration (g/l)	
	X1	X2	Brix degree	Volume inoculum (%)	Observed value	Predicted value
1	-1	-1	15	5	42.05	43.67
2	1	-1	25	5	71.87	74.24
3	-1	1	15	15	37.39	36.13
4	1	1	25	15	72.11	69.23
5	- α	0	12.93	10	26.27	26.25
6	+ α	0	27.07	10	74.24	73.05
7	0	- α	20	2.93	70.29	68.58
8	0	+α	20	17.07	52.07	57.91
9	0	0	20	10	64.77	63.25
10	0	0	20	10	66.27	63.25
11	0	0	20	10	64.04	63.25

3.2.4.5. Modélisation du rendement en bioalcool

a) Diagramme de Paréto

Les effets standardisés du degré brix et du volume de l'inoculum, ainsi que leurs interactions sur le rendement en bioéthanol sont donnés sur le diagramme de Paréto (Figure 21).

Au seuil de signification de 5% seuls les termes linéaires de BRX et INOC ainsi que le terme quadratique de INOC ont des effets significatifs sur le rendement en bioalcool.

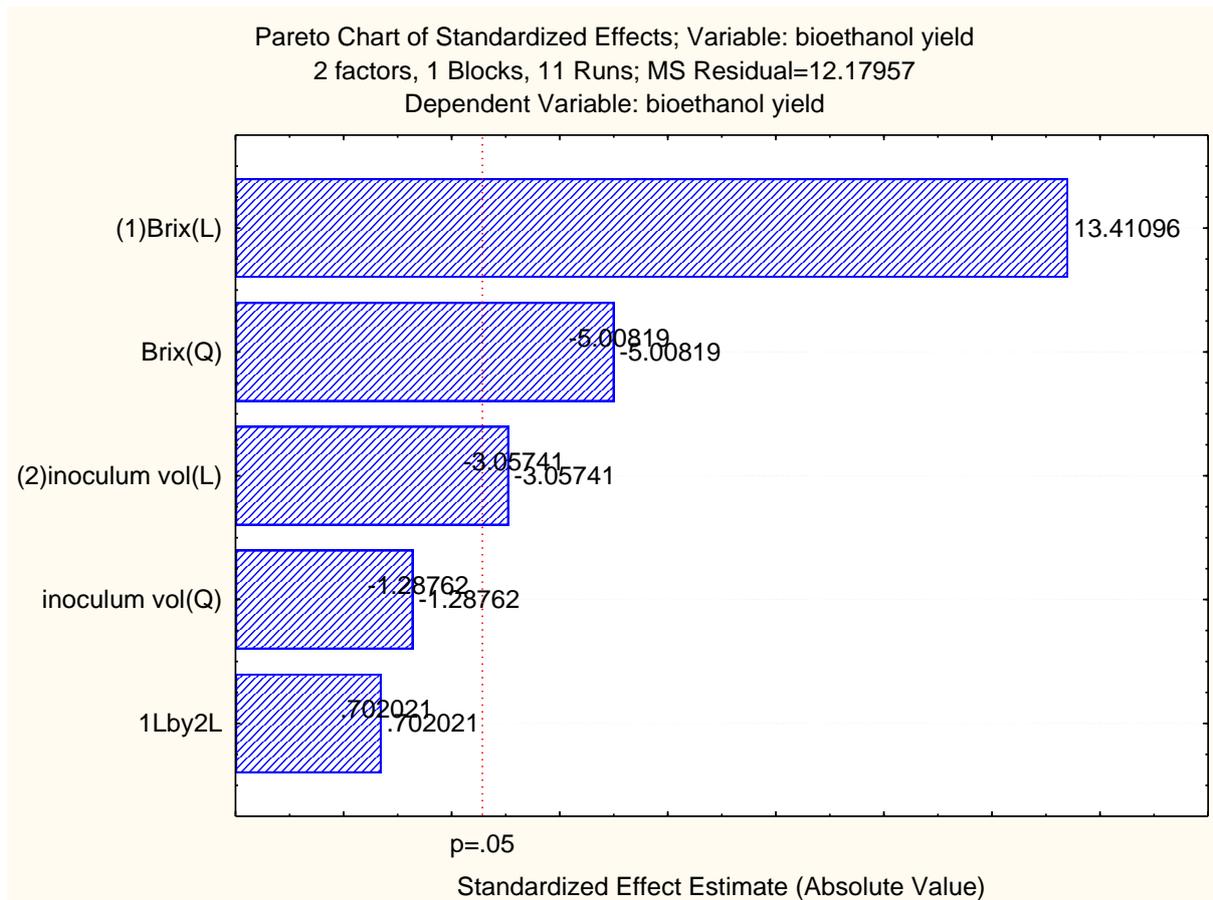


Figure 21 : graphique Pareto.

En excluant les termes non significatifs du modèle, le modèle de second ordre est le suivant :

$$\text{Rendement bioéthanol (g/l)} = 63.254 + 16.549 \text{ Brix} - 6.801 \text{ Brix}^2 - 3.773 \text{ Vol.}$$

Avec un coefficient de corrélation R^2 de 0,967, ce qui signifie que seulement 96,7% de la variation est expliquée par le modèle.

Il est à noter que pour un bon modèle statistique, la valeur R^2 devrait être plus près de 1.0 (Karuppaiya, 2010). Cependant, dans une étude réalisée par (Chauhan, 2004), le modèle est accepté avec une valeur minimale de R^2 égale à 0.75.

La qualité et la validité de ce modèle peuvent également être appréciées à l'aide de la courbe des valeurs prédites en fonction des valeurs observées (figure 22).

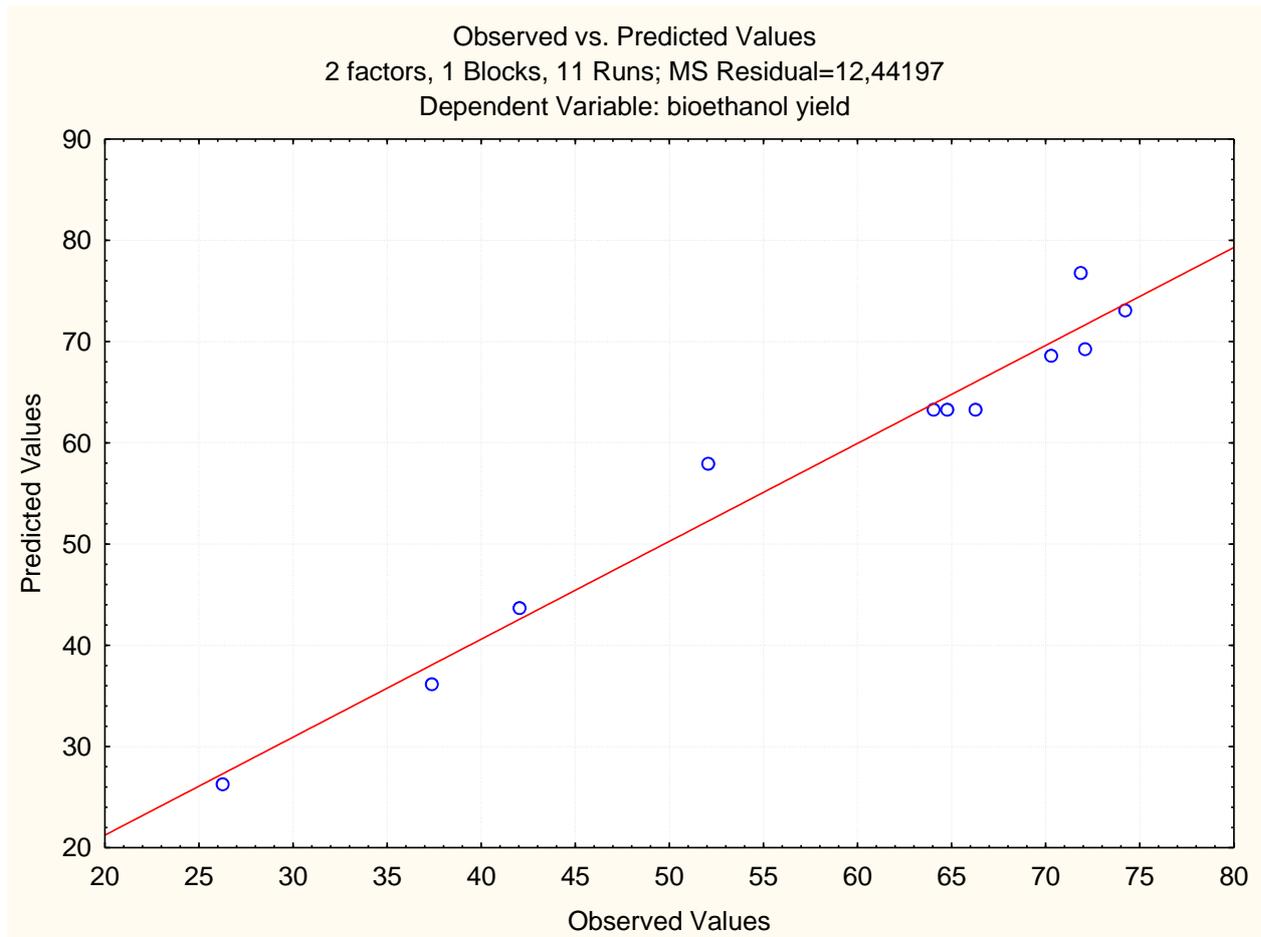


Figure 22 : Valeurs réelles et valeurs prédites.

D’après le modèle obtenu plus haut, on serait tenté de conclure que plus le degré de Brix est élevé, meilleur est le rendement en bioéthanol. Cependant, comme déjà mentionné ci-dessus, *Saccharomyces cerevisiae* ne peut tolérer des teneurs en sucre trop élevées et, sur la base de nos résultats, en utilisant une souche de mélasse de canne à sucre isolée localement, on ne peut que conclure que des valeurs de Brix allant jusqu’à 27 ° peuvent être avantageusement prises en compte pour optimiser le rendement en éthanol. Par ailleurs et concernant le volume de l’inoculum, le meilleur rendement en bioéthanol semble être un volume de 5%.

La surface de réponse pour le rendement en bioéthanol déduit à partir du modèle est donné à la Figure (22) , cela permet de mieux comprendre l’effet des paramètres étudiés sur la production de bioéthanol. Nous pouvons facilement voir que les rendements optimaux en bioéthanol sont obtenus dans le carré inférieur droit de la surface de réponse (entre 60 et 80 g/L environ), ce qui impliquerait de cibler des valeurs élevées en degré Brix (entre 1 et 2 en variable réduite correspondant à des degrés Brix allant de 25 à 27%) et de faibles valeurs en volume d’inoculum (entre -1 et 0 en variable réduite, soit en valeurs réelles de 5 à 10% vol.).

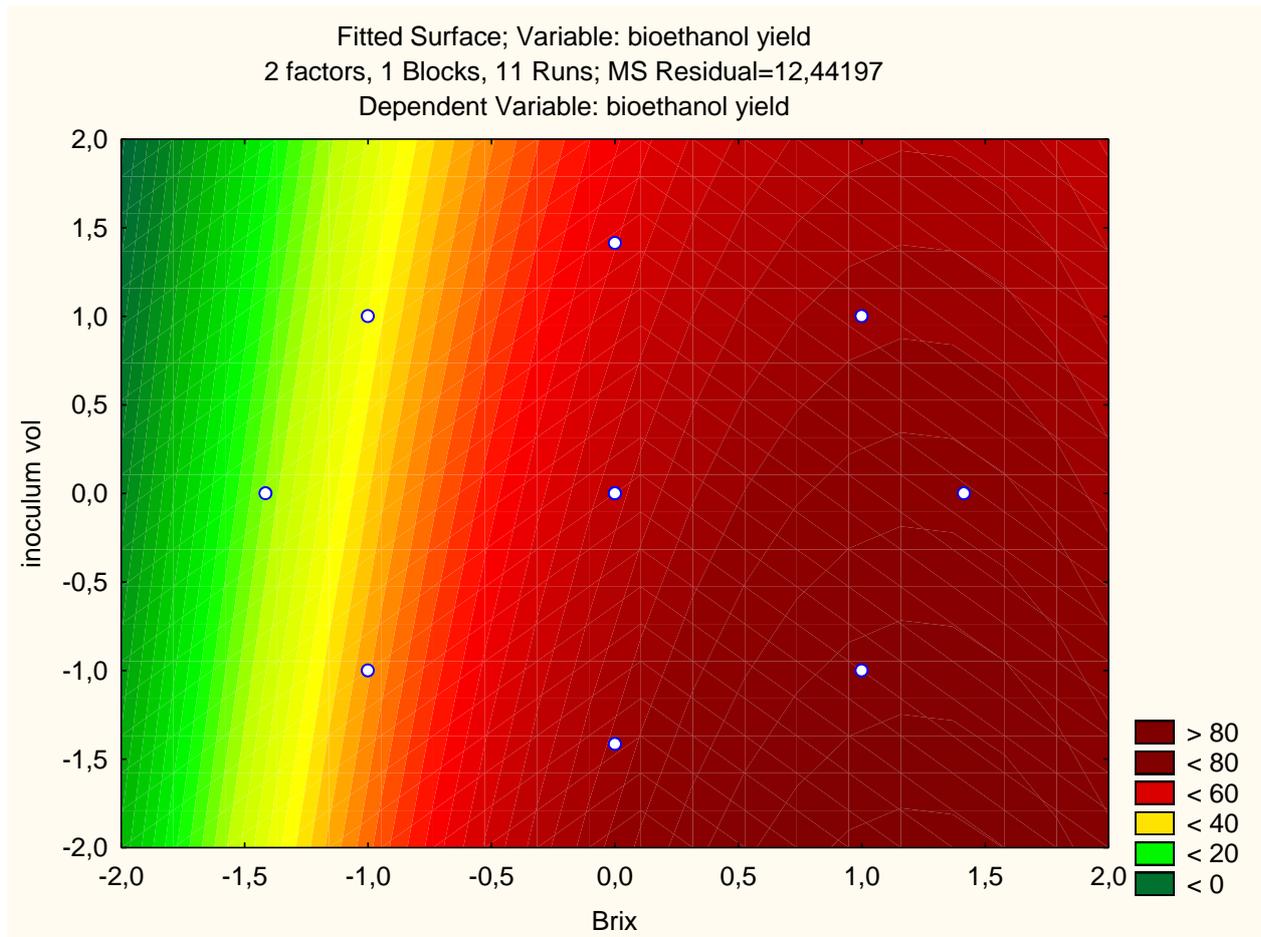


Figure 23 : Graphique de contour pour le rendement en bioéthanol prédit à partir du modèle.

Nous remarquons que plus de la moitié des essais ont conduit à des rendements situés dans cette fourchette optimale allant de 60 à 80 g/L, la valeur la plus élevée enregistrée (74.24 g/l) étant obtenue pour un degré Brix de 25° et un volume d'inoculum de 5 % vol.

Aussi, il est intéressant de comparer ces valeurs avec celles rapportées par d'autres chercheurs. Shaghaghi-Moghaddam et al (2019) ont obtenu une concentration maximale de bioéthanol (56,14 g/l) en utilisant et un milieu de 24,70 °Brix et un volume de l'inoculum 26,35%, et ce avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* SFO6. Des concentrations plus élevées du bioéthanol produit, en utilisant la levure de NCYC 4109, ont été obtenues avec un brix supérieur à 21 ° et un pourcentage d'inoculum supérieur à 25% (Shaghaghi-Moghaddam, 2019).

Ainsi, des volumes d'inoculum plus importants, de l'ordre de 25% ont été utilisés dans ces études, comparativement au volume beaucoup plus faible nécessaires pour nos conversions dans les conditions optimales.

La concentration initiale en sucre est un paramètre d'influence important car elle a un effet direct sur le taux de fermentation et le taux de croissance microbienne.

La relation entre la teneur en sucre initiale et le taux de fermentation est plutôt plus complexe (Zabed et al, 2014). Généralement, le taux de fermentation augmentera avec l'augmentation de la concentration en sucre jusqu'à un certain niveau. Compte tenu de ces faits, la concentration optimale en sucres dans la fermentation discontinue a été déterminée à 24 ° brix (Laopaiboon ,2007).

De même, le rapport optimal entre la concentration en sucres et en micro-organismes était de 200,0 g / L et de 30,0 g / L, respectivement, lors d'une étude portant sur la fermentation du jus de datte (Louhichi, 2013).

Par ailleurs, La concentration en inoculum n'a pas d'influence significative sur la concentration finale en éthanol mais affecte de manière significative le taux de consommation de sucre et la productivité de l'éthanol. Cependant, il a été rapporté que la production d'éthanol était augmentée avec l'augmentation du nombre de cellules initiales de 1×10^4 à 1×10^7 cellules / mL et qu'aucune différence significative dans la production d'éthanol n'avait été constatée entre 10^7 et 10^8 cellules / mL. Une concentration cellulaire accrue dans un certain intervalle réduit également considérablement le temps de fermentation en raison de la croissance rapide des cellules dans le milieu de fermentation qui consomme immédiatement les sucres nourris produisant de l'éthanol. Breisha (2010) a rapporté qu'une réduction du temps de fermentation de 72 h à 48 h avait été constatée en augmentant la concentration de levure de 3,0% à 6,0%.cellules / mL .

Selon l'étude de Fadel (2000), une production maximale d'alcool (12,9%) a été obtenue après inoculation avec une culture à 10% de *S. cerevisiae*. Afifi et al. (2011) ont également produit une quantité maximale d'éthanol à partir de déchets de pommes de terre solides industriels après inoculation avec un volume d'inoculum de 10% (v / w) de *S. cerevisiae*.

Neelakandan et Usharan (2009) ont étudié différentes tailles d'inoculum (2, 4, 6, 8 et 10% v / v) pendant une période de 24 h et ont observé que la concentration maximale en éthanol de 8,8% était obtenue à 10% d'inoculum. En comparant ces résultats, Izmirlioglu et Demirci (2012) ont montré qu'une taille d'inoculum de 3% était optimale pour une concentration et une vitesse de production maximales d'éthanol. Turhan et al. (2010) ont rapporté la production d'éthanol à partir d'extrait de caroube en utilisant *S. cerevisiae* et ont constaté cette concentration maximale en éthanol ; La productivité en éthanol et le rendement en éthanol étaient respectivement de 42,90 g / L, 3,7 g / L / h et 45,0%, obtenus avec un inoculum initial de 3%.

Le rendement maximum apparaît sur une concentration initiale en substrat de 70-85 g / L et une taille d'inoculum comprise entre 1,8 et 2,3% . Le taux de production d'éthanol est lié à la concentration en sucre disponible. À très basse concentration en substrat, la levure manque de nutriment et sa productivité diminue (Hayder, 2018).

Conclusion générale

L'épuisement inévitable des réserves de combustibles fossiles pose la question de savoir comment satisfaire la demande toujours croissante de carburant dans le moyen et le long terme. En outre, la combustion de combustibles fossiles génère du dioxyde de carbone, l'un des principaux gaz à effet de serre provoquant le réchauffement climatique. Ces problèmes ont été les principales préoccupations au cours des dernières décennies, en soulignant la nécessité de trouver d'autres sources alternatives plus respectueuses de l'environnement. Le bioéthanol issu de matières premières renouvelables peut constituer, en partie du moins, une alternative durable.

Dans notre étude, nous avons ciblé quelques substrats à fort potentiel en sucres. Afin de convertir ces sucres en bioéthanol par le procédé de fermentation.

Nous avons procédé à la sélection de souches de levures isolées à partir de la mélasse de canne à sucre, datte et figue. Trois souches de levures ont été sélectionnées (S1, S2 et S3). L'identification biochimique et moléculaire de ces souches a révélé qu'il s'agit de *Saccharomyces cerevisiae* que l'on retrouve à l'état naturel principalement sur les fruits et sur la grande majorité des écorces d'arbres.

Une fois identifiées, ces souches ont été utilisées pour la production du bioéthanol en utilisant différentes sources de carbone. Une souche de référence a été utilisée pour évaluer l'efficacité des souches isolées.

Nous avons choisis en premier lieu, le milieu synthétique d'algue verte après dégradation, étant donné que c'est un substrat qui a un potentiel prometteur pour la production du bioéthanol, en effet au CDER ainsi que dans d'autres laboratoires tel que celui de l'Ecole des Métiers de l'Environnement, Bruz, France, la production du bioéthanol à partir d'algue se concentre sur l'amélioration du rendement en bioéthanol en utilisant des micro-organismes capables de convertir tous les sucres présents. En deuxième temps nous avons utilisé un substrat naturel tel que la mélasse de canne à sucre, un coproduit issu du raffinage de sucre (CEVITAL), pour des fermentations.

Au cours de la fermentation du milieu synthétique d'algue verte, il a été observé que les souches S2 et S3, ont une production d'éthanol élevée (3,8 et 3,9 g.L⁻¹ respectivement) par rapport à celle de S1 et de la souche de référence (2,2 et 2,1 respectivement).

Les résultats enregistrés indiquent des efficacités de la fermentation de 32% ,52% et 58% pour les souches S1, S2 et S3 respectivement.

La co-culture S2S3 a permis d'améliorer à la fois le rendement en éthanol et l'efficacité de la fermentation par rapport à la fermentation en monoculture. Ainsi, les rendements en éthanol étaient de 0,35 g.g⁻¹ pour la co-culture et de 0,27 et 0,29 g.g⁻¹ pour les cultures pures de S2 et S3, respectivement. En ce qui concerne l'efficacité, elle est passée de 52 et 59% pour S2 et S3 respectivement dans la monoculture à 68% pour la co-culture de S2 et S3.

Ces résultats sont prometteurs, et nous encourage à continuer de travailler sur les biocarburants produits à partir des algues.

Le présent travail a montré aussi, que la conversion de la mélasse de canne à sucre pour la production du bioéthanol, par le biais de la fermentation alcoolique en utilisant des souches isolées localement, est non seulement possible, mais particulièrement prometteuse .

La méthodologie de surface de réponse a été utilisée pour étudier l'influence de différentes variables telles que la concentration en sucre total (15-25) (degré brix) et le volume d'inoculum (%) (5-15) sur le rendement en bioéthanol.

Seule la concentration en sucre, dans le modèle de régression, a un effet significatif sur la concentration en éthanol. Les rendements maximaux prévus et réels du bioéthanol sont respectivement de 74,24 et 72,85 g / L. Les paramètres cinétiques de croissance et de production de bioéthanol sont obtenus à un degré Brix de 27 °, avec un rendement en éthanol (0,38 g / g), un taux de consommation de sucre de 1,52 g / l / h et un rendement maximal en production de glycérol (0,04 g / g).

Pour conclure, cette étude a permis d'explorer quelques possibilités amenant à la production d'éthanol.

A la lumière de ces résultats, certaines perspectives pourraient être entrevues :

Des études économiques précises sont indispensables afin d'évaluer le coût de production et les retombées bénéfiques de la valorisation des déchets de l'industrie du raffinage du sucre par voie biotechnologique pour la production de bioéthanol.

Une analyse cycle de vie (ACV) serait intéressante pour évaluer le procédé dans sa globalité en termes d'impacts environnementaux notamment.

Références bibliographiques

Références

- Abdel Nasser A.**, El-Moghaz (2010) Comparative Study of Salt Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* Yeast Strains. *Advances in BioResearch*. 1 (1), 169-176.
- Abubaker, H. O.**, Sulieman, A. M. E., & Elamin, H. B. (2012). Utilization of *Schizosaccharomyces pombe* for Production of ethanol from Cane Molasses. *Journal of Microbiology Research*, 2, 36-40.
- Adams, J. M.**, Gallagher, J. A., & Donnison, I. S. (2009). Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *Journal of applied Phycology*, 21(5), 569.
- Aguilera, J.**, Van Dijken, J. P., De Winde, J. H., & Pronk, J. T. (2005). Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. *Biochemical Journal*, 391(2), 311-316.
- Alalwan, H. A.**, Alminshid, A. H., & Aljaafari, H. A. (2019). Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable Energy Focus*, 28, 127-139.
- Aldiguier, A. S.**, Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribelarrea, J. L., Guillouet, S. E., & Molina-Jouve, C. (2004). Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and biosystems engineering*, 26(4), 217-222
- Alfenore, S.**, Molina-Jouve, C., Guillouet, S., Uribelarrea, J. L., Goma, G., & Benbadis, L. (2002). Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(1-2), 67-72.
- Andreishcheva, E. N.**, & Zviagil'skaia, R. A. (1999). Adaptation of yeasts to salt stress (review). *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 35(3), 243-256.
- Anonyme.** (2017). RFA analysis of public and private data sources.
- Anonyme.** (2016). Crop energy .com <https://afdc.energy.gov/data/>.
- Aro, E. M.** (2016). From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*, 45(1), 24-31.
- Arora, R.**, Behera, S., Sharma, N. K., & Kumar, S. (2017). Augmentation of ethanol production through statistically designed growth and fermentation medium using novel thermotolerant yeast isolates. *Renewable energy*, 109, 406-421.
- Attfield, P. V.** (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature biotechnology*, 15(13), 1351.
- Babu, M. P.**, & Ilyas, M. M. (2017). SCP production from *Saccharomyces cerevisiae* isolated from mangrove sediment. *International Journal Advanced Multidisciplinary Research*, 4, 1-10.
- Bai, F. W.**, Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances*, 26(1), 89-105.
- Balat, M.** (2007). Global bio-fuel processing and production trends. *Energy Exploration & Exploitation*, 25(3), 195-218.
- Ballerini, D.** (2006). Les biocarburants: état des lieux. *Perspectives et Enjeux du Développement*.
- Barchmann, H. B.** (2012). Le potentiel de la biomasse dans les pays méditerranéens. *Source* :[http://www.paufm.org/assembly/ Docs/ recommandations/Rabat2012/ ENERGY_FR](http://www.paufm.org/assembly/Docs/recommendations/Rabat2012/ENERGY_FR).
- Batista, A. S.**, Miletti, L. C., & Stambuk, B. U. (2004). Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 8(1), 26-33.

- Beney, L.**, de Marañón, I. M., Marechal, P. A., Moundanga, S., & Gervais, P. (2001). Osmotic destruction of *Saccharomyces cerevisiae* is not related to a high water flow rate across the membrane. *Biochemical engineering journal*, 9(3), 205-210.
- Benoumhani, S.**, Dokkar, B., Chennouf, N., & Drid, M. M. (2020). Bioethanol from olive residues: prospects for a large scale production in the south of Algeria. *International Journal of Psychosocial Rehabilitation*, 24(4).
- Bento, A. M.**, Kanbur, R., & Leard, B. (2012). Super-additionality: A neglected force in markets for carbon offsets.
- Berthels, N. J.**, Otero, R. R. C., Bauer, F. F., Pretorius, I. S., & Thevelein, J. M. (2008). Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(5), 1083-1091.
- Bideaux, C.**, Alfenore, S., Cameleyre, X., Molina-Jouve, C., Uribelarrea, J. L., & Guillouet, S. E. (2006). Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction tool. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3), 2134-2140.
- Birch, R. M.**, & Walker, G. M. (2000). Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*, 26(9-10), 678-687.
- Blättel, V.**, Petri, A., Rabenstein, A., Kuever, J., & König, H. (2013). Differentiation of species of the genus *Saccharomyces* using biomolecular fingerprinting methods. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(10), 4597-4606.
- Blomberg, ANDERS.**, & Adler, LENNART. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 171(2), 1087-1092.
- Blomberg, A.**, & Adler, L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 33, pp. 145-212). Academic Press.
- Botton, B.** (1991). La physiologie des levures. *Biotechnologie des levures," Masson, JP Larpent.*
- Boudjema, K., Fazouane-Naimi, F., & Hellal, A. (2015) Optimization of the bioethanol production on sweet cheese whey by *Saccharomyces cerevisiae* DIV13-Z087C0VS using response surface methodology (RSM). *Biotech. Lett*, 20, 10814-10825.
- Boudjema, K.**, Fazouane-naimi, F., & Hellal, A. (2016). Isolation, identification of yeast strains producing bioethanol and improvement of bioethanol production on cheese whey/Biyoetanol üreten maya türlerinin izolasyonu, tanılması ve peynir altı suyunda biyoetanol üretiminin sağliılaştırılması. *Turkish Journal of Biochemistry*, 41(3), 157-166.
- Bourat, G.** (1992). Fermentations Propriétés des micro-organismes. *Techniques de l'ingénieur. Bioprocédés*, (J6002).
- Breisha, G. Z.** (2010). Production of 16% ethanol from 35% sucrose. *Biomass and bioenergy*, 34(8), 1243-1249.
- Brooks, A. A.** (2008). Ethanol production potential of local yeast strains isolated from ripe banana peels. *African journal of Biotechnology*, 7(20).
- Bruinenberg, P. M.**, Jonker, R., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1985). Utilization of formate as an additional energy source by glucose-limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS 621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. *Archives of microbiology*, 142(3), 302-306.
- Bubnová, M.**, Zemančíková, J., & Sychrová, H. (2014). Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses. *Yeast*, 31(8), 309-321.
- Caldwell, D.** (1998). Molasses in feeds. *Advances In Equine Nutrition II, 2000.*

- Chaabane, F. B.**, Aldigui, A. S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Blanc, P., Bideaux, C., ... & Molina-Jouve, C. (2006). Very high ethanol productivity in an innovative continuous two-stage bioreactor with cell recycle. *Bioprocess and biosystems engineering*, 29(1), 49-57.
- Chandrasena, G.**, Keerthipala, A. P., & Walker, G. M. (2006). Isolation and characterisation of Sri Lankan yeast germplasm and its evaluation for alcohol production. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(4), 302-307.
- Chauhan, B.**, & Gupta, R. (2004). Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochemistry*, 39(12), 2115-2122.
- Chauvel, A.**, & Castex, L. (1985). *Procédés de pétrochimie* (Vol. 19). Editions Technip.
- Chen, J. C.**, & Chou, C. C. (2003). *Cane sugar handbook: a manual for cane sugar manufacturers and their chemists*. John Wiley & Sons.
- Chen, X.**, Kuhn, E., Jennings, E. W., Nelson, R., Tao, L., Zhang, M., & Tucker, M. P. (2016). DMR (deacetylation and mechanical refining) processing of corn stover achieves high monomeric sugar concentrations (230 g L⁻¹) during enzymatic hydrolysis and high ethanol concentrations (> 10% v/v) during fermentation without hydrolysate purification or concentration. *Energy & Environmental Science*, 9(4), 1237-1245.
- Chi, Z.**, & Arneborg, N. (1999). Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 1047-1052.
- Chisti, Y.** (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
- Chniti, S.**, Jemni, M., & Am, A. (2015). Effect of the Nitrogen Source o from Syrup Dates by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, Volume 4, Issue 3.
- Chniti, S.**, Djelal, H., Hassouna, M., & Amrane, A. (2014). Residue of dates from the food industry as a new cheap feedstock for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 69, 66-70.
- Choi, W. Y.**, Han, J. G., Lee, C. G., Song, C. H., Kim, J. S., Seo, Y. C., ... & Cho, J. S. (2012). Bioethanol production from *Ulva pertusa* Kjellman by high-temperature liquefaction. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 26(1), 15-21.
- Cot, M.**, Loret, M. O., François, J., & Benbadis, L. (2007). Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS yeast research*, 7(1), 22-32.
- Da Silva GP**, (2005). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource technology*, 98(17), 3367-3374.
- Dakal, T. C.**, Solieri, L., & Giudici, P. (2014). Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 140-157.
- D'Amore, T.** (1992). Cambridge prize lecture improving yeast fermentation performance. *Journal of the Institute of Brewing*, 98(5), 375-382.
- D'amore, T.**, Panchal, C. J., Russell, I., & Stewart, G. G. (1989). A study of ethanol tolerance in yeast. *Critical reviews in biotechnology*, 9(4), 287-304.
- Dash, P. K.**, Jyoti, M., Patnaik, S. C., Swain, M. R., & Thatoi, H. N. (2015). Characterization, identification and comparative evaluation of bioethanol tolerance and production capacity of isolated yeast strains from fermented date palm sap (toddy). *Malaysian Journal of Microbiology*, 11(3), 223-230.

- Dayma, G.**, Ali, K. H., & Dagaut, P. (2007). Experimental and detailed kinetic modeling study of the high pressure oxidation of methanol sensitized by nitric oxide and nitrogen dioxide. *Proceedings of the Combustion Institute*, 31(1), 411-418.
- De Vasconcelos, J. N.**, Lopes, C. E., & De Franca, F. P. (2004). Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(3), 357-365.
- Déaut, M. J.-Y.** (2015). Rapport sur de la biomasse à la bioéconomie. *L'office parlementaire d'évaluation*.
- Delarras, C.** (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
- Dhar, R.**, Sägesser, R., Weikert, C., Yuan, J., & Wagner, A. (2011). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to saline stress through laboratory evolution. *Journal of evolutionary biology*, 24(5), 1135-1153
- Didderen, I.**, Destain, J., & Thonart, P. (2008). *Le bioéthanol de seconde génération : la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique*. Presses agronomiques de Gembloux.
- Djelal, H.**, Larher, F., Martin, G., & Amrane, A. (2012). Impact of an osmotic stress on the intracellular volume of *Hansenula anomala*. *Annals of microbiology*, 62(4), 1345-1351.
- Djelal, H.**, Amrane, A., Lahrer, F., & Martin, G. (2005). Effect of medium osmolarity on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing on glucose and ammonium. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(3), 341-349.
- Djelal, H.**, Chniti, S., Jemni, M., Weill, A., Sayed, W., & Amrane, A. (2017). Identification of strain isolated from dates (*Phoenix dactylifera* L.) for enhancing very high gravity ethanol production. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(11), 9886-9894.
- Djelal, H.**, Larher, F., Martin, G., & Amrane, A. (2006). Effect of the dissolved oxygen on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing under salt stress conditions. *Journal of biotechnology*, 125(1), 95-103.
- Dufour, A.**, Celzard, A., Fierro, V., Martin, E., Broust, F., & Zoulalian, A. (2008). Catalytic decomposition of methane over a wood char concurrently activated by a pyrolysis gas. *Applied Catalysis A: General*, 346(1-2), 164-173.
- Duhan, J. S.**, Kumar, A., & Tanwar, S. K. (2013). Bioethanol production from starchy part of tuberous plant (potato) using *Saccharomyces cerevisiae* MTCC-170. *Afr J Microbiol Res*, 7(46), 5253-5260.
- Easterly, J.**, Faaij, A., Flavin, C., Freimuth, L., Fritsche, U., & Laser, M. (2007). Biofuel for transport, worldwatch institute.
- Eisentraut, A.** (2010). Sustainable production of second-generation biofuels.
- El-Araby, R.**, Amin, A., El Morsi, A. K., El-Ibiari, N. N., & El-Diwani, G. I. (2018). Study on the characteristics of palm oil–biodiesel–diesel fuel blend. *Egyptian Journal of Petroleum*, 27(2), 187-194.
- El-Gendy, N. S.**, Madian, H. R., & Amr, S. S. A. (2013). Design and optimization of a process for sugarcane molasses fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *International journal of microbiology*, 2013.
- Estruch, F.** (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 469-486.
- Fadel, M.** (2002). Alcohol production from potato industry starchy waste. *Egyptian Journal of Microbiology (Egypt)*.
- Fadel, M.**, Keera, A. A., Mouafi, F. E., & Kahil, T. (2013). High level ethanol from sugar cane molasses by a new thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain in industrial scale. *Biotechnology research international*, 2013.

- Fennouche, I.**, Khellaf, N., Djelal, H., & Amrane, A. (2019). An effective acid pretreatment of agricultural biomass residues for the production of second-generation bioethanol. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1460.
- Ferreira, B. S.**, Calado, C. R., van Keulen, F., Fonseca, L. P., Cabral, J. M., & da Fonseca, M. M. (2004). Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain triggers acetate production to fuel biosynthetic pathways. *Journal of biotechnology*, 109(1-2), 159-167.
- Ferreira, M. V.**, AVILA, T. L. D., Kuhn, C. R., Toralles, R. P., & Rombaldi, C. V. (2016). Identifying yeast isolated from spoiled peach puree and assessment of its batch culture for invertase production. *Food Science and Technology*, 36(4), 701-708.
- Fugelsang, K. C.** (2006). Wine microbiology: practical applications and procedures. *Springer Science & Business Media*.
- Galafassi, S.**, Toscano, M., Vigentini, I., Piškur, J., & Compagno, C. (2013). Osmotic stress response in the wine yeast *Dekkera bruxellensis*. *Food microbiology*, 36(2), 316-319
- Gancedo, J. M.** (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology* 62(2), 334-361.
- Ghaleb, E.** (2011). Biorefinery of industrial potato wastes to ethanol by solid state fermentation. *Research journal of agriculture and biological sciences Res. J. Agric. Biol. Sci*, 7, 126-134.
- Giannattasio, S.**, Guaragnella, N., Corte-Real, M., Passarella, S., & Marra, E. (2005). Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene*, 354, 93-98.
- Gomez, L. D.**, Steele-King, C. G., & McQueen-Mason, S. J. (2008). Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytologist*, 178(3), 473-485.
- Gonçalves, F. A.**, Ruiz, H. A., dos Santos, E. S., Teixeira, J. A., & de Macedo, G. R. (2016). Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept. *Renewable energy*, 94, 353-365.
- Gostinčar, C.**, Turk, M., Trbuha, T., Vaupotič, T., Plemenitaš, A., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Expression of fatty-acid-modifying enzymes in the halotolerant black yeast *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud under salt stress. *Studies in Mycology*, 61, 51-59.
- Gourlay, C. W.**, Du, W., & Ayscough, K. R. (2006). Apoptosis in yeast—mechanisms and benefits to a unicellular organism. *Molecular microbiology*, 62(6), 1515-1521.
- Guillouet, S.**, & Engasser, J. M. (1995). Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(2), 315-320.
- Guiraud, J. P.** (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod/RIA, Paris, France.
- Guiraud, J. P.**, & Rosec, J. P. (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. AFNOR.
- Gunasekaran, P.**, & Raj, K. C. (1999). Ethanol fermentation technology—*Zymomonas mobilis*. *Current Science*, 56-68.
- Haddoum, S.**, Bennour, H., & Ahmed Zaïd, T. (2018). Algerian Energy Policy: Perspectives, Barriers, and Missed Opportunities. *Global Challenges*, 2(8), 1700134.
- Hamouda, H. I.**, Nassar, H. N., Madian, H. R., El-Sayed, M. H., El-Ghamry, A. A., & El-Gendy, N. S. (2016). Isolation of fermentative microbial isolates from sugar cane and beet molasses and evaluation

for enhanced production of bioethanol. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 38(15), 2170-2180.

Haque, S. M., Bhat, A. H., & Khan, I. (2015). Biomass: An ageless raw material for biofuels. In *Agricultural Biomass Based Potential Materials* (pp. 435-454). Springer, Cham.

Harun, R., Danquah, M. K., & Forde, G. M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(2), 199-203.

Hayder, N. H., Flayeh, H. M., & Ahmed, A. W. (2018). Optimization of Bioethanol Production from Biodegradable Municipal Solid Waste using Response Surface Methodology (RSM). *Journal of Engineering and Sustainable Development*, 22(1), 47-64.

Hirasawa, T., Yoshikawa, K., Nakakura, Y., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., ... & Shioya, S. (2007). Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *Journal of biotechnology*, 131(1), 34-44.

Ho, D. P., Ngo, H. H., & Guo, W. (2014). A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresource technology*, 169, 742-749.

Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(2), 300-372.

Hamon M., Pellerin F., Guenet M. et Maauzier G. (1990). Abrégés chimie analytique. Méthodes spectrales et analyse organique. Tome 3. 2eme édition. Masson. Paris. p: 232-233.

Horn, S. J., Aasen, I. M., & Østgaard, K. (2000). Ethanol production from seaweed extract. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(5), 249-254.

Ikram-ul-Haq, A. R., Ashraf, H., & Shah, A. H. (2002). Isolation and screening of fungi for the biosynthesis of alpha amylase. *Biotechnology*, 2, 61-66.

Izmirlioglu, G., & Demirci, A. (2012). Ethanol production from waste potato mash by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sciences*, 2(4), 738-753.

Jeihanipour, A., & Taherzadeh, M. J. (2009). Ethanol production from cotton-based waste textiles. *Bioresource technology*, 100(2), 1007-1010.

Jiménez-Martí, E., Zuzuarregui, A., Gomar-Alba, M., Gutiérrez, D., Gil, C., & Del Olmo, M. (2011). Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions. *International journal of food microbiology*, 145(1), 211-220.

Jones, H. L., Margaritis, A., & Stewart, R. J. (2007). The combined effects of oxygen supply strategy, inoculum size and temperature profile on very-high-gravity beer fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 113(2), 168-184.

Jones, R. P., Pamment, N., & Greenfield, P. F. (1981). Alcohol fermentation by yeasts--the effect of environmental and other variables. *Process biochemistry*, 16(3), 42-49.

Kalyani, D., Lee, K. M., Kim, T. S., Li, J., Dhiman, S. S., Kang, Y. C., & Lee, J. K. (2013). Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation. *Fuel*, 107, 815-822.

Karuppaiya, M., Sasikumar, E., Viruthagiri, T., & Vijayagopal, V. (2010). Optimization of process variables using response surface methodology (RSM) for ethanol production from cashew apple juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3(4), 462-473.

Keim, C. R. (1983). Technology and economics of fermentation alcohol—an update. *Enzyme and Microbial Technology*, 5(2), 103-114.

Kitagaki, H., Araki, Y., Funato, K., & Shimoi, H. (2007). Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS letters*, 581(16), 2935-2942.

- Klis, F. M.**, Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 26(3), 239-256.
- Knauf, M.**, & Kraus, K. (2006). Specific yeasts developed for modern ethanol production. *Sugar Industry/Zuckerindustrie*, 131(11), 753-758.
- Knorre, D. A.**, Smirnova, E. A., & Severin, F. F. (2005). Natural conditions inducing programmed cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 264-266.
- Kumar, S.**, Singh, N., & Prasad, R. (2010). Anhydrous ethanol: A renewable source of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 1830-1844.
- Kundiyan, D. K.**, Bellmer, D. D., Huhnke, R. L., Wilkins, M. R., & Claypool, P. L. (2010). Influence of temperature, pH and yeast on in-field production of ethanol from unsterilized sweet sorghum juice. *Biomass and bioenergy*, 34(10), 1481-1486.
- Kurtzman, C.**, Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Laopaiboon, L.**, Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., & Laopaiboon, P. (2009). Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource technology*, 100(18), 4176-4182.
- Laopaiboon, L.**, Thanonkeo, P., Jaisil, P., & Laopaiboon, P. (2007). Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(10), 1497-1501.
- Lee, S.**, Oh, Y., Kim, D., Kwon, D., Lee, C., & Lee, J. (2011). Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic *Escherichia coli* strains. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(6), 878-888.
- Lee, Y. J.**, Choi, Y. R., Lee, S. Y., Park, J. T., Shim, J. H., Park, K. H., & Kim, J. W. (2011). Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. *Mycobiology*, 39(1), 33-39.
- Lei, F.**, Rotbøll, M., & Jørgensen, S. B. (2001). A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*, 88(3), 205-221.
- Leveau, J. Y.**, & Bouix, M. (1979). Etude des conditions extremes de croissance des levures osmophiles. *Industries alimentaires et agricoles*.
- Levenspiel, O.** (1980). The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnology and bioengineering*, 22(8), 1671-1687.
- Li, B. Z.**, Balan, V., Yuan, Y. J., & Dale, B. E. (2010). Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. *Bioresource technology*, 101(4), 1285-1292.
- Li, Y. R.**, Tsai, W. T., Hsu, Y. C., Xie, M. Z., & Chen, J. J. (2014). Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. *Energy Procedia*, 52, 371-376.
- Licht, F. O.** (2015). World Ethanol Markets. *A special Study, The Outlook to*.
- Limtong, S.**, Sringiew, C., & Yongmanitchai, W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource technology*, 98(17), 3367-3374.
- Ljungdahl, P. O.**, & Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(3), 885-929.
- Longobardi, G. P.** (1994). Fed-batch versus batch fermentation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 5(10), 185-194.
- Louhichi, B.**, Belgaib, J., & Hajji, N. (2013). Production of bio-ethanol from three varieties of dates. *Renewable energy*, 51, 170-174.

- Madigan, M. T.**, & Martinko, J. (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th edn.
- Mager, W. H.**, & Siderius, M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS yeast research*, 2(3), 251-257.
- Mansouri, A.**, Rihani, R., & Bentahar, F. (2019). Étude de la production de bioéthanol biocarburant à partir de sous-produits agricoles: Effet de l'aération. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, 5(3)
- Marechal, P. A.**, de Marnañón, I. M., Poirier, I., & Gervais, P. (1999). The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 10(1), 15-20.
- Martini, S.**, Ricci, M., Bonechi, C., Trabalzini, L., Santucci, A., & Rossi, C. (2004). In vivo ¹³C-NMR and modelling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 564(1-2), 63-68.
- Martin-Yken, H.**, Dagkessamanskaia, A., Talibi, D., & Francois, J. (2002). KNR4 is a member of the PKC1 signalling pathway and genetically interacts with BCK2, a gene involved in cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 41(5), 323-332.
- Mayzuhroh, A.**, Arindhani, S., & Caroenchai, C. (2016). Studies on bioethanol production of commercial baker's and alcohol yeast under aerated culture using sugarcane molasses as the media. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 493-499.
- McKendry, P.** (2002). Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource technology*, 83(1), 37-46.
- Mehani, Insaf,** and Bachir Bouchekima (2018). Bioethanol production from renewable sources as alternative valorization of waste of starting dates in south Algeria. . *AIP Conference Proceedings (Vol. 1968, No. 1, p. 030023)*. AIP Publishing LLC.
- Mehdikhani, P.**, Bari, M. R., & Hovsepyan, H. (2011). Screening of *Saccharomyces cerevisiae* for high tolerance of ethanol concentration and temperature. *African Journal of Microbiology Research*, 5(18), 2654-2660.
- Michnick, S.**, Roustan, J. L., Remize, F., Barre, P., & Dequin, S. (1997). Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*, 13(9), 783-793.
- Mishra, B. K.**, Hati, S., Brahma, J., Patel, M., & Das, S. (2018). Identification and Characterization of Yeast Strains Associated With the Fermented Rice Beverages of Garo Hills, Meghalaya, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(2), 3079-3090.
- Mobini-Dehkordi, M.**, Nahvi, I., Ghaedi, K., & Tavassoli, M. (2007). Isolation of high ethanol resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Research in pharmaceutical sciences*, 1(2), 85-91.
- Moothoo-Padayachie, A.**, Kandappa, H. R., Krishna, S. B. N., Maier, T., & Govender, P. (2013). Biotyping *Saccharomyces cerevisiae* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Food Research and Technology*, 236(2), 351-364.
- Muruaga, M. L.**, Carvalho, K. G., Domínguez, J. M., de Souza Oliveira, R. P., & Perotti, N. (2016). Isolation and characterization of *Saccharomyces* species for bioethanol production from sugarcane molasses: Studies of scale up in bioreactor. *Renewable energy*, 85, 649-656.
- Mussnug, J. H.**, Klassen, V., Schlüter, A., & Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of biotechnology*, 150(1), 51-56.

- Nasir, A.**, Rahman, S. S., Hossain, M. M., & Choudhury, N. (2017). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from pineapple and orange and study of metal's effectiveness on ethanol production. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 7(1), 76-91.
- Neelakandan, T.**, & Usharani, G. (2009). Optimization and production of bioethanol from cashew apple juice using immobilized yeast cells by *Saccharomyces cerevisiae*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 4(2), 85-88.
- Negi, B.**, Sharma, P., Kashyap, S., Seth, S., & Dey, G. (2013). Screening of yeast strains for vinification of fruits from cold desert regions of North West India. *International Food Research Journal*, 20(2), 975.
- Neves, M. A. D.**, Kimura, T., Shimizu, N., & Shiiba, K. (2006). Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(3), 481-490.
- Nielsen, J.**, Villadsen, J., & Lidén, G. (2003). Scale-up of bioprocesses. In *Bioreaction Engineering Principles* (pp. 477-518). Springer, Boston, MA.
- Nogueira, I.** (2008). Bioetanol de cana-de-açúcar. *Energia para o desenvolvimento sustentável. Organização BNDS e CGEE, Rio de Janeiro*.
- Nwachukwu, I. N.**, Ibekwe, V. I., Nwabueze, R. N., & Anyanwu, B. N. (2006). Characterisation of palm wine yeast isolates for industrial utilisation. *African journal of biotechnology*, 5(19).
- Olah, G. A.** (2005). Beyond oil and gas: the methanol economy. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(18), 2636-2639.
- Osman, M. E.**, Khattab, O. H., Hammad, I. A., & El-Hussieny, N. I. (2011). Optimization of bio-fuel production by *Saccharomyces cerevisiae* isolated from sugar cane bagasse. *The Journal of American Science*, 7(5), 485-492.
- Oteng-Gyang, K.** (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. *technique et Documentation .lavoisier*, 260.
- Oura, E.** (1997). Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry*, 19-21.
- Pampulha, M. E.**, & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters*, 184(1), 69-72.
- Patrascu, E.**, Rapeanu, G., & Hopulele, T. (2009). Current approaches to efficient biotechnological production of ethanol. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 4, 1.
- Phowchinda, O.**, & Strehaiano, P. (1999). Utilization of mixed sugars for alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science & Technology Asia*, 23-31.
- Phukoetphim, N.**, Salakkam, A., Laopaiboon, P., & Laopaiboon, L. (2017). Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of sugar levels, nitrogen supplementation, and feeding regimes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 26, 84-92.
- Piddocke, M. P.**, Kreis, S., Heldt-Hansen, H. P., Nielsen, K. F., & Olsson, L. (2009). Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(3), 453.
- Pigeau, G. M.**, & Inglis, D. L. (2005). Upregulation of ALD3 and GPD1 in *Saccharomyces cerevisiae* during Icewine fermentation. *Journal of applied microbiology*, 99(1), 112-125.
- Pigeau, G. M.**, & Inglis, D. L. (2007). Response of wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) aldehyde dehydrogenases to acetaldehyde stress during Icewine fermentation. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1576-1586.
- Prescott, L. H.** (2010). microbiologie. 5eme édn. Bruxelles, Belgium: De Boeck Université.

- Prescott, L. M.**, Harley, J. P., Klein, D. A., Bacq-Calberg, C. M., & Dusart, J. (2003). Microbiologie. 2ème Édition française. *Éditions De Boeck Université, Bruxelles, Belgique*.
- Probstein, R. F.**, & Hicks, R. E. (2006). *Synthetic fuels*. Courier Corporation.
- Puligundla, P.**, Smogrovicova, D., Obulam, V. S. R., & Ko, S. (2011). Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *38*(9), 1133-1144.
- Raheem, A.**, Azlina, W. W., Yap, Y. T., Danquah, M. K., & Harun, R. (2015). Thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *49*, 990-999.
- Ramos, C. L.**, Duarte, W. F., Freire, A. L., Dias, D. R., Eleutherio, E. C. A., & Schwan, R. F. (2013). Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(3), 935-944.
- Ratnavathi, C. V.**, Suresh, K., Kumar, B. V., Pallavi, M., Komala, V. V., & Seetharama, N. (2010). Study on genotypic variation for ethanol production from sweet sorghum juice. *Biomass and Bioenergy*, *34*(7), 947-952.
- Rédou, V.**, Navarri, M., Meslet-Cladière, L., Barbier, G., & Burgaud, G. (2015). Marine Fungi from Deep Subseafloor Sediments: Species richness and Adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-04064.
- Rejsek, F.** (2002). *Analyse des eaux: aspects réglementaires et techniques*. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.
- Rezki, M.**, Aouad, I., & Bekki, a. (2015). Production of ethanol and polyethanol by yeasts isolated from date (*Phoenix dactylifera* L.) wastes. *African Journal of Biotechnology*, *14*(50), 3288-3294.
- Rodrigues, F.**, Ludovico, P., & Leão, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (pp. 101-121). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Rodríguez-Navarro, A.**, & Ortega, M. D. (1982). The mechanism of sodium efflux in yeast. *FEBS letters*, *138*(2), 205-208.
- Roukas, T.** (1996). Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. *Journal of Food Engineering*, *27*(1), 87-96.
- Russell, I.**, Jones, R., & Stewart, G. G. (1987). Yeast--the primary industrial microorganism. *Biological research on industrial yeasts/editors, Graham G. Stewart...[et al.]*.
- Russell, I.** (2003). Understanding yeast fundamentals. *The alcohol textbook*, *4*, 531-537.
- Sainz, J.**, Pizarro, F., Pérez-Correa, J. R., & Agosin, E. (2003). Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, *81*(7), 818-828.
- Sarris, D.**, Giannakis, M., Philippoussis, A., Komaitis, M., Koutinas, A. A., & Papanikolaou, S. (2013). Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *88*(5), 958-969.
- Sarris, D.**, Kotseridis, Y., Linga, M., Galiotou-Panayotou, M., & Papanikolaou, S. (2009). Enhanced ethanol production, volatile compound biosynthesis and fungicide removal during growth of a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* strain on enriched pasteurized grape musts. *Engineering in Life Sciences*, *9*(1), 29-37.
- Sasano, Y.**, Haitani, Y., Ohtsu, I., Shima, J., & Takagi, H. (2012). Proline accumulation in baker's yeast enhances high-sucrose stress tolerance and fermentation ability in sweet dough. *International journal of food microbiology*, *152*(1-2), 40-43.

- Sayed, W.**, Cabrol, A., Abdallah, R., Taha, S., Amrane, A., & Djelal, H. (2018). Enhancement of ethanol production from synthetic medium model of hydrolysate of macroalgae. *Renewable Energy*, 124, 3-10.
- Shaghghi-Moghaddam, R.**, Jafarizadeh-Malmiri, H., Mehdikhani, P., Alijanianzadeh, R., & Jalalian, S. (2019). Optimization of submerged fermentation conditions to overproduce bioethanol using two industrial and traditional *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Green Processing and Synthesis*, 8(1), 157-162.
- Sheoran, A.**, Yadav, B. S., Nigam, P., & Singh, D. (1998). Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a column reactor of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 38(2), 123-128.
- Siedlecki, M.**, De Jong, W., & Verkooyen, A. H. (2011). Fluidized bed gasification as a mature and reliable technology for the production of bio-syngas and applied in the production of liquid transportation fuels—a review. *Energies*, 4(3), 389-434.
- Sikarwar, V. S.**, Zhao, M., Fennell, P. S., Shah, N., & Anthony, E. J. (2017). Progress in biofuel production from gasification. *Progress in Energy and Combustion Science*, 61, 189-248.
- Silva, G. P. D.**, Araújo, E. F. D., Silva, D. O., & Guimarães, W. V. (2005). Ethanol fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *Klebsiella oxytoca* strain P2. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4), 395-404.
- Singh, A.**, & Bishnoi, N. R. (2012). Enzymatic hydrolysis optimization of microwave alkali pretreated wheat straw and ethanol production by yeast. *Bioresource technology*, 108, 94-101.
- Sivaramakrishnan, K.**, & Ravikumar, P. (2012). Determination of cetane number of biodiesel and its influence on physical properties. *ARNP journal of engineering and applied sciences*, 7(2), 205-211.
- Skorupskaite, V.**, Makareviciene, V., & Levisauskas, D. (2015). Optimization of mixotrophic cultivation of microalgae *Chlorella* sp. for biofuel production using response surface methodology. *Algal Research*, 7, 45-50.
- Stambuk, B. U.**, Batista, A. S., & De Araujo, P. S. (2000). Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(2), 212-214.
- Stocker, T.** (Ed.). (2014). *Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- Sudibyo, H.**, Jasman, J., Petrus, H. T. B. M., Prasetya, A., Widiyanto, D., Hidayat, C., ... & Prijambada, I. D. (2017). Simultaneous Hydrolysis and Fermentation of Sweet Sorghum Varieties (FS501 and KCS105) into Bioethanol Using *Saccharomyces steineri*—A Kinetics Study. *Engineering Journal*, 21(7), 105-121.
- Surriya, O.**, Saleem, S. S., Waqar, K., Kazi, A. G., & Öztürk, M. (2015). Bio-fuels: a blessing in disguise. In *Phytoremediation for Green Energy* (pp. 11-54). Springer, Dordrecht.
- Swan, T. M.**, & Watson, K. (1999). Stress tolerance in a yeast lipid mutant: membrane lipids influence tolerance to heat and ethanol independently of heat shock proteins and trehalose. *Canadian journal of microbiology*, 45(6), 472-479.
- Techaparin, A.**, Thanonkeo, P., & Klanrit, P. (2017). High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. *Brazilian journal of microbiology*, 48(3), 461-475.

- Tekarslan-Sahin, S. H.**, Alkim, C., & Sezgin, T. (2018). Physiological and transcriptomic analysis of a salt-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant obtained by evolutionary engineering. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 18(1), 55.
- Tikka, C.**, Osuru, H. P., Atluri, N., & Raghavulu, P. C. V. (2013). Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains. *Bioinformation*, 9(8), 421
- Tomás, A. F.**, Angelidaki, I., & Karakashev, D. B. (2013). Optimization of bioethanol production from carbohydrate rich wastes by extreme thermophilic microorganisms.
- Tortora, J.**, & Funk, B. F. Case Ch. I.(2003). *Introduction à la microbiologie*.
- Tronchoni, J.**, Gamero, A., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., & Querol, A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International journal of food microbiology*, 134(3), 237-243.
- Tsuyoshi, N.**, Fudou, R., Yamanaka, S., Kozaki, M., Tamang, N., Thapa, S., & Tamang, J. P. (2005). Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation. *International journal of food microbiology*, 99(2), 135-146.
- Turhan, I.**, Bialka, K. L., Demirci, A., & Karhan, M. (2010). Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, 101(14), 5290-5296.
- van der Wal, H.**, Sperber, B. L., Houweling-Tan, B., Bakker, R. R., Brandenburg, W., & López-Contreras, A. M. (2013). Production of acetone, butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed *Ulva lactuca*. *Bioresource technology*, 128, 431-437.
- Van Maris, A. J.**, Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttkik, M. A., ... & Pronk, J. T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90(4), 391-418.
- Verduyn, C.**, Zomerdijk, T. P., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Applied microbiology and biotechnology*, 19(3), 181-185.
- Vijaikishore, P.**, & Karanth, N. G. (1984). Glycerol production by fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 9(3), 243-253.
- Vohra, M.**, Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573-584.
- Voloshin, R. A.**, Rodionova, M. V., Zharmukhamedov, S. K., Veziroglu, T. N., & Allakhverdiev, S. I. (2016). Biofuel production from plant and algal biomass. *International journal of hydrogen energy*, 41(39), 17257-17273.
- Waldron, K. W.** (Ed.). (2010). *Bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass*. Elsevier.
- Walker, G. M.** (2010). *Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol*. Bookboon.
- Walker, G. M.**, & White, N. A. (2017). Introduction to fungal physiology. *Fungi: biology and applications*, 1-35.
- Wang, D. I.** (1979). Fermentation and enzyme technology. *Techniques in pure and applied microbiology*.
- Wang, F. Q.**, Gao, C. J., Yang, C. Y., & Xu, P. (2007). Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnology letters*, 29(2), 233-236.
- Wang, L.**, Zhao, X. Q., Xue, C., & Bai, F. W. (2013). Impact of osmotic stress and ethanol inhibition in yeast cells on process oscillation associated with continuous very-high-gravity ethanol fermentation. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 133.

-
- Wang, X.**, Liu, X., & Wang, G. (2011). Two-stage Hydrolysis of Invasive Algal Feedstock for Ethanol Fermentation F. *Journal of integrative plant biology*, 53(3), 246-252.
- Ward, O. P.** (1989). *Fermentation biotechnology: principles, processes and products*. Milton Keynes: Open University Press.
- Watson, T. G.** (1970). Effects of sodium chloride on steady-state growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 64(1), 91-99.
- Wainaina, S.**, Lukitawesa, Kumar Awasthi, M., & Taherzadeh, M. J. (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. *Bioengineered*, 10(1), 437-458.
- Wickerham, L. J.** (1951). *Taxonomy of yeasts* (No. 1029). US Dept. of Agriculture.
- Winter, J. F.**, Loret, M. O., & Uribelarrea, J. L. (1989). Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Current microbiology*, 18(4), 247-252.
- Ylittervo, P.**, Franzén, C. J., & Taherzadeh, M. J. (2011). Ethanol production at elevated temperatures using encapsulation of yeast. *Journal of biotechnology*, 156(1), 22-29.
- Yokozeki, A.** (2006). Osmotic pressures studied using a simple equation-of-state and its applications. *Applied Energy*, 83(1), 15-41
- Zabed, H.**, Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R., & Nasrulhaq Boyce, A. (2014). Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Zadrag, R.**, Kwolek-Mirek, M., Bartosz, G., & Bilinski, T. (2006). Relationship between the replicative age and cell volume in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*-, 53(4), 747.

Annexe

ANNEXE 1

Yeast Malt Agar (YMA)

Composition :

Extrait de levure	3g
Extrait de malt	3g
Peptone	5g
Glucose	10g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

ANNEXE 2

Milieu Wikerham

Composition :

Extrait de levure	3g
Peptone	5g
Glucose	10g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

ANNEXE 3

Galleries Api 20 C

api® 20 C AUX BIDMÉRIEUX

REF : M

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origem / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

48 h	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
72 h	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	
	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	(2)			(0)			(4)			(0)			(7)			(3)					

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση : 2040073

api® 20 C AUX BIDMÉRIEUX

REF : D

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origem / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

48 h	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
72 h	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	(2)			(0)			(4)			(0)			(0)			(7)			(3)		

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση : 2040073

api® 20 C AUX BIDMÉRIEUX

REF : P

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origem / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

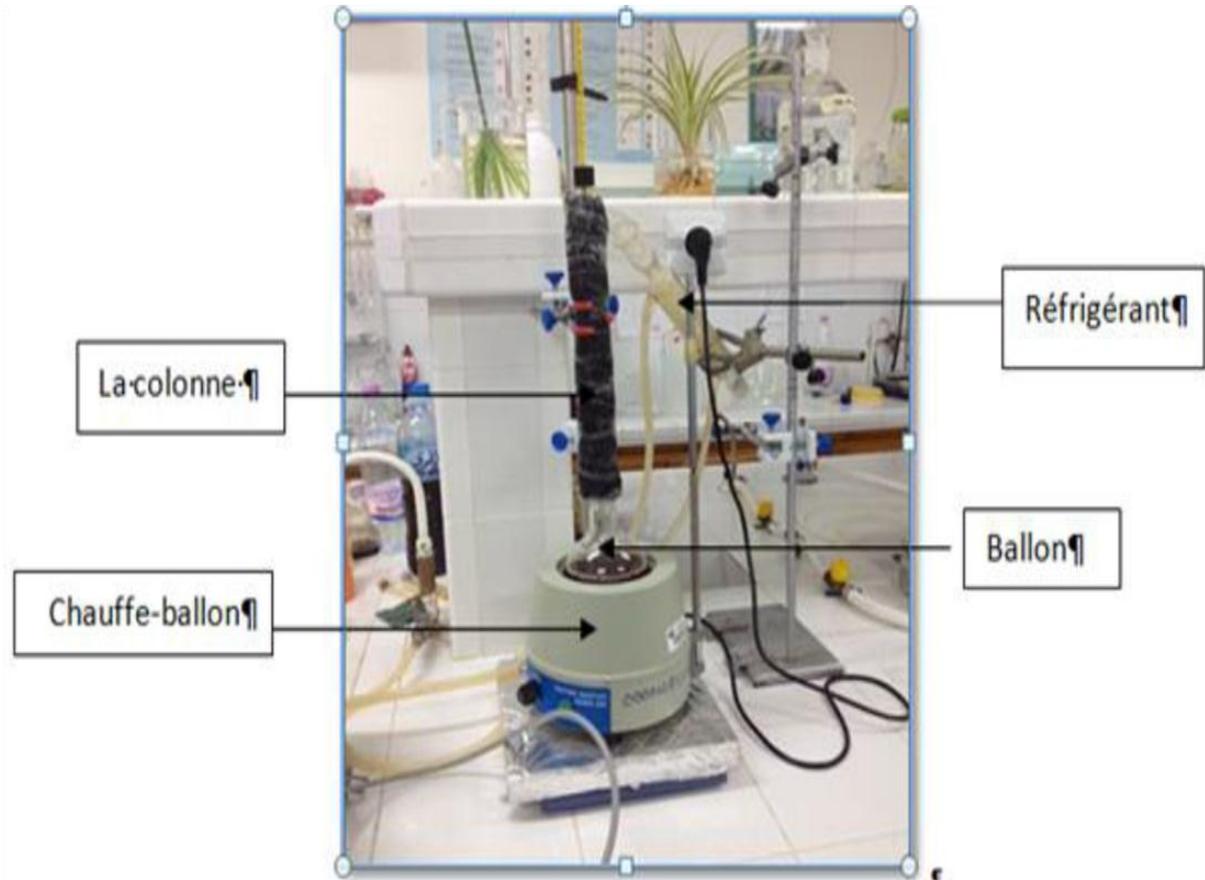
48 h	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
72 h	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	(2)			(0)			(4)			(0)			(0)			(7)			(3)		

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση : 2040073

ANNEXE 4

Dispositif de distillation



Annexe 5

Résultat MALDITOF



GIP LABOCEA

BioAgroPolis - 10, rue Claude Bourgelat - CS 30616 - Javené - 35306 FOUGERES Cedex
Tél: 02.99.94.74.10 - Fax: 02.99.94.74.11

N° SIRET: 130 002 082 00050 - N° TVA intracommunautaire: FR07130002082

DOSSIER : 160513010797

SOUS-DOSSIER : 01

Réceptionné le : 13/05/2016

Enregistré le : 13/05/2016

Edité le : 20/05/2016

ANALYSES DEMANDEES : Examen bactériologique / mycologique

Copie à :

LABOCEA - site de Fougères

Tiers

Nom : ENSCR- Ecole Nationale Supérieure de Chimie
Adresse : 11 allée de Beaulieu
Commune : 35708 RENNES CEDEX 7
Code Act. :

ENSCR- Ecole Nationale Supérieure de Chimie

11 allée de Beaulieu
Equipe CIP
35708 RENNES CEDEX 7

Prescripteur, Demandeur, Vétérinaire

Nom : Souche bactérienne
Commune :

Etat : Température ambiante

Duplicata de rapport d'essais de Diagnostics

Date de début d'analyse 17/05/2016

Bordereau : 1

Date de prélèvement :

Nature du prélèvement :

Bactériologie - Mycologie

Echantillons	Examens - Analyses - Identification	Résultats
S1	Identification de souche <i>Maldi-Tof (VITEK MS)</i>	Saccharomyces cerevisiae : 99,9 %
S2	Identification de souche <i>Maldi-Tof (VITEK MS)</i>	Saccharomyces cerevisiae : 99,9 %
S5	Identification de souche <i>Maldi-Tof (VITEK MS)</i>	Saccharomyces cerevisiae : 99,9 %

Commentaire (non couvert par l'accréditation) :

% = % de confiance de l'identification selon la base de données

"EC" = en cours d'analyse "N/A" = Non analysé
"Neg" = NEGATIF/Non Détecté "Pos" = POSITIF/Détecté
"DLD" = Détecté en limite de détection "Ini" = Inexploitable

Validé le 18/05/2016
Guillaume LEQUEUX
Chef de Service