



Optimisation de la bioproduction d'éthanol par valorisation des refus de l'industrie de conditionnement des dattes

Sofien Chniti

► To cite this version:

Sofien Chniti. Optimisation de la bioproduction d'éthanol par valorisation des refus de l'industrie de conditionnement des dattes. Autre. Université de Rennes, 2015. Français. NNT : 2015REN1S118 . tel-01558761

HAL Id: tel-01558761

<https://theses.hal.science/tel-01558761>

Submitted on 10 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Chimie

Ecole doctorale : Science De La Matière

présentée par

Sofien CHNITI

Préparée à l'unité mixte de recherche CNRS 6226
Institut des Sciences Chimiques de Rennes
Equipe Chimie et Ingénierie des Procédés

**Optimisation de la
bioproduction
d'éthanol par
valorisation des refus
de l'industrie de
conditionnement des
dattes**

**Thèse soutenue à l'ENSCR
le 9 juillet 2015**

devant le jury composé de :

Patrick BOURSEAU

Professeur – Université de Bretagne Sud / *rapporteur*

Lionel LIMOUSY

MCF-HDR – Université de Haute Alsace / *rapporteur*

Didier FLONER

MCF-HDR – Université de Rennes 1 / *examineur*

Anthony SZYMCZYK

Professeur – Université de Rennes1 / *examineur*

Hayet DJELAL

Enseignant-Chercheur – EME / *Co-directeur de thèse*

Abdeltif AMRANE

Professeur – Université de Rennes1 / *directeur de thèse*

Jacques BREGEON

Président Ecole des Métiers de l'Environnement / *Invité*

DEDICACE

Je dédie ce travail à

Mon père

Pour ses encouragements incessants et son soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Qu'il trouve dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour.

Mon adorable mère

Qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour être sacrifiée pour que ces enfants grandissent et prospèrent. Que dieu la protège et lui donne bonne santé et qu'elle trouve ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

Mes soeurs et mon frère

Pour leur disponibilité, leur soutien moral, leur encouragement incessant, d'être coopératif et d'assumer à ma place certaine de mes responsabilités familiales.

Ma fiancée

D'être toujours à mes côtés pour me soutenir, pour m'aider dans la mesure du possible, mais surtout pour donner du goût à ma vie par son amour et sa tendresse, j'espère qu'elle trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

Ma belle-famille

Pour leur soutien, gentillesse et sympathie, pendant cette thèse parfois envahissante, que dieu les protège et leurs donne une vie pleine de réussite et de bonheur.

REMERCIEMENTS

Le présent travail de thèse, qui entre dans le cadre d'un programme de recherche thèse co-tutelle, a été réalisé dans le Laboratoire de Biotechnologie de l'Ecole des Métiers de l'Environnement (35) sous la direction de Madame Hayet DJELAL et au Laboratoire de Génie Chimique (Rennes1 -France) sous la direction de Monsieur Abdeltif AMRANE.

Je tiens à remercier très vivement et respectueusement Madame Marie-Dominique DE CAYEUX , Directeur de l'Ecole des Métiers de l'Environnement pour avoir accepté de m'accueillir au sein de laboratoire de l'Ecole. Et je remercie aussi l'ensemble du personnel pour leur gentillesse et leur sympathie et je tiens à souligner tout particulièrement l'accueil chaleureux et la sympathie de Karinne PICHARD, Fabienne, Sébastien CHERAUD, Nicolas JOVAN et Laurence THENAISY et tout le personnel de l'EME.

Avec une rigueur et un intérêt constant, Madame Hayet DJELAL a dirigé ce travail avec beaucoup d'enthousiasme en me faisant bénéficier de ses compétences scientifiques. Je tiens à lui exprimer ma très grande reconnaissance et le témoignage de mon profond attachement pour l'attention qu'elle a porté à cette thèse, pour les encouragements, pour la confiance qu'elle m'a toujours témoignée, sa constante disponibilité et la gentillesse dont elle a fait preuve à mon égard.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude au Pr. Amrane ABDELTIF, pour avoir accepté d'être le directeur côté Français de cette thèse. Son enthousiasme et son dynamisme m'ont chaque fois permis de rebondir dans les moments difficiles. Je le remercie vivement pour l'aide scientifique précieuse et tous les conseils qu'il a pu me fournir.

Je remercie Monsieur Mnasser HASSOUNA mon directeur de thèse coté Tunisien et Directeur de l'école supérieure des industries alimentaires de Tunis pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Je profite de cette occasion d'exprimer ma profonde reconnaissance à Madame Rim et tout le cadre administratif de l'ESIAT.

Je remercie Yvonne et Jeanne et surtout Yvonne pour son professionnalisme et les conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer durant mes séjours au l'école des métiers de l'environnement à Bruz et pour la confiance qu'elle m'a toujours témoignée.

Je tiens à remercier Mademoiselle Monia JEMNI, chercheur au Centre Régional de Recherche en Agriculture Oasienne à Dégache, Tozeur en Tunisie pour avoir accepté de nous envoyer deux microorganismes isolés de sous-produit des dattes.

Je tiens à remercier Mme Hédia CHAABENE, directeur du laboratoire de Microbiologie, à l'Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique en Tunisie, et Mlle Marwe qui a eu l'aimable volonté le travail expérimentale des mes stagiaires, tout le long de ces années.

Que tous ceux qui ont fait part, de près ou de loin, à ce travail en Tunisie et en France, trouvent ici l'expression de mes remerciements et ma profonde gratitude.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Production mondiale des dattes (FAOSTAT, 2014).....	25
Figure 2. Répartition de production des dattes dans le monde (FAOSTAT, 2014).	26
Figure 3. Répartition du palmier dattier en Tunisie.	26
Figure 4. Evolution de la production des dattes en Tunisie (en tonnes) (FAOSTAT, 2014).	27
Figure 5. Coupe schématique d'une datte (Munier, 1973).	29
Figure 6. Composition biochimique de la datte (Sawaya et <i>al.</i> , 1983).	31
Figure 7. Opération de transformation des dattes (Estanove, 1990).	34
Figure 8. Transformation des sucres continus dans les végétaux en éthanol (Cabal et Gatignol, 2015).	46
Figure 9. Conversion de glucose en éthanol (Smith et <i>al.</i> , 2006).	46
Figure 10. La glycolyse et le cycle de Krebbs. Où HxK : hexokinase ; PFK : Phosphofructokinase ; FbiP : fructose bi-phosphatase ; PK : Pyruvate kinase ; PDH : pyruvate dehydrogénase ; PDC : pyruvate decarboxylase ; ADH : alcool deshydrogénase ; AcDH : acetaldehyde deshydrogénase ; ACS : acetyl-CoA synthase (Poilpré, 2002).	56
Figure 11. Nœud métabolique du pyruvate et de l'acétaldéhyde (Lei et <i>al.</i> , 2001).	57
Figure 12. Sous-produits de dattes de la variété « <i>Deglet-Nour</i> ».	73
Figure 13. Processus d'extraction du jus de dattes.	78
Figure 14. Altération parasitaire d'une datte.	90
Figure 15. Surface de réponse traduisant l'impact des interactions entre les facteurs X_1 , X_2 et X_3 sur l'équivalent glucose des jus de dattes (a) interaction (X_1 - X_2), (X_1 - X_3) et (X_2 - X_3).	98
Figure 16. Effet de la stérilisation sur la composition du sirop en sucres.	102
Figure 17. Evolution de la biomasse au cours de la fermentation de M-S100, par <i>S. cerevisiae</i>	105
Figure 18. Evolution des sucres au cours de la fermentation de M-S100, par <i>S. cerevisiae</i>	106
Figure 19. Evolution de la concentration en NH_4Cl au cours de la fermentation de M-S100, par <i>S. cerevisiae</i>	107
Figure 20. Evolution du pH au cours de la fermentation de M-S100, par <i>S. cerevisiae</i>	107
Figure 21. Evolution de la concentration en éthanol et en glycérol, au cours de la fermentation de M-S100, par <i>S. cerevisiae</i>	108
Figure 22. Evolution de la biomasse au cours de la fermentation par <i>S. cerevisiae</i>	111
Figure 23. Concentration en sucres au cours de la fermentation par <i>S. cerevisiae</i> ; (a) M_{EL} , (b) $Milieu_NH_4Cl$, (c) M_T	112
Figure 24. Evolution de la concentration en éthanol durant la fermentation par <i>S. cerevisiae</i>	113
Figure 25. Evolution du pH durant la fermentation par <i>S. cerevisiae</i>	114
Figure 26. Schéma de fonctionnement de l'uniport électrophorétique accumulatif responsable de l'entrée de l'ion ammonium chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Salmon, 1998).	114
Figure 27. Evolution de la biomasse au cours de la fermentation par <i>S. cerevisiae</i>	116
Figure 28. Concentration en sucres au cours de la fermentation. (a) M-S45, (b) M-S90, (c) M-S175, (d) M-S350 par <i>S. cerevisiae</i>	117
Figure 29. Concentration en NH_4Cl au cours de la fermentation par <i>S. cerevisiae</i>	118
Figure 30. Concentration en éthanol au cours de la fermentation par <i>S. cerevisiae</i>	119
Figure 31. Concentration en glycérol au cours de la fermentation par <i>S. cerevisiae</i>	120
Figure 32. Suivi de la croissance des levures au cours de la fermentation pour M-S175(a) et M-S350(b) ; cultures additionnées de 500 mg.L^{-1} de NH_4Cl	123

Figure 33. Concentration en sucres au cours de la fermentation (Glucose (a), Fructose (b) et Saccharose (c) dans un milieu de culture à 175 g.L ⁻¹ ; additionné de 500 mg.L ⁻¹ .	126
Figure 34. Concentration en sucres (Glucose (a), Fructose (b) et saccharose (c) dans un milieu de culture à 350 g.L ⁻¹ ; additionné de 500 mg.L ⁻¹ .	126
Figure 35. Concentration en NH ₄ Cl dans les milieux à 175 (a) et à 350 g.L ⁻¹ en sucres (b) ; additionnés de 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	127
Figure 36. Réponse de la levure à un milieu hyperosmotique. A : La première réponse de la cellule. B. L'osmoadaptation de la cellule (Blomberg, 2000).	128
Figure 37. Evolution de la concentration en éthanol (a) et glycérol (b) durant la fermentation sur milieux à 175 g.L ⁻¹ en sucres ; additionnés de 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	129
Figure 38. Evolution de la concentration en éthanol (a) et glycérol (b) durant la fermentation sur milieux à 350 g.L ⁻¹ ; additionnés de 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	130
Figure 39. Voies de synthèse de glycérol et de l'éthanol (Djelal et al., 2005).	131
Figure 40. Cinétique de croissance de <i>Z. rouxii</i> , sur des milieux à différentes concentrations initiales en sucres (175, 250, 350 et 500 g.L ⁻¹) ; additionnés de 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	138
Figure 41. Cinétique de consommation des sucres durant la culture de <i>Z. rouxii</i> sur milieux à 175 g.L ⁻¹ (M-S175), 250 g.L ⁻¹ (M-S250), 350 g.L ⁻¹ (M-S350) et 500 g.L ⁻¹ ; additionnés de 10 mmol.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	139
Figure 42. Cinétique de consommation de NH ₄ Cl durant la culture de <i>Z. rouxii</i> sur milieux à 175 g.L ⁻¹ (M-S175), 250 g.L ⁻¹ (M-S250), 350 g.L ⁻¹ (M-S350) et 500 g.L ⁻¹ ; additionnés de 10 mmol.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	140
Figure 43. Transport des hexoses lors de la fermentation alcoolique par <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (Production d'éthanol et de glycérol) (Dakal et al., 2014).	141
Figure 44. Cinétique de production de bioéthanol et de glycérol durant la culture de <i>Z. rouxii</i> sur milieux à 175 g.L ⁻¹ (M-S175), 250 g.L ⁻¹ (M-S250), 350 g.L ⁻¹ (M-S350) et 500 g.L ⁻¹ ; additionnés de 10 mmol.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	143
Figure 45. Cinétique de croissance de <i>Z.rouxii</i> sur milieux 350 g.L ⁻¹ (M-S350); additionnés de 10 mmol.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	146
Figure 46. Cinétique de consommation des sucres par <i>Z. rouxii</i> sur milieux 350 g.L ⁻¹ (M-S350); additionnés de 10 mmol.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	147
Figure 47. Cinétique de production de bioéthanol et de glycérol sur milieux 350 g.L ⁻¹ (M-S350); additionnés de 10 mmol.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	148
Figure 48. Cinétique de consommation de NH ₄ Cl sur milieux 350 g.L ⁻¹ (M-S350); additionnés de 10 mmol.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	149
Figure 49. Cinétique de croissance de <i>Z.rouxii</i> sur milieux 250 g.L ⁻¹ ; additionnés de 500 (M-N500), 1500 (M-N1500) et 3000 (M-N3000) mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	151
Figure 50. Cinétique de consommation des sucres sur milieux 250 g.L ⁻¹ ; additionnés de 500 (M-N500), 1500 (M-N1500) et 3000 (M-N3000) mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	152
Figure 51. Cinétique de production de bioéthanol et de glycérol par <i>Z. rouxii</i> sur milieux 250 g.L ⁻¹ ; additionnés de 500 (M-N500), 1500 (M-N1500) et 3000 (M-N3000) mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	153
Figure 52. Cinétique de consommation de NH ₄ Cl par <i>Z. rouxii</i> sur milieux 250 g.L ⁻¹ ; additionnés de 500 (M-N500), 1500 (M-N1500) et 3000 (M-N3000) mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl .	154
Figure 53. Reconstruction phylogénétique par maximum de vraisemblance basée sur l'analyse d'une portion du gène <i>GyrB</i> incluant 6 séquences issues de souches de <i>B. subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i> dont la souche type et 6 séquences issues de souches de <i>B. amyloliquefaciens</i> dont la souche type de <i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>Amyloliquefaciens</i> , 5 souches de <i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>Plantarum</i> ainsi que la souche testée.	160

Figure 54. Concentration en sucres dans les milieux M-S175 fermentés par <i>S. cerevisiae</i> (<i>S.c</i>), <i>Z. rouxii</i> (<i>Z.r</i>) et <i>B. amyloliquefaciens</i> (<i>B. a</i>) ; milieux additionnés de 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl.....	164
Figure 55. Evolution de la biomasse au cours de la fermentation par <i>B. amyloliquefaciens</i> sur M-S175 et M-S350; additionnés de 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl.	166
Figure 56. Evolution de la concentration des sucres au cours de la fermentation par <i>B. amyloliquefaciens</i> sur M-S175 et M-S350; additionnés de 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl.	167
Figure 57. Evolution de la concentration en éthanol et en glycérol au cours de la fermentation par <i>B. amyloliquefaciens</i> sur M-S175 et M-S350; additionnés de 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl.	168
Figure 58. Procédé industriel de valorisation de sous-produits de dattes.....	172

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Valorisation biotechnologique de sous-produit des dattes.	38
Tableau 2. Différentes méthodes d'extraction solide-liquide	41
Tableau 3. Propriétés du butanol (Dürre, 2007 ; Lee et <i>al.</i> , 2008).....	44
Tableau 5. Récapitulatif des principaux oligo-éléments (Jones et <i>al.</i> , 1981).....	52
Tableau 6. Définition de la pression osmotique, osmolalité et osmolarité.	68
Tableau 7. Paramètres d'extraction.....	79
Tableau 8. Plan d'extraction : méthode de surface de réponse (Box-Behnken).	79
Tableau 9. Composition de milieu Dw.....	82
Tableau 10. Temps de rétention des composés quantifiés par HPLC.....	85
Tableau 11. Caractéristiques physiques des dattes « <i>Deglet-Nour</i> ».	89
Tableau 12. Caractéristiques biochimiques des sous-produits de dattes.	91
Tableau 13. Composition en éléments minéraux de pulpe de Deglet-Nour (mg/100 g de matière fraîche).	93
Tableau 14. Analyse de la réponse de surface de l'extraction du jus de dattes.....	95
Tableau 15. Estimation des coefficients du modèle pour suivre de la concentration en sucres en jus.....	96
Tableau 16. Caractéristique biochimique du sirop et de la pulpe de datte Deglet-Nour (72°Brix).	101
Tableau 17. Composition en éléments minéraux du sirop (mg/100 g de matière sèche).....	101
Tableau 18. Sucres totaux, sucres consommés, rendement en éthanol, glycérol et taux de conversion de la fermentation de M-S100, par <i>S. cerevisiae</i>	109
Tableau 19. Bilan des cultures en discontinu de la souche <i>S. cerevisiae</i> 522D en présence de différentes concentrations en sucres.....	120
Tableau 20. Evolution des prix de production d'éthanol (euros/hectolitre) (OCDEstat, 2013)... ..	122
Tableau 21. Fermentation alcoolique du milieu à base de dattes par les levures (après 72 h de culture) sur M-S175 et M-S350 additionnés de 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl.	132
Tableau 22. Production de bioéthanol à partir de différentes matières premières.	135
Tableau 23. Paramètres cinétiques des fermentations alcooliques par <i>Z. rouxii</i> sur milieux à 175 g.L ⁻¹ (M-S175), 250 g.L ⁻¹ (M-S250), 350 g.L ⁻¹ (M-S350) et 500 g.L ⁻¹ ; additionnés de 10 mmol.L ⁻¹ de NH ₄ Cl.....	144
Tableau 24. Paramètres cinétiques des fermentations alcooliques par <i>Z. rouxii</i> sur milieux 350 g.L ⁻¹ (M-S350); additionnés de 10 mmol.L ⁻¹ de NH ₄ Cl.....	150
Tableau 25. Paramètres cinétiques des fermentations alcooliques par <i>Z. rouxii</i> . sur milieux 250 g.L ⁻¹ ; additionnés de 500 (M-N500), 1500 (M-N1500) et 3000 (M-N3000) mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl....	155
Tableau 26. Résultats des brins forwards des séquençages 16S de la souche S.	157
Tableau 27. Résultats des Blast (NCBI) de la réponse 16S forward de la souche S.....	158
Tableau 28. Résultats des séquençages d'une partie de la région Gyrase de la souche S.....	158
Tableau 29. Résultats des Blast (NCBI) de la séquence <i>GyrB</i> reverse de la souche S.	159
Tableau 4. Condition de croissance de <i>Bacillus</i>	161
Tableau 30. Paramètres cinétiques de la fermentation alcoolique de M-S175 fermentés par <i>S. cerevisiae</i> (<i>S.c</i>), <i>Z. rouxii</i> (<i>Z.r</i>) et <i>B. amyloliquefaciens</i> (<i>B. a</i>) ; milieux additionnés d'environ 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl.	165
Tableau 31. Paramètres cinétiques des fermentations <i>VHG</i> fermentation par <i>B. amyloliquefaciens</i> sur M-S175 et M-S350; additionnés d'environ 500 mg.L ⁻¹ de NH ₄ Cl.....	169

LISTE DES ABREVIATIONS

- ABE : Acétone Butanol Ethanol.
- A. acétique : Acide acétique.
- Equ Glu : Equivalent Glucose.
- EtOH : Ethanol.
- h : heures.
- Glu : Glucose.
- Gly : Glycérol.
- Fru : Fructose.
- min : minutes.
- PHB : Poly- β -hydroxybutyrate.
- Q_{EtOH} : Productivité volumique en éthanol.
- Q_{Gly} : Productivité volumique en glycérol.
- rpm : rotation per minute.
- Sacch : Saccharose.
- TC_{EtOH} : Taux de Conversion.
- TR : Taux de Rétension.
- Y_{EtOH} : Rendement en éthanol (g éthanol / g de glucose).
- Y_{Gly} : Rendement en glycérol (g glycérol / g de glucose).

TABLE DE MATIERE

Dédicace	3
Remerciements	4
Liste des Figures	6
Liste des tableaux	9
Liste des Abreviations	10
Table de matière	11
Introduction	18
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	22
CHAPITRE I. LE SECTEUR PHOENICICOLE	23
1 . Généralités sur le palmier dattier	23
1.1 . Historique	23
1.2 . Taxonomie	23
1.3 . Systématique	23
1.3.1 . Morphologie	24
1.3.2 . Ecologie	24
2 . Le secteur dattier	25
2.1 . Le secteur dattier dans le monde	25
2.2 . Le secteur dattier en Tunisie	26
2.2.1 . Répartition géographique	26
2.2.2 . Production annuelle	27
2.2.3 . Importance économique du secteur phoenicicole	28
2.3 . La datte	28
2.3.1 . Définition	28
2.3.2 . Evolution physiologique de la datte	29
2.3.3 . Composition chimique des dattes	30
3 . Valorisation des sous-produits de dattes	34
3.1 . Valorisation technologique	35
3.1.1 . Pâte de dattes	35
3.1.2 . Farine de dattes	35
3.1.3 . Jus de dattes	35
3.1.4 . Sirop de dattes	35

3.2	. Valorisation biotechnologique	36
3.2.1	. Production de biopolymères	36
3.2.2	. Production d'acides organiques.....	36
3.2.3	. Production d'antibiotiques	36
3.2.4	. Production de biomasse.....	36
3.2.5	. Production des enzymes	36
3.2.6	. Production de Biofuel.....	37
CHAPITRE II. EXTRACTION DE JUS DE DATTES.....		40
1	. Extraction solide-liquide	40
1.1	. Définition	40
1.2	. Influence du solvant	42
1.3	. Influence de la température	43
1.4	. Influence de l'agitation.....	43
1.5	. Influence de l'humidité	43
CHAPITRE III. PRODUCTION DE BIOFUEL		44
1	. Le Butanol.....	44
1.1	. Production de butanol.....	44
1.1.1	. Production par voie chimique.....	44
1.1.2	. Production par voie biologique	45
2	. Le Bioéthanol.....	45
2.1	. La fermentation alcoolique.....	46
2.2	. Microorganismes utilisés.....	46
2.2.1	. Les bactéries	46
2.2.2	. Les levures.....	47
3	. La levure.....	47
3.1	. Caractéristiques structurales.....	47
3.1.1	. Paroi cellulaire.....	48
3.1.2	. Membrane plasmique	49
3.2	. Métabolisme et conditions de croissance	50
3.2.1	. Exigences nutritionnelles	50
3.2.2	. Métabolisme	53
4	. Procédés de fermentation	57
4.1	. Fermentation Batch	57
4.2	. Fermentation fed-batch.	58
4.3	. Fermentation en mode continu	58

4.4	. Le Bioréacteur à recyclage cellulaire	58
5	. Notion de stress chez les levures	60
5.1	. Facteurs influençant le métabolisme de la levure	60
5.1.1	. Effet de l'environnement	61
5.1.2	. Effet de la concentration d'éthanol	62
5.1.3	. Effet de la concentration en substrat	63
5.1.4	. Effets de la température et du pH	63
5.1.5	. Effet de l'oxygène et de dioxyde du carbone	64
5.1.6	. Effet de l'acide acétique	65
5.2	. Viabilité cellulaire	66
5.3	. Pression Osmotique	66
5.3.1	. Détermination expérimentale	69
5.3.2	. Impacts biologiques de la pression osmotique	70
5.4	. Les levures osmotolérantes	71
6	. Conclusion	71
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	72
1	. Matériel végétal	73
1.1	. Choix de la variété de datte	73
1.1.1	. Echantillonnage	73
1.1.2	. Caractérisation physique	74
1.1.3	. Caractéristiques biochimiques des pulpes de dattes	74
2	. Optimisation de l'extraction de jus de datte	77
2.1	. Dispositif expérimental	77
2.2	. Etablissement des modèles mathématiques	78
3	. Production de bioéthanol par les levures	80
3.1	. Matériel biologique	80
3.2	. Milieux de culture	81
3.2.1	. Conservation des souches	81
3.2.2	. Milieux de fermentation	81
3.3	. Fermentations	83
3.3.1	. Préparation de l'inoculum	83
3.3.2	. Ensemencement des milieux	83
3.4	. Techniques Analytiques	83
3.4.1	. Les prélèvements	83
3.4.2	. Suivi de la croissance	83

3.4.3	. Dosage par HPLC.....	84
3.4.4	. Dosage de NH ₄ Cl, Méthode de MANN (1963).....	85
3.4.5	. Evaluation de la fermentation.....	85
3.4.6	. Analyse statistique.....	86
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		87
Partie 1.extraction de jus de dattes		88
1	. Caractéristiques physicochimiques des sous-produits de dattes	88
1.1	. Caractéristiques morphologiques des sous-produits de dattes	88
1.1.1	. Couleur	89
1.1.2	. Consistance.....	89
1.1.3	. Longueur, poids et largeur des dattes.....	90
1.2	. Caractéristiques biochimiques des sous-produits de dattes.....	91
1.2.1	. Taux d'humidité	91
1.2.2	. Le pH.....	91
1.2.3	. Teneur en sucres.....	92
1.2.4	. Composition minérale	92
1.3	. Conclusion.....	93
2	. Optimisation de l'extraction.....	93
2.1	. Dosage des sucres dans le jus.....	93
2.2	. Modélisation.....	94
2.2.1	. Etablissement des modèles mathématiques.....	94
2.2.2	. Optimisation de l'extraction	94
2.3	. Conclusion.....	98
Partie 2. Sirops de dattes		99
1.	Caractérisation du sirop de dattes.....	99
1.1.	Rendement en sirop.....	99
1.2.	Caractéristiques physico-chimiques de sirop de datte.....	99
1.2.1.	pH.....	99
1.2.2.	Teneur en eau	100
1.2.3.	Teneur en cendres.....	100
1.2.4.	Teneur en protéines	100
1.2.5.	Teneur en sucres.....	100
1.2.6.	Eléments minéraux	101
2.	Effet de la haute température sur la composition du sirop de datte.....	102
2.1.	Sucres totaux	103

2.2.	Sucres réducteurs.....	103
2.3.	Saccharose.....	103
3.	Conclusion.....	104
Partie 3. Production de bioéthanol par des levures		104
1	. Production de bioéthanol par <i>S. cerevisiae</i> 522D.....	104
1.1.	Cinétique fermentaire.....	105
1.1.1.	Biomasse	105
1.1.2.	Evolution des sucres dans le milieu de fermentation	105
1.1.3.	Evolution de la source d'azote (NH ₄ Cl) et du pH	106
1.1.4.	Evolution des produits de fermentation.....	107
1.1.5.	Efficacité fermentaire.....	108
1.1.6.	Conclusion.....	109
2.	Influence de la nature de la source d'azote et du substrat sur la production de bioéthanol 110	
2.1.	Impact de la Nature de source d'azote	110
2.1.1.	Effet des sources d'azote sur la biomasse	110
2.1.2.	Effet de l'enrichissement sur La consommation des sucres	111
2.1.3.	Effet de sources d'azote sur la Production d'éthanol	113
2.1.4.	Effet de la source d'azote sur Le pH du milieu	113
2.1.5.	Conclusions	115
2.2.	Effet de la concentration en substrat sur la production d'éthanol	115
2.2.1.	Effet sur la biomasse	116
2.2.2.	Effet sur la concentration en sucres.....	116
2.2.3.	Effet sur la concentration en NH ₄ Cl.....	118
2.2.4.	Effet sur la concentration en éthanol et glycérol	118
2.2.5.	Conclusions	121
Partie 4. Production de bioethanol par fermentation « VHG » (Very High Gravity).....		122
1	. Production de bioéthanol par différentes souches de levures.....	123
1.1.	Cinétique fermentaire.....	123
1.1.1.	Evolution de la biomasse.....	123
1.1.2.	Évolution des sucres au cours de la fermentation.....	124
1.1.3.	Évolution du NH ₄ Cl dans les milieux de culture.....	127
1.1.4.	Produits de la fermentation alcoolique des sirops de dattes concentrés	128
1.1.5.	Conclusions	137
2	. Effet de la fermentation « VHG » sur la production d'éthanol par <i>Z. rouxii</i>	137

2.1	. Cinétique fermentaire.....	137
2.1.1	. Evolution de la biomasse.....	137
2.1.2	. Evolution de la consommation des sucres.....	138
2.1.3	. Evolution de la concentration en substrat d'azote.....	140
2.1.4	. Produits de fermentation.....	142
2.1.5	. Cinétique fermentaire.....	144
3	. Fermentation « VHG » par <i>Z. rouxii</i> : effet du temps de fermentation et de la concentration initiale en NH_4Cl	145
3.1	. Effet de la durée de culture.....	146
3.1.1	. Cinétique de la croissance.....	146
3.1.2	. Cinétique de consommation des sucres.....	147
3.1.3	. Cinétique de production de bioéthanol et de glycérol.....	147
3.1.4	. Cinétique de consommation de NH_4Cl	148
3.1.5	. Cinétique fermentaire.....	149
3.2	. Effet de la concentration en NH_4^+	150
3.2.1	. Cinétique de croissance.....	151
3.2.2	. Cinétiques de consommation des sucres.....	151
3.2.3	. Cinétique de production d'éthanol.....	153
3.2.4	. Cinétique de consommation de NH_4Cl	154
3.2.5	. Cinétique fermentaire.....	155
3.2.6	. Conclusion.....	155
4	. Fermentation « VHG » par des microorganismes isolés de sous produits de dattes.....	156
4.1	. La souche isolée.....	156
4.1.1	. Identification.....	156
4.1.2	. Conditions de croissance.....	161
4.1.3	. Conclusion.....	162
5	. Fermentation « VHG » par la souche identifiée.....	163
5.1	. Production d'éthanol par <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Z. rouxii</i> et <i>S. cerevisiae</i>	163
5.1.1	. Dégradation des sucres par les souches utilisées.....	163
5.1.2	. Paramètres cinétiques.....	164
5.2	. Effet de la concentration en substrat sur la capacité fermentaire de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	166
5.2.1	. Evolution de la biomasse.....	166
5.2.2	. Cinétique de dégradation des sucres.....	166
5.2.3	. Produits de la fermentation.....	167

5.3	. Conclusions	170
6	. Procédé industriel de production d'éthanol.....	170
	Conclusion générale.....	173
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	176
	ANNEXES	205
	Résumé.....	209
	Abstract	210

INTRODUCTION

Les activités agricoles et agro-industrielles génèrent des quantités importantes de déchets qui constituent une nuisance certaine pour l'environnement et une perte de matière recyclables.

De nombreuses études ont démontré que ces déchets, riches en matière organique étaient des produits nobles et constituaient de nouvelles matières pour de nombreuses industries (Acourene et Ammouche, 2012), on parle alors de matière première secondaire.

Par ailleurs, leur valorisation par les procédés biotechnologiques représentent une solution de choix dans la mesure où elle contribue à l'élimination de la pollution que subit l'environnement, permet de produire des substances à forte valeur ajoutée et de la bioénergie qui est une alternative à l'épuisement des énergies fossiles et un moyen de lutte contre les conséquences du changement climatique et contribue enfin, au développement industriel et agricole du pays. Les déchets des uns constituent la matière première des autres.

À la lumière de tout cela, une attention particulière doit être accordée à une meilleure gestion des déchets organiques et en particuliers les sous-produits provenant de l'agriculture et des agroindustries.

L'agriculture oasienne qui est pratiquée intensivement dans un milieu désertique ou fortement marqué par l'aridité, repose sur la culture du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) à laquelle sont associées d'autres cultures : maraîchères, arboricoles ou fourragères pour former ce qu'on appelle l'écosystème oasien.

En Tunisie, la phoeniciculture constitue le pivot de l'agriculture saharienne avec une prédominance du palmier dattier qui est planté sur 32 000 hectares de terres irriguées dans les oasis du sud de la Tunisie. Les oasis de Kebili, Tozeur, Gabès et Gafsa comptent près de 4 millions de pieds. La production de dattes représente 4 % de la production agricole totale. En 2014, elle était de 190 000 tonne en Tunisie (Faostat, 2014), avec une augmentation annuelle moyenne de 3 % (GID, 2014).

Cependant, des milliers de tonnes de dattes restent non utilisées et peuvent dépasser 40 % de la production. Ce sont des dattes qui ne sont pas consommées, soit du fait de leurs faibles qualités gustatives, soit du fait de leur texture « rébarbative » (trop dure), soit tout simplement parce qu'elles sont négligées au profil d'aliments plus attractifs. Elles sont aussi souvent perdues car leur faible valeur marchande ne justifie pas toujours les frais de récolte, même pour utilisation en alimentation de bétail.

Aujourd'hui, la bioconversion des sous-produits générés par la palmeraie et les industries de conditionnement des dattes (écarts de tri, dattes ratatinés, véreuses, dattes communes qui s'écoulent difficilement sur le marché) pourrait constituer un programme d'avenir pour le développement de l'agriculture saharienne.

Cependant, bien que les techniques de valorisation de ces écarts de triage de dattes dans les pays arabes soient multiples (pâte, farine, alcool, vinaigre, etc....), la voie de transformation la plus répandue en Tunisie reste la fabrication de pâte de dattes pour confiserie, généralement de qualité microbiologique médiocre (Sanchez-Zapata et *al.*, 2011) et qui est de plus en plus confrontée à des problèmes d'écoulement. Ainsi, grâce aux procédés biotechnologiques, il serait possible de mettre sur le marché national une nouvelle génération de produits dont l'impact socioéconomique est considérable. Cela permettent également, de créer de nombreuses, petites et moyennes entreprises (PME) spécialisées génératrices de revenus supplémentaires tant pour les agriculteurs que pour les industriels.

Il est intéressant de remarquer que cette biomasse, certes un sous-produit de l'industrie agro-alimentaire, constitue un réservoir considérable de matière organique facilement fermentescible et source énergétique très importante. Ne pas valoriser, cette matière première secondaire constitue un manque à gagner non négligeable. Par conséquent, il s'avère intéressant de proposer des solutions pratiques pour remédier à ce problème en proposant des voies de valorisation, surtout en termes de production de produits à intérêt industriel.

Les biocarburants ou agro carburants de première génération sont obtenus à partir de culture oléagineuse (colza, tournesol ...), de cultures sucrières (betterave, canne à sucre ...) et de céréales (maïs, blé ...). Leur obtention nécessite l'utilisation de grandes surfaces agricoles et d'eau. De ce fait, les biocarburants de première génération entrent

directement en compétition avec la filière alimentaire et peuvent contribuer à accentuer la crise alimentaire. Afin, de pallier ces problèmes, une deuxième voie d'obtention de biocarburants a été imaginée, les biocarburants de deuxième génération sont obtenus à partir de sous produits agricoles et agro-industriels (Demirbas, 2007).

Ils permettent une valorisation de la totalité de la biomasse et conduisent donc à de meilleurs rendements. Un avantage supplémentaire est qu'ils n'entrent pas en compétition avec la filière alimentaire. Les agro-carburants sont couramment utilisés dans tous type de véhicules puisqu'ils sont incorporés respectivement dans l'essence et le gazole sans nécessiter de modification des moteurs.

L'utilisation des sucres dérivés des déchets agricoles, essentiellement les sucres extraits des déchets de dattes tunisiennes, apparaît donc favorable pour produire de l'éthanol par des microorganismes.

Les fruits de dattes sont dotés de teneurs élevées en sucres (73-83%) (Elleuch et *al.*, 2008) : glucose, fructose et saccharose (Elarem et *al.*, 2011). Ils contiennent également des protéines, des lipides, des éléments minéraux et des vitamines (Abou-Zeid et *al.*, 1991) et représentent par conséquent un substrat de choix pour la production de nombreuses substances à forte valeur ajoutée (Kaidi et Touzi, 2001).

Les microorganismes les mieux adaptés à la production d'éthanol à partir de sucres fermentescibles sont les levures du genre *Saccharomyces* (Olofsson et *al.*, 2008 ; Sanchez et *al.*, 2007) et *Kluyveromyces* (Limtong et *al.*, 2007) et la bactérie *Zymomonas* (Bai et *al.*, 2008; Patle et *al.*, 2008) et dans un milieu hyperosmotique *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailii* (Leandeo et *al.*, 2011), et *Candida pelliculosa* (Djelal et *al.*, 2011) sont les plus utilisées.

C'est dans ce cadre que s'insère ce travail qui vise à contribuer à la valorisation des dattes déclassés ou écartés par la production de produits à valeur ajoutée, comme l'éthanol, le butanol, l'Acétone et le glycérol par fermentation. Cette étude s'insère dans cette préoccupation et consiste à développer un procédé biotechnologique de production (par voie fermentaire) d'éthanol.

A l'instar des Etats Unis, qui ont développé des programmes industriels intégrés pour la production de bio-alcool à partir de blé, de maïs et de déchets industriels (Stewart

et *al.*, 2011), la Tunisie, qui possède un potentiel considérable en déchets et sous produits de dattes, pourrait s'inscrire dans un programme similaire.

Le premier objectif de la thèse est d'étudier et de mettre en place un procédé qui permet d'extraire les sucres à partir de sous-produits de dattes. Dans un premier temps, l'action des paramètres les plus influents sur le procédé d'extraction sera analysée et une approche de planification expérimentale sera mise en place. Les conditions opératoires les plus performantes seront sélectionnées pour la production à l'échelle laboratoire, d'un stock de sirop en vue des expériences futures, nécessaires à ce travail de recherche.

La seconde partie de notre projet s'est orientée dans un premier temps sur l'étude de la production de bioéthanol par *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur des milieux de culture à base de sirop de dattes dilué à différentes concentration en sucres, et l'étude de l'influence de différentes sources d'azotes.

Enfin, dans la dernière partie des résultats, nous avons examiné la production d'éthanol par fermentation « *VHG* » en utilisant deux souches osmotolérantes (*Zygosaccharomyces rouxii* et *Candida pelliculosa*) et une souche isolée de sous-produits des dattes, après caractérisation et identification.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. LE SECTEUR PHOENICICOLE

1 . Généralités sur le palmier dattier

1.1 . Historique

Le palmier dattier est l'un des arbres fruitiers les plus anciennement cultivés. Les documents les plus anciens en Mésopotamie (Irak actuellement) montrent que sa culture se pratique depuis 3500 ans avant J.C. A la même époque, les dattiers étaient cultivés en Irak occidental, à travers l'Arabie et jusqu'en l'Afrique du Nord.

Ce n'est qu'au milieu du XIXème siècle que les plantations furent établies dans les vallées chaudes de Californie et dans l'Arizona méridional. Au cours des siècles, au Maghreb, le palmier a fait l'objet de différentes plantations réparties dans des lieux disposant de quantités d'eau relativement importantes. Le palmier dattier permet une pérennité de la vie dans les régions désertiques. Ses fruits sont un excellent aliment grâce à leur effet tonique et légèrement laxatif (Munier, 1973).

1.2 . Taxonomie

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linne en 1934. *Phoenix* dérivé de *Phoinix*, nom du dattier chez les grecs de l'antiquité qui le considéraient comme arbre des phéniciens ; *dactylifera* vient du latin *dactylis*, dérivant du grec *dactylus*, signifiant doigt (en raison de la forme du fruit), associé au mot latin *fero*, porté, en référence aux fruits.

Le genre *Phoenix dactylifera* L fait parti de la classe des Monocotylédones, d'une famille de plantes tropicales (*Palmoe* ou *Arecaceae*), la mieux connue sur le plan systématique. Elle est représentée par 200 genres et 2700 espèces réparties en six familles. La sous famille des *Coryphoideae* est elle-même subdivisée en trois tribus (Riedackar et al., 1990).

1.3 . Systématique

La classification botanique du palmier dattier donnée par (Djerbi, 1994) est la suivante:

- Groupe : *Spadiciflore.S* ;
- Embranchement : *Angiospermes* ;
- Classe : *Monocotylédones* ;
- Ordre : *Palmales* ;
- Famille : *palmoë* ;
- Tribu : *Phoenixées* ;
- Genre : *Phoenix* ;
- Espèce : *Phoenix dactylifera* L.

Le genre *Phoenix* comporte au moins douze espèces, la plus connue est le *dactylifera*, dont les fruits « dattes » font l'objet d'un commerce international important (Espiard, 2002).

1.3.1 .Morphologie

C'est un grand palmier de 20 à 30 m de haut, au tronc cylindrique (le stipe), portant une couronne de feuilles, les feuilles sont pennées divisées et longues de 4 à 7 m. L'espèce est dioïque et porte des inflorescences mâles ou femelles, les fleurs femelles aux trois carpelles sont indépendantes, et une seule se développe pour former la datte (le fruit).

1.3.2 .Ecologie

Le palmier dattier est cultivé comme arbre fruitier dans les régions chaudes arides et semi-arides. Cet arbre peut s'adapter à de nombreuses conditions grâce à sa grande variabilité (Gilles, 2000). Le dattier est une espèce thermophile, il exige un climat chaud, sec et ensoleillé. C'est un arbre qui s'adapte à tous les sols. Il est sensible à l'humidité pendant la période de pollinisation et au cours de la maturation (Munier, 1973 ; Boufis et al., 2014).

2 . Le secteur dattier

2.1 . Le secteur dattier dans le monde

La production mondiale des dattes s'élève à environ 7,5 millions de tonnes en 2012, produites par plus d'une trentaine de pays. Cela place la datte au 5^{ème} rang des fruits les plus produits dans les régions arides et semi-arides, après les agrumes, la mangue, la banane et l'ananas. On en produit dans plus de 30 pays, les plus importants étant l'égypte, l'Iran, l'Arabie saoudite, les Emirates arabes unies, l'Irak, le Pakistan et l'Algérie (Figure 1). L'Europe est surtout approvisionnée par l'Afrique du Nord, principalement la Tunisie et l'Algérie.

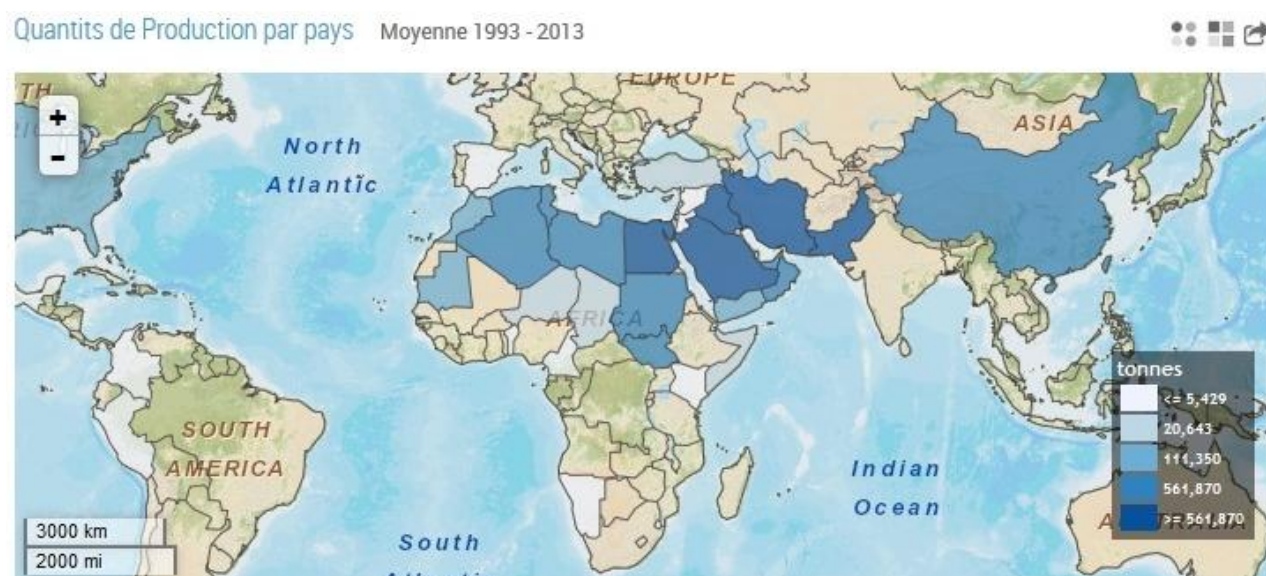


Figure 1. Production mondiale des dattes (FAOSTAT, 2014).

La production des dattes en 2013 dans le monde venaient principalement de l'Asie (64%) et l'Afrique (35,5%) (Figure 2).

Part de la production par région Moyenne 1993 - 2013

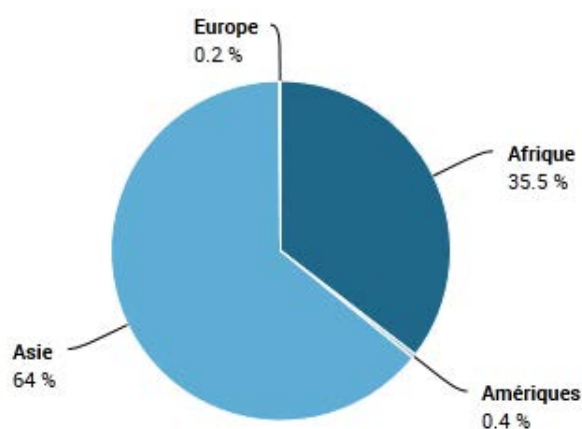


Figure 2. Répartition de production des dattes dans le monde (FAOSTAT, 2014).

2.2 . Le secteur dattier en Tunisie

2.2.1 . Répartiton géographique

Les palmeraies de dattiers sont réparties sur plusieurs gouvernorats au sud, mais la plus importante production de dattes se concentre dans les zones de Djerid et Nefzaoua (Figure 3) autour des villes de Tozeur et Kébili (Rhouma, 1995).



Figure 3. Répartition du palmier dattier en Tunisie.

La classification agro-climatique, basée sur les conditions climatiques en rapport avec la position géographique des oasis, distingue trois types d'oasis tunisiennes :

- Les oasis continentales ou sahariennes situées dans les régions de Nefzaoua et de Djerid. Ces oasis sont caractérisées par la dominance de la variété *Deglet- Nour* qui exige en période de maturation des températures élevées et une atmosphère sèche ;
- Les oasis de montagne (d'altitude ou de piémont) localisées à Gafsa, qui comportent une diversité variétale avec une présence de Deglet Nour ;
- Les oasis littorales situées dans la région côtière de Gabès. C'est la seule oasis maritime du Maghreb. Seules les variétés communes du palmier dattier y sont cultivées (Rhouma, 1995).

2.2.2 . Production annuelle

Le patrimoine phoenicicole tunisien se caractérise par une diversité, estimé en 1993 à plus de deux cents variétés de dattes qui se différencient par la qualité de leurs fruits (consistance) et par leur appréciation sur le marché.

Le secteur des dattes enregistre une tendance assez nette à l'augmentation de la production (Figure 4) et des exportations.

En effet, la production totale de dattes en Tunisie a atteint 190 000 tonnes au cours de la campagne 2012 contre 95 000 tonnes pour la campagne précédente, enregistrant ainsi une hausse de 50 % (FAOSTAT, 2014).

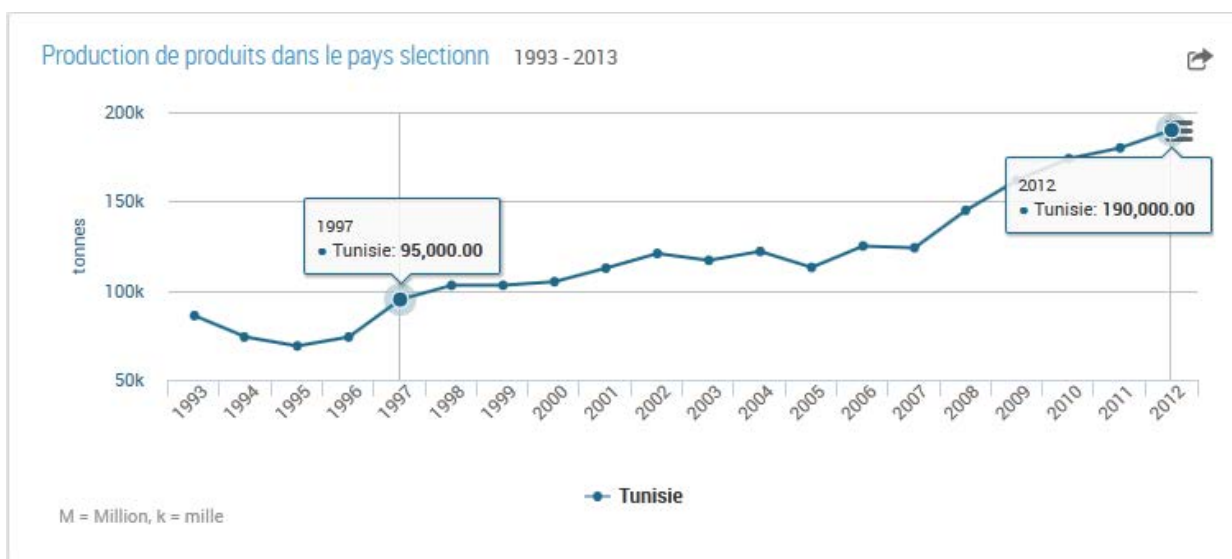


Figure 4. Evolution de la production des dattes en Tunisie (en tonnes) (FAOSTAT, 2014).

2.2.3 . Importance économique du secteur phoenicicole

Le secteur des dattes en Tunisie contribue beaucoup à l'économie régionale, nationale et internationale. En effet, la production des dattes n'a cessé de croître ces dernières années (figure 4).

Le secteur dattier occupe la troisième place dans les produits agro-alimentaires exportés après l'huile d'olive et les produits de la mer. Il représente selon le GID (2014) :

- 4 % de la valeur totale de la production agricole ;
- 7 % de la valeur de la production du secteur de l'arboriculture ;
- 13 % de la valeur totale des exportations des produits agroalimentaires.

Actuellement, la Tunisie est le principal acteur sur le marché international des dattes de qualité supérieure. La variété *Deglet-Nour*, constitue la quasi-totalité des tonnages exportés, elle est considérée comme un produit de luxe relativement cher pour les ménages tunisiens et qui jouit d'une bonne image de marque sur les marchés européens, où elle est vendue branchée, à l'état naturel et sans transformation (Besbes et al., 2009).

2.3 . La datte

2.3.1 . Définition

La datte est une baie, de forme généralement allongée, oblongue ou ovoïde. Elle est constituée de deux parties (Figure 5) :

- Une partie non comestible de la datte, formée par la graine ou le noyau, ayant une consistance dure.
- Une partie comestible, dite aussi chaire ou pulpe, comporte une enveloppe fine cellulosique, l'épicarpe. La graine est entourée par une zone interne de teinte plus claire et de texture fibreuse, l'endocarpe, réduite à une membrane parcheminée. Les deux sont séparés par le mésocarpe charnu et fibreux dont la consistance varie selon les variétés, le climat ainsi que la période de maturation (Dowson et Aten, 1963).

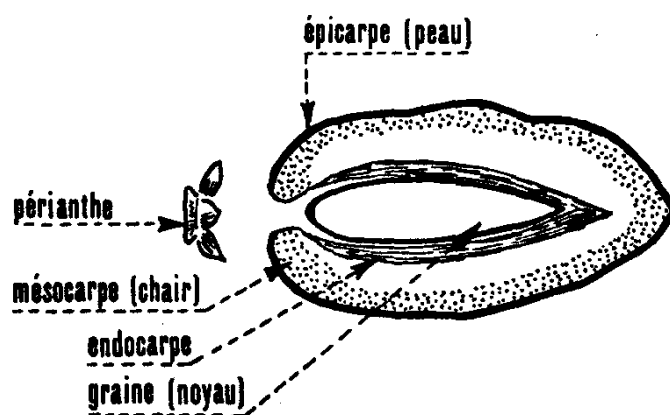


Figure 5. Coupe schématique d'une datte (Munier, 1973).

La forme, la taille et la couleur des fruits varient selon la variété. Leurs dimensions sont très variables de 1,5 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 15 g. Leur couleur varie du blanc jaunâtre au sombre très foncé presque noir, en passant par les ambres, rouges et bruns (Munier, 1973).

2.3.2 . Evolution physiologique de la datte

Depuis la pollinisation jusqu'à la maturation complète de la datte, on peut observer trois types d'évolution physiologique, qui sont (Munier, 1973):

- Une évolution de taille ;
- Une évolution pondérale ;
- Une évolution de la couleur ;

A partir de cette évolution et selon la classification Irakienne on peut classer physiologiquement toutes ces périodes en cinq stades (Dowson et Aten, 1963 ; Munier, 1973) :

- **Stade Hababouk** : Ce stade vient juste après la pollinisation. Il dure de quatre à cinq semaines après la fécondation. Les fruits sont de forme sphérique et ils sont caractérisés par une croissance lente et une couleur verte.
- **Stade Kimri** : Ce stade dure de neuf à quatorze semaines, il se caractérise par une croissance rapide en poids et en volume des dattes, une teneur élevée en eau, une accumulation des sucres réducteurs, une augmentation lente de la teneur en sucres

totaux et une très forte acidité réelle. Les fruits ont une couleur verte et un goût âpre à cause de la présence des tanins.

- **Stade Khalal :** Au début de ce stade, la datte atteint son poids maximum. La couleur vire du vert au jaune puis au rouge et au brun selon les variétés. Ce stade est marqué par un accroissement des sucres totaux. L'acidité et le taux d'humidité vont en diminuant alors que la proportion de saccharose augmente rapidement. Ce stade dure en moyenne quatre semaines.
- **Stade Routab :** La durée de ce stade, où le fruit prend une couleur brune, est de deux à quatre semaines. Ce stade est caractérisé par une légère diminution de poids et de la teneur en eau et une augmentation de la teneur des monosaccharides qui confèrent au fruit un goût sucré.
- **Stade Tamar :** C'est la phase ultime de la maturation. La couleur de l'épiderme devient de plus en plus foncée (Dowson et Aten, 1963). Au cours de ce stade, l'amidon de la pulpe se transforme complètement en sucres réducteurs (glucose et fructose), et en sucres non réducteurs (saccharose) (Djerbi, 1994) ce qui donne un rapport sucres/eau élevé empêchant, ainsi, la fermentation et assurant la conservation du fruit.

2.3.3 . Composition chimique des dattes

Les fruits de dattes sont dotés de teneurs élevées en sucres (73-83%) (Elleuch et *al.*, 2008): glucose, fructose et saccharose (Elarem et *al.*, 2011). Ils contiennent également des protéines, des lipides, des éléments minéraux et des vitamines (Abou-Zeid et *al.*, 1991).

La chair des dattes est composée essentiellement d'eau, des sucres réducteurs (glucose et fructose), des sucres non réducteurs (saccharose), et d'autres composants tels que les éléments minéraux, les vitamines, les enzymes, les pectines, les lipides et les protides (figure 6).

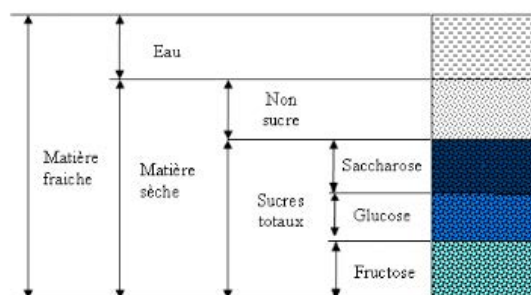


Figure 6. Composition biochimique de la datte (Sawaya et *al.*, 1983).

2.3.3.1 . Teneur en eau

L'eau est l'un des constituants essentiels du fruit. Sa teneur varie aussi bien avec le degré de maturité qu'avec le caractère variétal (Ahmed et *al.*, 1995). Elle a une importance fondamentale sur la stabilité microbienne et biochimique des aliments et agit sur leur conservation. Les dattes sont qualifiées de molles si elles dépassent un taux d'humidité de 30 % (mermella, Lemsi, Allig...) et de sèches si ce taux est de moins de 20 % (Kentichi). Les dattes sont demi-molles si le taux est compris entre 20 et 30 % (comme Garn Gazel) (Reynes et *al.*, 1994).

La teneur en eau peut subir des variations très importantes sous l'action de différents traitements d'hydratation ou de séchage ou sous l'effet de l'absorption de l'humidité de l'air environnant.

2.3.3.2 . La fraction glucidique

Les sucres représentent presque la totalité de la matière sèche soluble des dattes (presque 60 à 70 % du poids total de la chair) ce qui leurs confère une valeur énergétique importante (3 Kcal/Kg de pulpe). La datte contient trois sucres majeurs : le saccharose (non réducteur), le glucose et le fructose (sucres réducteurs), ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres tels que le galactose, le xylose et l'arabinose. La teneur en sucres totaux ainsi que la proportion de sucres réducteurs et de saccharose varient selon les variétés et les stades de maturation (Reynes et *al.*, 1994).

Il existe une relation étroite entre la nature des sucres et le pourcentage d'humidité des dattes. En effet, les dattes molles contiennent généralement des taux de sucres réducteurs plus élevés que leur taux de saccharose. Le cas est inverse pour les dattes sèches (Dowson et Aten, 1963). Le rapport du taux de sucres totaux sur le taux

d'humidité « r » dans les fruits a été défini comme indice de qualité pour la caractérisation des dattes. On distingue alors selon Munier (1973) trois catégories des dattes :

- Les dattes molles : L'indice « r » est inférieur à 2 ;
- Les dattes demi-molles : L'indice « r » est compris entre 2 et 3,5.
- Les dattes sèches : l'indice « r » est supérieur à 3,5.

2.3.3.3 . Les pigments

Les substances colorantes des dattes, mal connues jusqu'à présent, sont variables selon les stades de maturation (couleur verte au stade *Kimri*, jaune tacheté en rose ou en rouge au stade *Khalal* et couleur brune au stade *Routab*) et les variétés. Les principaux pigments des dattes sont (Dawson et Aten, 1963) :

- Les flavones : pigments jaunes de la datte *Barhi* ;
- Les antocyanes : pigments rouges de la datte Deglet Nour.

Les dattes peuvent être considérées parmi les fruits les plus riches en éléments minéraux ce qui leur confère une valeur nutritionnelle et diététique assez importante. La datte « *Deglet-Nour* » contient de 1,15 à 1,90% de cendres (Munier, 1973).

Les membranes cellulaires des dattes sont constituées essentiellement de cellulose. Ce constituant, avec d'autres solides insolubles, représente environ 85% de la matière sèche de la datte verte. Mais, à mesure que la teneur en sucre augmente, le taux de cellulose diminue.

La teneur en amidon varie selon le stade de développement et selon la variété (Bouabidi et *al.*, 1996). Dawson et Aten (1963) avaient indiqué que les fruits, peu de temps après la pollinisation, présentaient une faible teneur en amidon qui disparaissait ensuite entièrement dans la plupart des cultivars à maturité. Cette réserve se transforme en sucres grâce à l'action des enzymes invertases.

Les pectines sont des polymères linéaires de l'aide galacturonique dont une partie des radicaux carboxyles est plus ou moins estérifiée par des radicaux méthyles. Selon leur degré d'estérification, on peut classer les pectines en pectines solubles et pectines insolubles qui sont graduellement converties en pectines solubles (Bouabidi et *al.*, 1996).

Dowson et Aten (1963) affirment que les substances pectiques augmentent quantitativement dans les fruits jusqu'à la maturation et influencent les opérations de fabrication de sirop et de confiture de dattes.

La pulpe de datte contient des vitamines en quantité variable selon les types de dattes et leurs provenances. En général, elle contient des caroténoïdes, de la vitamine C et des vitamines du groupe B en quantité appréciable (Munier, 1973 ; Cance et Widowson, 1993).

La pulpe des dattes contient une faible quantité de lipides. Elle est de l'ordre de 0,13 à 1,9 % du poids total du fruit frais. Cette quantité de lipides est concentrée dans l'épicarpe de la datte, sous forme d'une couche de cires. L'évolution du taux de matière grasse dans les dattes débute par une accumulation aux premiers stades de développement suivie d'une diminution puis une stabilisation à la maturité ; à ce stade ultime de développement le pourcentage est faible (Mrabet et *al.*, 2008).

Les composés aminés jouent un rôle essentiel dans les réactions de brunissement non enzymatiques (réaction de Maillard) qui interviennent lors de la conservation. Les cultivars ayant les teneurs les plus élevées en acides aminés sont soumis à un brunissement rapide lors du stockage (Bouabidi et *al.*, 1996). Les teneurs des différents cultivars en acides aminés totaux sont très hétérogènes : 140,4 mg/100 g MS pour la variété « *Choddak* » contre 507 mg/100 g MS pour la variété « *lemsi* » qui aurait une tendance à un brunissement rapide lors du stockage. Les teneurs en acides aminés de la « *Deglet-Nour* » et du « *Allig* » sont respectivement de 256 mg/100 g MS et 204 mg / 100 g MS (Reynes et *al.*, 1994).

La composition en acides aminés de la pulpe de datte révèle la présence de 18 acides aminés (Ahmed et *al.*, 1995).

Les enzymes jouent un rôle important dans les processus de conservation qui ont lieu pendant la formation et la maturation du fruit. La qualité des dattes, et en particulier sa qualité organoleptique (texture, goût et couleur), dépend en grande partie de leurs activités. Parmi ces enzymes, on peut citer l'invertase et les polyphénoloxydases.

L'invertase est une enzyme responsable de l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose (Mrabet et *al.*, 2008). Son activité augmente au cours de la maturation. En effet, l'accumulation des sucres réducteurs est rapportée à l'accroissement de l'activité de cette enzyme. Une température élevée et une forte teneur en eau favorisent cette inversion (Munier, 1973).

Le polyphénoloxylase est une enzyme responsable du brunissement enzymatique des dattes. Elle est détectée sous forme de traces avant le stade de maturation, son activité reste basse jusqu'au stade tamar où l'activité atteindra son maximum (Mrabet et *al.*, 2008).

3 . Valorisation des sous-produits de dattes

Le secteur phoenicicole fournit à chaque récolte un tonnage non négligeable de déchets. Ces déchets proviennent soit directement des palmeraies, soit des écarts des stations de conditionnement et sont impropres à la consommation en frais. Ces écarts de triage subissent un tri sélectif dont 10 % destinés à l'alimentation du bétail et le reste est traité en vue de la transformation technologique.

La figure 7 illustre les différentes opérations de transformation de la datte et du noyau.

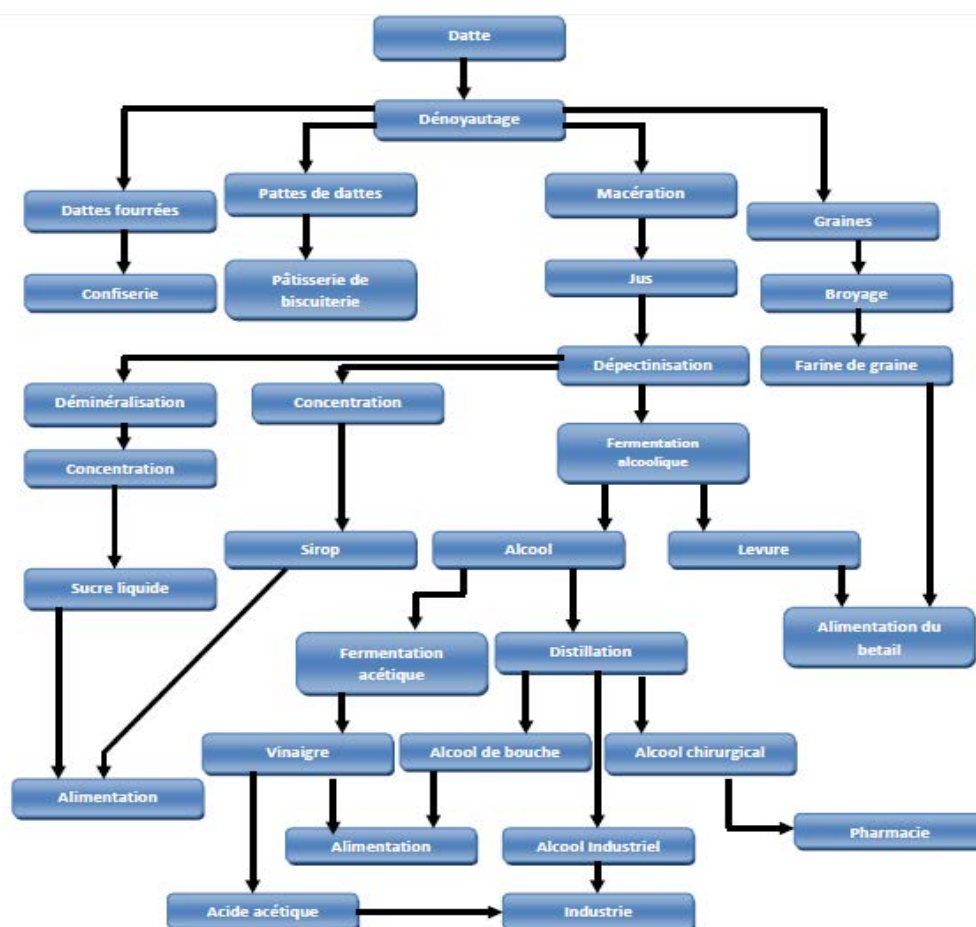


Figure 7. Opération de transformation des dattes (Estanove, 1990).

3.1 . Valorisation technologique

3.1.1 . Pâte de dattes

Les dattes molles et demi-molles peuvent servir à la confection de pâte. On ajoute de la farine de dattes ou de sirop de dattes pour leur donner une consistance convenable. Elle est utilisée en biscuiterie, en pâtisserie et pour la confection de glaces (Munier, 1973).

3.1.2 . Farine de dattes

La farine des dattes est obtenue à partir des dattes séchées. Après nettoyage, les dattes sont dénoyautées et coupées puis séchées jusqu'à humidité inférieure à 5 %. Compte tenu de sa richesse en sucres, cette farine est utilisée en biscuiterie, en pâtisserie et dans la préparation de nombreux produits alimentaires (Munier, 1973).

3.1.3 . Jus de dattes

La fabrication de jus de dattes est connue depuis l'antiquité dans les pays de Moyen orient où on trouve une grande quantité de datte de qualité médiocre destinée à la transformation (Chaira et *al.*, 2007).

Concernant la préparation de jus, les pulpes de datte sont finement hachées et une quantité d'eau est ajoutée (Mahjoub et Jraïdi, 1992), le mélange est ensuite incubé au bain-marie selon un couple temps-température donnée. Puis, on procède à une étape de filtration suivie d'une clarification pour éliminer les déchets et les solides insolubles.

D'après Episard (2002), on peut obtenir après six à dix heures de diffusion, selon la variété, un jus titrant à environ 50 % d'extrait sec soluble mesuré au réfractomètre. Le jus de datte peut être utilisé dans nombreuses préparations alimentaires telles que les boissons gazeuses, le vinaigre, l'alcool, etc (Estanove, 1990).

3.1.4 . Sirop de dattes

Les dattes de qualité secondaire, trop molles ou écrasées, peuvent être utilisées pour la fabrication du sirop (Munier, 1973 ; El-Sharnouby et *al.*, 2009 ; Mostafa et *al.*, 2012). Ce produit bien que d'aspect sombre, est stable et est utilisé comme édulcorant dans de nombreuses préparations pâtisseries et peut également servir comme base à la production de boissons gazeuses et peut remplacer aussi le sucre dans la préparation des crèmes glacées (Mahjoub et Jraïdi, 1992).

3.2 . Valorisation biotechnologique

Les sous-produits de dattes riches en sucres fermentescibles, peuvent être transformés par des procédés biotechnologiques pour obtenir des biopolymères, de biofuel, des acides organiques, des enzymes et autres produits de valeur (Tableau 1).

3.2.1 . Production de biopolymères

Le jus de dattes (sous-produits), constitue un milieu favorable pour la production de biopolymères, comme la gomme xanthane (Besbes et *al.*, 2006), le curdlan (Salah et *al.*, 2011). Le sirop des dattes est valorisé par production des caroténoïdes (Elsanhoty et *al.*, 2012) et de PHB (Omar et *al.*, 2001).

3.2.2 . Production d'acides organiques

Davati et *al.* (2007) et Tavakkoli et *al.* (2012), ont montré que le déchet des dattes constitue un bon milieu pour la production d'acide citrique.

3.2.3 . Production d'antibiotiques

Des chercheurs ont réussi à produire des antibiotiques à partir des sous-produits de dattes. Abou-Zeid et *al.* (1991) ont produit d'oxytétracycline par *Streptomyces rimosus*. Ils ont trouvé que l'ajout de l'urée comme source d'azote et les cendres de noyau de dattes, comme source minérale permettent d'améliorer la production de l'antibiotique.

En utilisant le sirop des dattes Radhwan et *al.* (2010), ont produit de Bleomycine par *Streptomyces mobaraensis*.

3.2.4 . Production de biomasse

Les sous-produits de dattes peuvent servir comme substrat pour la production de levure boulangère (khan et *al.*, 1995).

3.2.5 . Production des enzymes

Des travaux ont été entrepris par des chercheurs qui ont montré qu'un substrat à base de sous produits des dattes, constitue un milieu de culture favorable à la production des enzymes, comme le Pectinase (Qureshi et *al.*, 2008), l'endopectinase (Bari et *al.*, 2010) et l' α -amylase (Acourene et Ammouche, 2012).

3.2.6 . Production de Biofuel

Différents types de biofuels ont été produits à partir des sous-produits de dattes, comme le dihydrogene (Abd-Alla et *al.*, 2011), l'éthanol (Gupta and Kushwaha, 2011; Acourene et Amouche, 2012 ; Louhichi et *al.*, 2013) et le butanol (Abd-Alla et El-Enany, 2012). Cette partie sera développée dans le chapitre III « Production de Biofuel ».

Tableau 1. Valorisation biotechnologique de sous-produit des dattes.

Produits	Substrat	Microorganismes	Références
Biopolymères			
La gomme xanthane	Jus de dattes	<i>Xanthomonas campestris</i>	Besbes et <i>al.</i> , 2006
	Jus de dattes	<i>X. campestris</i> NRRL, B-1459	Salah et <i>al.</i> , 2010
Poly-β-hydroxybutyrate	Sirop de Dattes	<i>Bacillus megaterium</i>	Omar et <i>al.</i> , 2001
Curdlan	Jus de dattes	<i>Rhizobium radubacter</i> ATCC 6466	Salah et <i>al.</i> , 2011
Carotenoïde	Sirop de dattes	<i>Lactobacillus plantarum</i> QS3	Elsanhoty et <i>al.</i> , 2012
Biofuel			
Hydrogen	Dattes pourries	<i>E. coli</i> EGY, <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824, <i>Rhodobacter capsulatus</i> DSMZ	Abd-Alla et <i>al.</i> , 2011
Ethanol	Extrait de Datte	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 36858, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> STAR brand	Gupta and Kushwaha, (2011)
	Sous-produit de Dattes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SDB	Acourene et Amouche (2012)
	Jus de dattes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Louhichi et <i>al.</i> , 2013
	Sirop de dattes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> <i>Candida pelliculosa</i>	Chniti et <i>al.</i> , 2014.
Butanol	Sous-produit de dattes	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	Abd-Alla et El-Enany, (2012)
		<i>Bacillus subtilis</i> DSM 4451	Abd-Alla et El-Enany, (2012)
Biosurfactant	Sirop de dattes	<i>Bacillus subtilis</i> 20B	Al-Bahry et <i>al.</i> , 2013

Acides organiques			
Acide citrique	Sous-produit de dattes	<i>Corynebacterium glutamicum</i> CECT 690 et CECT77	Davati et <i>al.</i> , (2007)
	Sous-produit de dattes	<i>Corynebacterium glutamicum</i> CECT 690	Tavakkoli et <i>al.</i> , (2012)
Biomasse			
Levure boulangère	Sucres de Dattes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (I) <i>S. dastorianus</i> NRRL Y12693 <i>S. cerevisiae</i> (III) <i>S. dayanus</i> NRRL Y-12624 <i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-12632	Khan et <i>al.</i> , (1995)
Probiotiques			
lactobacille	Poudre de dattes	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	Shahravy et <i>al.</i> , (2012)
Antibiotiques			
Bleomycine	Sirop de dattes	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	Radwan et <i>al.</i> , (2010)
Oxytetracycline	Extrait de dates (Pulpe) Noyau de dattes	<i>Streptomyces rimosus</i>	Abou-Zeid et <i>al.</i> , (1993)
Enzymes			
Pectinase	Sirop de dattes	<i>Bacillus subtilis</i> EFRL 01	Qureshi et <i>al.</i> , (2012)
Endopectinase	Déchet de dattes	<i>Aspergillus niger</i> PC5	Bari et <i>al.</i> , (2010)
Alpha amylase	Sous-produits de datte	<i>Candida guilliermondii</i> CGL-A10	Acourene et Ammouche, (2012)

CHAPITRE II. EXTRACTION DE JUS DE DATTES

1 . Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide constitue la première opération de séparation de plusieurs filières de transformations (extraits de fruits) boissons alcoolisées, sucreries, etc...). Elle constitue la charnière au niveau de laquelle, les industries alimentaires prennent le relais du domaine agricole.

Cette opération est très ancienne. Elle est largement utilisée en industrie Alimentaire pour extraire des plantes des composés alimentaires ou pharmaceutiques, par exemple de la production de boissons ou de médicaments.

1.1 . Définition

L'extraction solide-liquide, encore appelé extraction par solvant est une opération de transfert de matière destinée à séparer les principes solubles d'un substrat solide par leur diffusion dans un solvant. Son but est d'extraire, de séparer ou de dissoudre par immersion dans un liquide ou par arrosage par un liquide, un ou plusieurs composants mélangés à un solide. La diffusion est réalisée grâce à l'existence d'un gradient de concentration en soluté à extraire entre la phase solide et la phase liquide. A la fin de l'opération, le système tend vers l'équilibre. Il s'agit normalement d'une opération à pression constante.

L'extraction solide se présente sous plusieurs variantes (percolation, décoction, infusion et macération) avec comme dénominateur commun de faire interagir le solvant sur le matériau solide pour dissoudre ses composés solubles. Les différentes méthodes d'extraction solide-liquide sont comparées dans le tableau 2.

Tableau 2. Différentes méthodes d'extraction solide-liquide

Méthodes	Principes	Température/Temps	Exemple de produits	Références
Percolation	Ecoulement d'un solvant à travers un solide poreux plus ou moins divisé	100°C / quelques secondes ou minutes	Café, thé	(Blumberg et <i>al.</i> , 2008 ; Chambers et <i>al.</i> , 1996)
Décoction	Extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans l'eau bouillante	100°C / quelques minutes	Racine, graine, feuille	(Li et <i>al.</i> , 2009)
Infusion	Extraction de principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir,	25-100°C / quelques minutes	Tisane, thé, composés pharmaceutiques et parfums	Thomas et <i>al.</i> , 2005
Macération	Trempe d'un solide dans un solvant	Température ambiante/ quelques heures à plusieurs mois,	Végétaux, viande, poisson	Wongkittipong et <i>al.</i> , 2004
Elution	Enlever un soluté fixé à la surface d'un solide par contact avec un solvant	Température ambiante/ quelques heures à plusieurs mois,	Polyphénol	Sun et <i>al.</i> , 2010

Les substances à extraire, localisées à l'intérieur des cellules, se présentent sous forme libre alors que celles qui participent à la structure sont liées à d'autres composés. Leurs concentrations varient selon les conditions climatiques de croissance, les conditions de récoltes, l'état de maturité et le conditionnement, c'est pourquoi elles varient beaucoup d'un lot à l'autre et au sein d'un même lot.

Plusieurs auteurs ont tenté de proposer des corrélations pour le coefficient de diffusion en fonction des caractéristiques du soluté. Ces corrélations permettent de le prédire en milieux aqueux et organique avec un écart par rapport aux valeurs expérimentales respectivement de 10% et 25%.

1.2 . Influence du solvant

Les solvants souvent utilisés sont l'eau, les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane), le CO₂ supercritique. Comme dans le cas du soluté, la taille des molécules de solvant exerce une influence sur la diffusion. Il est également question de sélectivité, afin d'extraire le maximum de soluté et le minimum des autres constituants du cytoplasme et plus généralement de la matière végétale. Car il va falloir ensuite séparer le soluté des autres molécules extraites. Le choix d'un solvant à faible viscosité et de masse volumique peu élevée est recommandé pour faciliter la diffusion dans le solvant, l'agitation et la séparation mécanique (Leybros et Fremeux, 1990).

Le choix du solvant se fait selon plusieurs critères :

- La solubilité des composants spécifiques dans le solvant,
- La régénération du solvant si celui-ci doit être réemployé. Il ne doit pas former d'azéotrope avec un des composés qu'il solubilise et sa chaleur latente doit être faible,
- La tension interfaciale et la viscosité, car le solvant doit correctement mouiller la matrice solide,
- Idéalement il doit être non toxique, stable, non réactif, non inflammable, inoffensif pour l'environnement et peu coûteux.

Dans l'industrie alimentaire ou pharmaceutique, le choix du solvant est très important. Les normes et les règles d'hygiène et de sécurité sont très strictes. Il ne doit pas en rester dans les produits finaux ou bien les traces doivent être suffisamment insignifiantes pour être inoffensives. De manière pratique, les ateliers disposent souvent d'un « parc » de solvants. Le choix est souvent restreint à ce groupe de solvants qui sont connus, maîtrisés et acceptables.

1.3 . Influence de la température

Une augmentation de la température entraîne une augmentation de la solubilité et la diffusivité de la solution et réduit sa viscosité. Mais elle augmente aussi la perméabilité des parois cellulaires et donc diminue la sélectivité. La température opératoire est limitée par les risques de dégradation thermique des produits et par la sécurité de l'installation en présence de solvants.

Par exemple, Chambers et *al.*, (1996) ont étudié la cinétique lors de l'extraction d'un soluté des oranges. Ils mettent en évidence l'influence de la température sur la vitesse d'extraction mais également son implication dans la dégradation du soluté. Son augmentation facilite la diffusion. Mais il faut trouver un compromis car à température élevée (80°C), au bout d'un certain temps la cinétique décroît suite à l'altération de l'extrait. La température favorise aussi l'éclatement des cellules (Wongkihipong et *al.*, 2004) et entraîne la récupération d'un jus plus concentré en ballast. Celui-ci représente l'ensemble des éléments extraits de la plante en dehors du soluté, comme la chlorophylle par exemple.

1.4 . Influence de l'agitation

Une agitation mécanique des particules dans le solvant permet le maintien en suspension de celles-ci et l'homogénéisation du milieu. Elle a donc une grande influence sur le transfert de matière à l'interface solide-liquide.

1.5 . Influence de l'humidité

En règle générale, les matières végétales sont séchées pour faciliter leur conditionnement et surtout leur stockage. Un surplus d'humidité peut donc détériorer le substrat. De plus, lors de l'utilisation de solvants hydrophobes, la diffusivité est inversement proportionnelle à la teneur en eau du solide (Leybros et Fremeaux, 1990).

CHAPITRE III. PRODUCTION DE BIOFUEL

1 . Le Butanol

Le butanol est considéré comme un biocarburant potentiel, car sa teneur en énergie est proche de celle de l'essence. Il est donc plus facile à manipuler. (Ni et Sun, 2009). L'indice octane d'un carburant est très important ; plus l'indice d'octane est élevé, plus le carburant résiste à l'auto-inflammation. Le butanol avec un indice d'octane de 78 à 96, est donc similaire à l'essence telle qu'illustré au Tableau 3 qui présente un comparatif de certaines propriétés de différents carburants.

Tableau 3. Propriétés du butanol (Dürre, 2007 ; Lee et *al.*, 2008)

Propriétés	Butanol		
Point d'ébullition (°C)	117,7		
Température d'inflammation (°C)	35		
	Propriétés des carburants		
	Butanol	Essence	Ethanol
Densité d'énergie (MJ/L)	29,2	32	19,6
Chaleur de vaporisation (MJ/Kg)	0,43	0,36	0,92
Indice d'octane recherché	96	91-99	129
Indice d'octane moteur	78	78-89	102

1.1 . Production de butanol

1.1.1 . Production par voie chimique

Le butanol peut être produit par trois processus important : (Dürre, 2007 ; Lee et *al.*, 2008 ; Qureshi et Ezeji, 2008) :

- La synthèse « Oxo » (hydroformylation) : le monoxyde de carbone et l'hydrogène sont ajoutés à la liaison double du carbone-carbone à l'aide d'un catalyseur comme le cobalt (Co), le rhodium (Rh) ou le ruthénium (Ru). La première étape produit de l'aldéhyde qui est ensuite hydrogéné pour produire du butanol.
- La synthèse « Reppe » : le propylène, le monoxyde de carbone et l'eau interagissent en présence d'un catalyseur pour donner directement le butanol à une faible température et à une faible pression.
- L'hydrogénation crotonaldehyde : consiste à la condensation de l'acétaldéhyde, sa déshydratation et son hydrogénation.

1.1.2 . Production par voie biologique

La production biologique de butanol, connue sous le nom d'ABE (Acétone, Butanol, Ethanol) a prospéré au début du 20^{ème} siècle et elle est devenue le deuxième le plus grand processus de fermentation industrielle dans le monde, après celui de l'éthanol.

Actuellement, les recherches sur l'optimisation de la production du butanol par fermentation se concentrent sur la conversion du résidu agricole et industriel en butanol, sur la performance des souches *Clostridium* productrices de butanol, ainsi que sur les techniques de récupération du butanol (Dürre, 2007 ; Ni et Sun, 2009).

Le butanol peut être fabriqué, à partir des produits de l'agriculture tels que le maïs, le betterave, la canne à sucre, le blé,... . Toutefois, le principal inconvénient de produire ce biocarburant à partir des produits agricoles et la disponibilité de ces ressources et aussi leur coût de production. Ces derniers sont les facteurs importants qui influencent le coût des biocarburants (Qureshi et *al.*, 2008). Il est donc primordial de pousser les recherches plus loin, pour une énergie propre, à quantité suffisante et à des coûts raisonnables, qui ne rentreront pas en concurrence avec les débouchés alimentaires.

2 . Le Bioéthanol

Le bioéthanol est le produit de la fermentation alcoolique (ou éthanolique) des fruits, des céréales, des tubercules et des végétaux riches en sucres (Figure 8) (Demirbas, 2007).

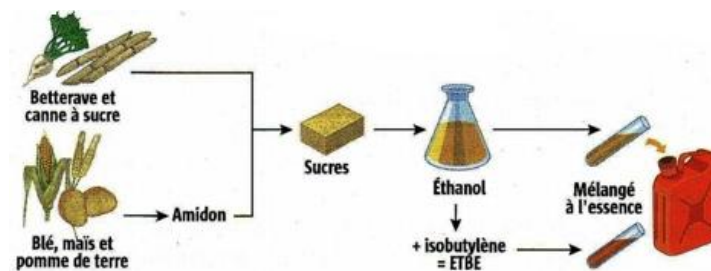


Figure 8. Transformation des sucres contenus dans les végétaux en éthanol (Cabal et Gatignol, 2015).

2.1 . La fermentation alcoolique

Au cours de la fermentation alcoolique, les sucres fermentescibles contenus dans le grain sont convertis en éthanol (alcool éthylique) et en gaz carbonique par l'action des microorganismes, principalement des levures. (Figure 9) (Kaidi et Touzi, 2001).

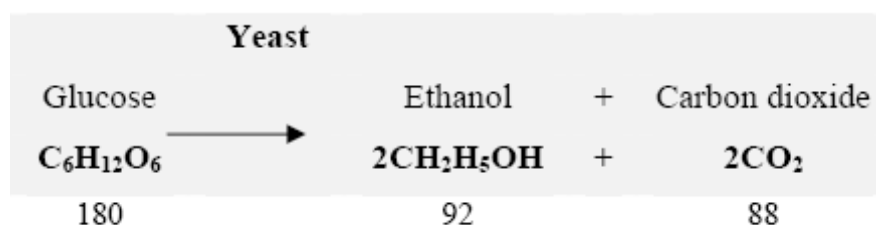


Figure 9. Conversion de glucose en éthanol (Smith et *al.*, 2006).

2.2 . Microorganismes utilisés

Une grande variété de microorganisme produit de l'éthanol à partir de polysaccharides. Cependant, peu sont réellement compétitifs en termes :

- De rendement en éthanol par rapport au substrat consommé
- De capacité fermentaire
- De tolérance à l'éthanol élevée
- D'adaptation aux conditions de fermentation.

2.2.1 . Les bactéries

Les bactéries capables de réaliser la fermentation alcoolique sont peu nombreuses. Les plus utilisées sont *Zymomonas mobilis* (Sadae et Batista, 2003 ; Bai et *al.*, 2008 ; Patle et *al.*, 2008 ; Yanase et *al.*, 2012; Zhao et *al.*, 2014) et *Bacillus subtilis* (Romero et *al.*, 2007)

2.2.1.1 . La bactérie bacillus

2.2.1.1.1 . Identification phénotypiques et profil biochimique

L'espèce *Bacillus* est une bactérie Gram positif dont la coloration est variable, avec certaines espèces qui se colorent clairement comme le Gram positif dans les jeunes cultures uniquement. Elles ont des cellules en formes de bâtonnet avec des extrémités rondes ou carrées dont la taille varie de 0,5 x 1,2 à 2,5 x 10 µm, elles peuvent se présenter individuellement ou en chaîne, et la stabilité de ces chaînes détermine la forme de la colonie, qui peut varier d'une souche à l'autre (Logan et De Vos, 2009 ; Rooney et *al.*, 2009).

Alors que la plupart des espèces sont aérobies, certaines sont anaérobies facultatives ou strictes (Logan et De Vos, 2009 ; Murray et *al.*, 1995). Les espèces *Bacillus* sont capables de former des spores qui peuvent être cylindriques, ovales, rondes ou réniformes.

2.2.1.1.2 . Identification moléculaire

Le genre *Bacillus* est vaste, avec 11 sous-groupes phylogéniques et plus de 140 espèces (Logan et De Vos, 2009). Grâce à l'analyse des séquences génétiques ADNr 16S. Il est difficile de distinguer la souche *B. Subtilis* des espèces étroitement apparentées *Bacillus*, en particulier l'espèce *B. amyloliquefaciens* (Ash et *al.*, 1991 ; Logan et De Vos, 2009) ; toutefois, l'espèce *B. amyloliquefaciens* affiche des différences distinctes dans la séquence génétiques de l'ARN ribosomique 16S : L'absence de deux sites de restriction *RsaI* dans la région V3 qui la différencie de l'espèce *B. subtilis* (Jeyaram et *al.*, 2011). Le manque des sites *RsaI* est caractéristique de l'espèce *B. amyloliquefaciens* a été observé dans la séquence génétique de l'ARN ribosomique.

2.2.2 . Les levures

Les microorganismes les mieux adaptés à la production d'éthanol à partir de sucres fermentescibles sont les levures du genre *Saccharomyces* (Brandberg et *al.*, 2007 ; Lalue et *al.*, 2002 ; Olofsson et *al.*, 2008 ; Sanchez et Cardona, 2007 ; van Dijken et *al.*, 1993) et *Kluyveromyces* (Limtong et *al.*, 2007).

3 . La levure

3.1 . Caractéristiques structurelles

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

physiologique ; lorsqu'elles se trouvent dans des conditions favorables (milieu de culture, température, pH, aération, etc.) elles peuvent se diviser activement par bourgeonnement. La taille d'une levure peut varier entre 1 et 5 μm en largeur et 1 à 9 μm en longueur.

3.1.1 . Paroi cellulaire

Les principaux rôles de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* sont de maintenir une structure élastique qui assure une protection osmotique et qui constitue une barrière physique (Martin-Yken et *al.*, 2003).

La structure de la paroi est constituée de différents composés macromoléculaires complexes tels que des polysaccharides (β -glucanes, de mannanes et chitine), des protéines et des lipides, assemblés par des liaisons covalentes (Suarit et *al.*, 1988 ; Parou et *al.*, 1997; Lipke et Ovalle, 1998).

3.1.2 . Membrane plasmique

La membrane cellulaire est formée d'une double couche de lipides contenant un mélange de lipides polaires et de protéines qui, par leurs interactions, assurent la structure de la membrane. La membrane cellulaire contient notamment des protéines impliquées dans le transport des solutés, la traduction du signal, l'ancrage du cytosquelette et dans la synthèse de composants extérieurs de la membrane (Van der Rest et *al.*, 1995 ; Cot et *al.*, 2007).

La composition lipidique de la membrane cellulaire est complexe et étroitement régulée, suggérant un rôle précis des lipides dans l'activité des protéines membranaires. Les lipides annulaires, qui sont en contact direct avec les protéines, semblent servir à stabiliser les protéines dans une conformation fonctionnelle (Van der Rest et *al.*, 1995).

La plupart des travaux de recherche se sont concentrés sur les changements de la composition lipidique de la membrane et les effets protecteurs de certains composés vis-à-vis du stress éthanol. D'autres données suggèrent que la composition lipidique pourrait avoir un rôle important dans la tolérance aux stress en général et que les niveaux de résistance sont probablement régis par des proportions différentes des composés lipidiques plutôt que par une corrélation simple et linéaire entre la quantité de lipides spécifiques et la tolérance au stress (Prashant et Rajendra, 1989 ; Sajbidor et *al.*, 1995 ; Swan et Watson, 1999).

Il a été montré que des cellules enrichies en acides gras polyinsaturés possèdent une plus grande tolérance à l'éthanol, que des cellules enrichies avec des acides gras monoinsaturés (Watson et Rose, 1980). Selon Rozes et *al.*, (1992), l'éthanol induit la synthèse d'ergostérol avec une augmentation préférentielle de la proportion d'acides gras insaturés, particulièrement en palmitoleate et en oleate, par rapport à leurs homologues saturés (le palmitate et le stéarate). Alexandre et *al.*, (1994) ont suggéré que ces augmentations des proportions d'ergostérol et des niveaux d'acides gras insaturés seraient impliquées dans la tolérance à l'éthanol. Chi et Arneborg (1999) ont montré qu'une souche *S. cerevisiae* est plus tolérante à l'éthanol lorsque le ratio ergostérol/phospholipides est élevé.

Mais les avis divergent en 1999 avec les travaux de Swan et Watson: selon leurs travaux, il n'y a aucun rapport évident entre la composition des acides gras et la tolérance au stress ; ils ont rapporté qu'un enrichissement des membranes en acide oléique (18:1)

aboutit à une résistance au stress plus importante qu'avec un enrichissement en acide linoléique (18:2).

3.2 . Métabolisme et conditions de croissance

Plus de 95% de la production mondiale d'éthanol par fermentation utilise la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Pour produire efficacement l'éthanol, la levure doit posséder un nombre important de « propriétés » : tolérance à l'éthanol et à des températures élevées, capacité fermentaire élevée (faible production de co-produits), capacité d'assimilation de différents substrats, propriétés de floculation et/ou de sédimentation, osmotolérance, stabilité génétique.

3.2.1 . Exigences nutritionnelles

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est auxotrophe à certaines molécules qui lui sont nécessaires en faible quantité. Outre le substrat, principale source énergétique de la levure et classiquement apporté sous forme de glucose, des composés tels l'azote, le phosphore, le soufre, certains acides aminés, les vitamines et les oligo-éléments sont indispensables à son développement (Tableau 5). Parmi les éléments majeurs présents dans un milieu de culture, on s'attardera plus spécifiquement sur les rôles de l'azote, du soufre et du phosphore.

3.2.1.1 . L'azote

Les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* contiennent 10% environ (de la masse sèche de la cellule) d'azote ; il doit donc être présent dans le milieu de culture pour être assimilé (Thomas et Ingledew, 1992). En général une quantité importante d'azote extracellulaire est apportée sous la forme de sels d'ammonium (phosphate, sulfate, chlorure et nitrate). La levure peut utiliser des sources d'azote différentes tels les acides aminés, les peptides, les bases simples (Choline, bétaine), mais l'azote sous forme d'ion ammonium est plus facilement assimilable (Winter, 1989). Il est transporté de façon passive et incorporé par transamination après une réaction de fixation sur le glutamate nécessitant une hydrolyse d'ATP (Jones et *al.*, 1981).

3.2.1.2 . Le 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 et *al.*, 1981), ainsi qu'à la synthèse des lipides et des hydrates de carbone (Winter, 1989).

3.2.1.3 . Le soufre

Le soufre est assimilé généralement sous forme inorganique SO_4^{2-} . Il est transformé dans la cellule sous forme d'un acide aminé, la méthionine.

3.2.1.4 . Les oligo-éléments

Parmi les oligo-éléments, on distinguera trois classes principales : macro-éléments (tels que K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cl^-) nécessaires dans une gamme de concentration de 0,1 à 1mM ; les micro-éléments (tels que Co^{2+} , B^{2+} , Cd^{2+} , Cr^+ , Cu^{2+} , I^- , Mo^+ , Ni^{2+}) nécessaires dans une gamme de concentration de 0,1 à 100 μM et les inhibiteurs (tels que Ag^+ , As^{3-} , Hg^{2+} , Li^+ , Ni^{2+} , Pd , Se^{2-}) qui au dessus d'une gamme de concentration variant de 10 à 100 μM , affectent la croissance et les capacités fermentaires de la levure (Würmienne et *al.*, 1984 ; Dombek et Ingram, 1986 ; Birch et Walker, 2000 ; Ferreira et *al.*, 2004).

Les oligo- éléments sont nécessaires à la croissance du microorganisme et à la production d'éthanol. Les rôles des principaux oligo-éléments sont rassemblés dans le tableau 5.

Tableau 4. Récapitulatif des principaux oligo-éléments (Jones et *al.*, 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^{2+}	
	B^{2+}	

3.2.1.5 . 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

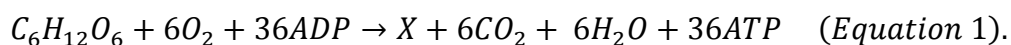
(Winter, 1989). Ces vitamines jouent un rôle majeur dans la tolérance à l'éthanol et leur mode d'apport conditionne également le paramètre « tolérance » (Alfenore et *al.*, 2002).

3.2.2 . Métabolisme

La physiologie de la levure est caractérisée par son comportement métabolique. Les conditions environnementales et la nature de la source carbonée orientent le métabolisme de la levure qui peut être : soit purement oxydatif, soit oxydo-réductif soit fermentaire.

3.2.2.1 . Métabolisme oxydatif

Il se caractérise par une oxydation complète du glucose via les voies métaboliques de la glycolyse, du cycle de Krebs (Figure 10) et de la phosphorylation oxydative pour la production exclusive de biomasse (X) et de dioxyde de carbone. Un tel métabolisme nécessite des conditions de mise en oeuvre particulières : présence d'oxygène et concentration en limitation de substrat (150 mg.L^{-1} environ) afin d'éviter un changement métabolique vers la production d'éthanol et autres co-métabolites (effet *Crabtree*). Les différentes enzymes qui catalysent les réactions du cycle de Krebs sont localisées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans la matrice mitochondriale. Le bilan énergétique théorique maximal de cette voie métabolique est décrit par l'équation suivante :



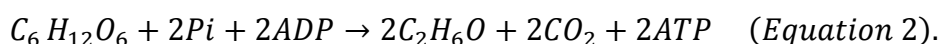
Le rendement de conversion du glucose en biomasse en métabolisme oxydatif dépend de la souche. Le rendement théorique limite est $Y_{X/S} = 0,5 \text{ g.g}^{-1}$ (Postma et *al.*, 1989). Le cycle de Krebs permet la production de co-enzymes réduits NADH et FADH₂ et aussi la synthèse des nombreux précurseurs nécessaires à la formation des principales macromolécules. La phosphorylation oxydative permet la régénération des co-enzymes réduits NADH et FADH₂ produits lors de la glycolyse. Les électrons libérés sont transférés à l'oxygène moléculaire pour former une molécule d'eau. Les protons exportés permettent de maintenir le potentiel transmembranaire entre l'espace intermembranaire et la matrice de la mitochondrie.

De cette manière, l'entrée des protons à l'intérieur de la mitochondrie permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique grâce aux l'ATPases membranaires. L'efficacité de la chaîne respiratoire est illustrée par le rapport du nombre de moles d'ATP formées par atome d'oxygène consommé, représenté par P/O, qui peut

varier selon la souche considérée. La valeur du rapport P/O est fréquemment sujet à polémique ; pour *Saccharomyces cerevisiae*, un nombre inférieur à 2 est souvent rapporté (Bruinenberg et al., 1983). D'autres études réalisées avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur différents substrats en culture aérobie ont montré que la valeur moyenne de la relation P/O peut varier entre 1,2 et 1,3 (Nielsen et Villadsen, 2003).

3.2.2.2 . Métabolisme fermentaire

Le plus généralement, ce métabolisme est décrit comme l'ensemble des réactions qui se réalisent en l'absence d'oxygène comme accepteur final d'électrons. Cette fonction est alors assurée par des molécules organiques. La cellule utilise d'abord le NAD⁺ comme accepteur intermédiaire d'électrons qui est réduit en NADH. La réduction finale de l'acétaldéhyde en éthanol et en dioxyde de carbone permet ainsi de maintenir l'équilibre de la balance redox en réoxydant les NADH produits au cours de la glycolyse (figure 10) qui est la voie principale de dégradation du sucre en pyruvate. Le bilan énergétique de la transformation du glucose en éthanol est décrit par :



Le rendement théorique limite ($Y_{P/S}$) de conversion de glucose en éthanol est de 0,511 gramme d'éthanol par gramme de glucose. Ce rendement ne tient pas compte du fait qu'une partie du glucose est transformée en biomasse (moins de 0,1 g.g⁻¹ environ) et en co-produits. Ainsi le rendement réel correspond à 80-90 % du rendement théorique limite, les rendements obtenus expérimentalement sont en général moins élevés de l'ordre de 0,4 g.g⁻¹ (Käpelli, 1986 ; Lebeau et al., 1998 ; Alfenore et al., 2004 ; Alfenore et al., 2006 ; Minter, 2006 ; Jeihanipour & Taherzadeh, 2009).

3.2.2.3 . Métabolisme oxydo-réductif

Chez certains genres microbiens, comme *Saccharomyces cerevisiae*, un excès de glucose en aérobiose fait basculer le métabolisme oxydatif vers un métabolisme oxydoréductif, condition communément appelée effet *Crabtree*; *Saccharomyces cerevisiae* étant sensible au glucose, cette levure est définie comme une levure crabtree positive. Les cultures aérobies en mode continu (chémostat) sont le meilleur moyen de mettre en évidence ce changement de métabolisme en contrôlant le taux de croissance (μ) par le flux de sucre. En réalisant des cultures oxydatives en limitation de glucose, la levure peut se

comporter de deux manières différents : pour des taux de croissance inférieurs à un taux de croissance critique ($\mu < \mu_{crit}$), la levure présente un métabolisme purement oxydatif ; pour des taux de croissance supérieurs à ce taux de croissance critique ($\mu > \mu_{crit}$) le métabolisme devient oxydo-réductif, une production d'éthanol (Figure 10) et une chute du rendement de production de biomasse, cette transition correspond à l'effet *Crabtree*.

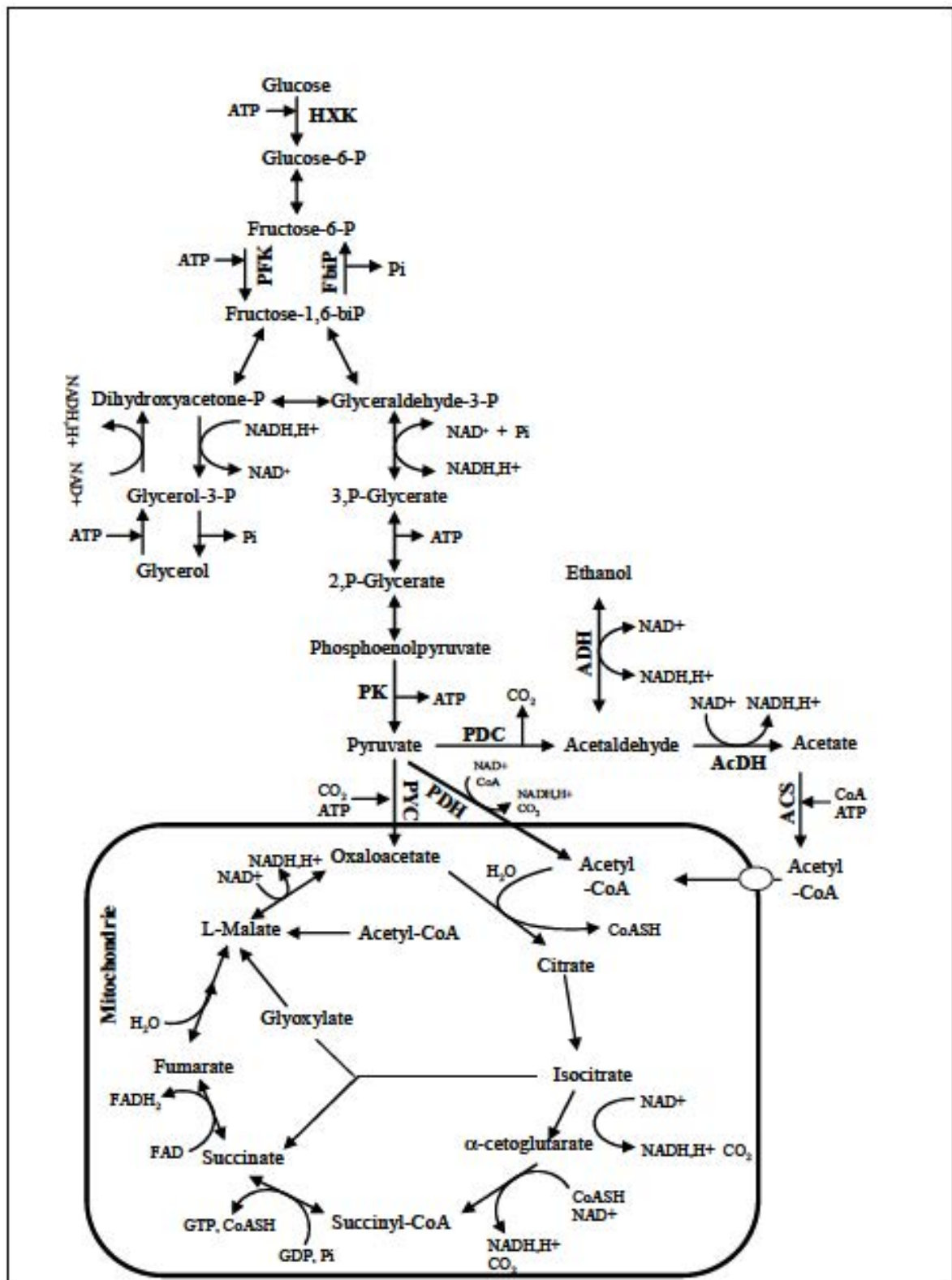


Figure 10. La glycolyse et le cycle de Krebbs. Où HxK : hexokinase ; PFK : Phosphofructokinase ; FbpP : fructose bi-phosphatase ; PK : Pyruvate kinase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; PDC : pyruvate decarboxylase ; ADH : alcool déshydrogénase ; AcDH : acétaldéhyde déshydrogénase ; ACS : acetyl-CoA synthase (Poilpré, 2002).

Une autre interprétation du shift métabolique chez la levure (oxydatif/oxydo-réductif) est basée sur le phénomène d'*overflow* du carbone au niveau des noeuds pyruvate et acétaldéhyde (Figure 11). Au niveau du noeud pyruvate, la pyruvate déshydrogénase a

une affinité plus forte pour le pyruvate que la pyruvate décarboxylase, mais sa vitesse maximale est plus faible. Aux faibles flux glycolytiques, le pyruvate est converti via le pyruvate déshydrogénase vers le cycle de Krebs. Quand le flux glycolytique dépasse une valeur critique, l'enzyme pyruvate déshydrogénase est saturée et de l'acétaldéhyde est formé.

Il en est de même au niveau du noeud acétaldéhyde (Figure 11). Celui-ci est préférentiellement converti en acide acétique mais lorsque l'acétaldéhyde déshydrogénase est saturé, l'acétaldéhyde serait transformé en éthanol (Lei et *al.*, 2001).

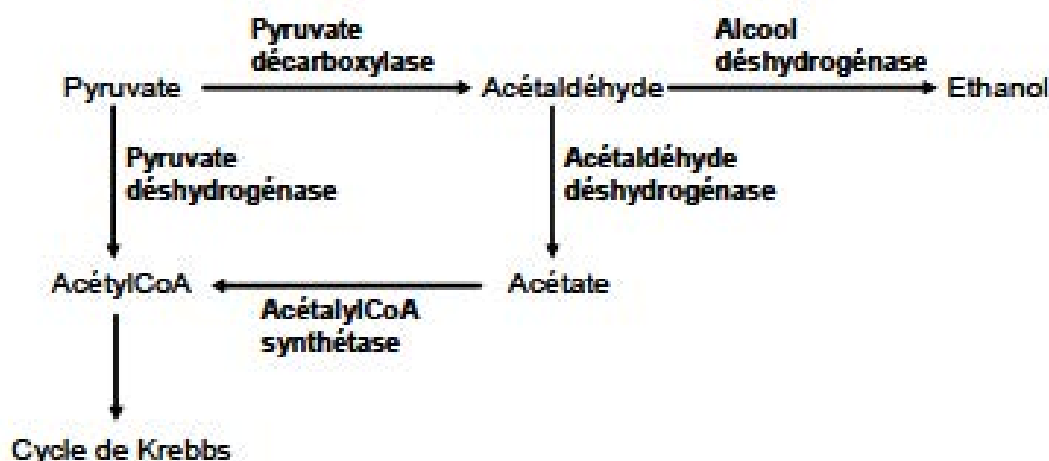


Figure 11. Nœud métabolique du pyruvate et de l'acétaldéhyde (Lei et *al.*, 2001).

4 . Procédés de fermentation

La production d'éthanol a fait l'objet de très nombreux travaux académiques et industriels afin d'améliorer les performances des procédés de production. Il existe plusieurs modes de conduite et de configuration du bioréacteur, qui sont primordiaux et doivent être déduites du métabolisme du microorganisme afin d'optimiser ses capacités de production (Fadel et *al.*, 2013).

4.1 . Fermentation Batch

La culture en mode batch permet de considérer le réacteur comme un système fermé contenant une quantité fixée de milieu de culture, on inocule avec des microorganismes ayant éventuellement subi plusieurs phases d'adaptation. La culture en mode batch est caractérisée par une productivité faible, limitée par les concentrations en biomasse liée à la concentration maximale admissible en substrat évitant toute inhibition des capacités fermentaires du microorganisme.

4.2 . Fermentation fed-batch.

On peut décrire les cultures en mode fed-batch comme des cultures alimentées de façon séquentielle ou continue, éléments nutritifs et substrats. La conduite en mode fed-batch permet d'atteindre de plus hautes concentrations en biomasse et produits que le mode batch en évitant l'inhibition par la concentration en substrat et la limitation en éléments nutritifs et en réduisant les effets toxiques des produits par dilution lors des apports (Roukas, 1994 ; Ward, 1989).

4.3 . Fermentation en mode continu

Le réacteur en mode continu est un système ouvert, dans lequel le milieu de culture est continûment additionné et le milieu de fermentation qui contient les métabolites produits, est continûment extrait, avec un volume réactionnel constant (Ward, 1989). La fermentation en mode continu peut combiner une cuve et un système de recyclage cellulaire ; dans ce cas une fraction de la biomasse cellulaire est recyclée dans la cuve (Lee et Chang, 1987 ; Warren et *al.*, 1994; Djelal et *al.*, 2012a). La fermentation en mode continu permet l'obtention de productivités élevées (Vasconcelos et *al.*, 2004), 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. En ce sens, plusieurs techniques ont été couplées telles que l'évaporation, l'extraction avec des solvants et filtration membranaire (Kargupta et *al.*, 1998) comme cela est développé dans le paragraphe suivant.

4.4 . Le Bioréacteur à recyclage cellulaire

Les réacteurs continus à recyclage cellulaire sont les mieux adaptés pour combiner l'obtention des hautes concentrations en biomasse, le découplage entre le temps de séjour de la biomasse et du liquide pour la maîtrise de l'environnement et le soutirage des produits, éventuels composés inhibiteurs du métabolisme. Les bioréacteurs bi-étagés présentent l'avantage de pouvoir découpler la production de biomasse de celle du produit lorsque le modèle biologique le permet (Aldiguier et *al.*, 2004). Entre tous les systèmes développés pour augmenter les performances des procédés biologiques, les bioréacteurs à membrane ont permis l'obtention des meilleurs résultats comparés aux autres procédés de séparation pour le recyclage des cellules (centrifugation, floculation et décantation)

(Aldiguier et *al.*, 2004 ; Lafforgue et *al.*, 1987 ; Escobar et *al.*, 2001 ; Mercier-Bonin et *al.*, 2001).

Parmi les bioréacteurs utilisant des modules de filtration membranaire, deux types sont disponibles : filtration frontale et filtration tangentielle. La limite du procédé provient du colmatage des membranes. La filtration frontale conduit à un colmatage plus rapide que la filtration tangentielle (Chang et *al.*, 1994). Le module de filtration tangentielle peut être interne ou externe au bioréacteur. La filtration tangentielle est la méthode la plus fréquemment utilisée pour augmenter la concentration en biomasse viable dans les réacteurs à recyclage cellulaire car elle permet d'avoir un réacteur homogène avec un meilleur contrôle de la viabilité. Parmi les résultats les plus notables :

- En mode continu avec recyclage de biomasse dans un bioréacteur mono-étagé muni d'une boucle externe de microfiltration, de très hautes concentrations en biomasse ont été obtenues expérimentalement de l'ordre de 300 g Masse sèche/L (Lafforge et *al.*, 1994 ; Lafforge et *al.*, 1987).
- le recyclage cellulaire utilisant un module de filtration externe a donné des résultats positifs concernant le maintien d'une haute concentration cellulaire dans le bioréacteur (Chang et *al.*, 1994).
- Du point de vue de la productivité, en mode continu à recyclage cellulaire avec un seul fermenteur, Park et *al.*, (1999) ont obtenu une productivité de $13 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, cette valeur correspond à 3,3 fois la productivité en éthanol obtenue par fermentation en mode continu conventionnel (chémostat) sans recyclage cellulaire. Lee et Chang (1987) ont obtenu une productivité de $85 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ avec une concentration d'éthanol de 65 g.L^{-1} , une concentration en biomasse de 210 g Masse Sèche/L lors de cultures en fermenteur couplé avec un module d'ultrafiltration externe. Aldiguier et *al.*, (2004) et Ben Chaabane et *al.*, (2006) ont stabilisé un régime permanent de 20 h, une concentration en éthanol a été maintenue autour de 65 g.L^{-1} à une concentration en biomasse de 160 g.L^{-1} et une concentration en substrat résiduel proche de zéro ; ces conditions ont permis l'obtention d'une productivité de $41 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

5 . Notion de stress chez les levures

5.1 . Facteurs influençant le métabolisme de la levure

La notion de stress en biotechnologie est difficile à définir ; on peut le considérer comme l'ensemble des conditions qui provoquent des changements de processus physiologiques conduisant éventuellement à des dégâts, dommages, blessures, inhibition de croissance ou du développement. Graumlich et *al.*, (1979) définissent le stress comme une force ou une influence hostile qui tend à empêcher un système de fonctionner normalement. Suite à cette définition, on pourrait considérer le stress comme des variations effectuées dans le milieu de culture de la levure qui affectent son comportement et par conséquent ses capacités de croissance et de production. Les causes de ce stress peuvent être multiples et peuvent provoquer différentes « réponses dynamiques » du microorganisme à différents niveaux (macroscopique, microscopique, moléculaire), comme par exemple une modification du métabolisme cellulaire, des capacités de croissance et des fonctions physiologiques, des rendements et des productivités. Un certain nombre de paramètres comme la composition du milieu de culture (Gancedo, 1998 ; Bafmcova et *al.*, 1999 ; Oliveira et *al.*, 1999 ; Alfenore et *al.*, 2002 ; Voit, 2003 ; Wang et *al.*, 2007), le mode de conduite du procédé (Schügerl, 2000 ; Gryta et *al.*, 2000 ; Escobar et *al.*, 2001 ; Takaya et *al.*, 2002 ; Kourkoutas et *al.*, 2004 ; Gibson et *al.*, 2007 ; Lei et *al.*, 2007), la pression osmotique (Gervais et Beney, 2001, Beney et *al.*, 2001 (a,b) ; Mager et Siderius, 2002 ; Laroche et Gervais, 2003 ; Laroche et *al.*, 2005 ; Fullerton et *al.*, 2006 ; Yokozeiki, 2006 ; Djelal et *al.*, 2005), la température (Laluce et *al.*, 2002 ; Aldiguiet et *al.*, 2004), l'accumulation d'éthanol (Alfenore et *al.*, 2004 ; Bai et *al.*, 2004 ; Giannattasio et *al.*, 2005 ; Tagaki et *al.*, 2005 ; Canetta et *al.*, 2006 ; Hirasawa et *al.*, 2007 ; Lei et *al.*, 2007 ; Wei et *al.*, 2007) et la formation de sous-produits (Nevoigt et Stahl, 1997 ; Samokhvalov et *al.*, 2004 ; Ferreira et *al.*, 2004 ; Karasu et Özbaz, 2004) peuvent influencer le métabolisme et les capacités dynamiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

En fermentation alcoolique, l'éthanol semble représenter la principale cause de stress pendant la culture (Martini et *al.*, 2004). En réponse à ces perturbations externes, la cellule va réagir passivement ou activement en essayant de prévenir la dénaturation de l'intégrité cellulaire et sa perte d'activité. Le mode de réponse actif est généralement considéré comme une modification métabolique consommant de l'énergie (modification de la synthèse des molécules intracellulaires et/ou de la composition lipidique de la membrane

plasmique, de la morphologie de la cellule, de la composition intracellulaire). Par contre, la réponse passive dépend seulement de la vitesse de la perturbation physique entre le milieu intra- et extracellulaire. Les réponses des levures aux perturbations peuvent causer des dommages irréversibles dans la cellule et même sa mort (Maréchal et *al.*, 1999).

Lorsqu'une perturbation survient dans le milieu de culture, la cellule essaie de s'adapter à cette nouvelle condition en protégeant ses composantes vitales et s'il le faut en « reprogrammant » ses activités cellulaires pour assurer sa survie pendant les conditions stressantes (Birch et Walker, 2000). Les réponses des levures ont été caractérisées de différentes manières : par l'augmentation du niveau intracellulaire de tréhalose (Plourde-Owobi et *al.*, 2000) et de glycérol (Omori et *al.*, 1996 ; Wang et *al.*, 2001 ; Aldiguier et *al.*, 2004 ; Alfenore-Bideaux et *al.* 2006), l'altération de la composition lipidique de la membrane (Petrov et Okorokov, 1990) ; l'altération de la synthèse de protéines, la modulation des processus d'échange ionique, une réduction de l'activité métabolique provoquant une diminution de l'assimilation du glucose et par conséquent une diminution de la vitesse de croissance et de la production est observée (Martini et *al.*, 2004).

5.1.1 . Effet de l'environnement

Les conditions environnementales impactent le comportement de la levure en affectant ses capacités de croissance et de production : ces paramètres sont la température, le pH, l'apport d'oxygène, les apports nutritionnels (sels, vitamines, glucose, etc.), ainsi que la concentration en éthanol ou co-produits dans le milieu de culture (Gibson et *al.*, 2007 ; Hirasawa et *al.*, 2007). En fonction de l'intensité de ces grandeurs, elles peuvent avoir une influence qui vise à ralentir ou arrêter l'activité des levures (Sainz et *al.*, 2003). Les substances inhibitrices sont parfois difficiles à éviter puisqu'elles sont souvent substrats ou produits de la réaction biochimique considérée (Gryta et *al.*, 2000).

Le comportement du microorganisme est une dynamique : de croissance et/ou de production ; la réponse de la levure face à un stress est également mise en œuvre de façon dynamique avec une capacité ou non d'adaptation aux conditions environnementales en fonction du temps (Attfield, 1997 ; Sonnleitner, 1998 ; Henson, 2003 ; Lacroix et Yildirim, 2007).

5.1.2 . Effet de la concentration d'éthanol

La présence d'une concentration élevée d'éthanol dans le milieu de fermentation est à l'origine de modifications de perméabilité et de fluidité membranes des levures, causant une diminution de la vitesse de croissance, de la viabilité cellulaire, de l'activité métabolique et de la capacité de production de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont observés (Olivera *et al.*, 2003 ; Furukawa *et al.*, 2004 ; Pina *et al.*, 2004 ; Aguilera *et al.*, 2006 ; Canetta *et al.*, 2006 ; Hu *et al.*, 2006 ; Hirasawa *et al.*, 2007 ; kitagaki *et al.*, 2007 ; Lei *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2007 ; Watanabe *et al.*, 2007 ; Wei *et al.*, 2007).

Des concentrations de l'ordre de 1-2 % (w/v) sont suffisantes pour diminuer la croissance cellulaire et pour une concentration de 10 % (w/v) d'éthanol, la vitesse de production du microorganisme est stoppée (Roehr, 2001). Selon Bai *et al.*, (2004), l'éthanol conduit à une inhibition totale de la croissance cellulaire et la vitesse de production à une concentration de 13 % (w/v) dans le milieu. Ce résultat corrobore les travaux de Casey et Ingledew (1986) qui mentionnent une inhibition totale de la croissance cellulaire lorsque la concentration en éthanol est comprise entre 11,8 et 13 % (w/v) et ce pour quatre souches différentes. Les effets inhibiteurs de l'éthanol agissent à différentes niveaux dans la cellule. Aux fortes concentrations en éthanol, un découpage entre croissance et production d'éthanol est observé. La croissance cellulaire s'arrête dans un premier temps à 60-100 g.L⁻¹ d'éthanol (Dasari *et al.*, 1990). Ghose et Taygir (1979) ont réalisé des travaux expérimentaux sur la tolérance à l'éthanol et ont trouvé que 87 g.L⁻¹, la croissance cellulaire est complètement stoppé et à 114 g.L⁻¹ il n'y a plus de production d'éthanol. Par contre, les travaux effectués par Alfenore *et al.*, en 2002, ont montré que la tolérance de la levure à l'éthanol peut être augmentée par un apport contrôlé de vitamines, conduisant à un arrêt de croissance cellulaire à 115 g.L⁻¹ et un arrêt de la production d'éthanol à 147 g.L⁻¹. De ce fait, en contrôlant les apports nutritionnels, les auteurs atteignent une concentration en éthanol de 147 g.L⁻¹ en 45 h de culture.

L'effet de l'éthanol est un phénomène polygénique : plusieurs enzymes et fonctions physiologiques sont impliquées. La membrane plasmique serait la première cible de l'éthanol, avec des changements dans la composition lipidiques de la membrane, ainsi que l'inhibition et la dénaturation de plusieurs protéines intracellulaires et enzymes glycoliques telles que l'inhibition de l'hexokinase, de la pyruvate décarboxylase et de l'alcool déshydrogénase, ainsi qu'une diminution de la diminution de la concentration en eau

intracellulaire (Alexandre et *al.*, 1994 ; Jones et Greefield, 1982). L'éthanol peut exercer son effet inhibiteur en modifiant la structure de la membrane cytoplasmique augmentant ainsi sa perméabilité aux molécules plus petites et aux ions avec pour effet de déséquilibrer les charges transmembranaires perturbant le transport de certains composés cellulaires comme les sucres. En considérant l'importance des glucides, les cellules plus vieilles, qui contiennent des réserves plus importantes, sont généralement plus tolérantes au stress causé par les hautes concentrations en éthanol que les cellules plus jeunes (Giannattasio et *al.*, 2005). Il a été reporté que les gènes impliqués dans la réponse cellulaire au stress éthanolique sont également impliqués dans la régulation du cycle de vie de la cellule (Samokhvalov, 2004). Jakubowski et *al.* (2000) ont démontré, lorsque l'âge de la levure *Sacchormyces cerevisiae* augmente que le processus d'oxydation des radicaux libres dans ces cellules s'intensifie chronologiquement.

5.1.3 . 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 et *al.*, 1979).

5.1.4 . Effets de la température et du pH

Conformément aux lois thermodynamiques la température influence les réactions biologiques. Néanmoins, 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. Aldiguier et *al.*, (2004) ont réalisé plusieurs cultures de *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066 en mode *fed-batch*, en conditions de température contrôlée variant de 27°C à 39°C. Le taux de croissance maximal a été obtenu à une température de 30°C alors que la vitesse spécifique de production d'éthanol maximale a été obtenue à une température de 33°C. Pour des températures supérieures à 30°C, des diminutions de la capacité de croissance et de la quantité finale de biomasse sont observées.

Une température supérieure à 30°C accroît la vitesse de production d'éthanol mais augmente leur sensibilité à l'éthanol ce qui entraîne une perte de viabilité. La température accroît l'effet néfaste des stress (chocs osmotiques, inhibition par l'éthanol en entraînant une diminution de la viabilité (Beney et *al.*, 2001 (a)) et de l'activité cellulaire (Maréchal et *al.*, 1999).

Les limites de pH reportées dans la littérature pour maintenir une croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* se situent entre 2,4 et 8,6, avec un pH optimal entre 4 et 4,5 (Jones et *al.*, 1981). Le maintien du pH cytoplasmique est indispensable à la survie de la levure. Ainsi Jones et *al.*, (1981) considèrent que le stress éthanolique provoque une chute du pH cytoplasmique, ce qui induit le décès cellulaire ; cette diminution du pH intracellulaire peut être due soit à un influx de protons (Birch et Walker, 2000 ; Kasemets et *al.*, 2006) ou à une accumulation d'intermédiaires de la réaction (ex. acide acétique, glycérol, etc.) (Ferreira et *al.*, 2004).

5.1.5 . Effet de l'oxygène et de dioxyde du 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. Quelques auteurs (Ryu et *al.*, 1984 ; 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.

La solubilité du dioxyde du carbone (par conséquent sa concentration dans le milieu) peut être influencé par plusieurs facteurs tels que le pH ou la température (Aguilera et *al.*, 2005). Le dioxyde du carbone (CO₂) présent dans le ciel gazeux du réacteur et produit in-situ par les réactions biologiques, peut être dissous dans le milieu liquide sous forme d'acide carbonique (H₂CO₃), lequel est dissocié en bicarbonate (HCO₃⁻), carbonate (CO₃⁻²) et hydrogène (H⁺) (Debs-Louka et *al.*, 1999 ; Garcia-Gonzalez et *al.*, 2007).



Un effet négatif sur le métabolisme microbien est causé par la présence du CO₂ dans le milieu de culture, en inhibant la croissance et la production (Aguilera et *al.*, 2005). Le mécanisme d'inactivation lié à la présence de CO₂ est proposé en différents étapes :

- (a) solubilisation du CO₂ dans la phase liquide ;
- (b) modification de composition de la membrane cellulaire ;
- (c) diminution du pH intracellulaire ;
- (d) inactivation des enzymes/ inhibition du métabolisme cellulaire du à l'abaissement du pH ;
- (e) effet inhibiteur directe du CO₂ et HCO₃⁻ moléculaires sur le métabolisme ;
- (f) désordre de la balance des électrons ;

(g) modification des composants vitaux de la levure (Garcia-Gonzalez et *al.*, 2007). Le CO₂ peut être à la fois activateur et inhibiteur du métabolisme levurien (Hirasawa et *al.*, 2007 ; Kunkel et Ough, 1966). Il initie les voies anaérobiques à faible concentration: Jones et Greenfield (1982) ont montré que le rendement de conversion du substrat augmentait de 25% lors d'une croissance en aérobie sur glucose sous une pression partielle de 0,2 bar de CO₂. Par ailleurs, une augmentation trop importante de la pression partielle en gaz carbonique semble entraîner une chute de la viabilité cellulaire (Ben Chaabane et *al.*, 2006).

5.1.6 . Effet de l'acide acétique

Le rôle de l'acide acétique, co-métabolite du métabolisme oxydo-réductif, est un sujet peu investigué à ce jour (Ferreira et *al.*, 2004). Pourtant ce co-métabolite semble plus toxique pour la levure que l'éthanol.

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 et *al.*, 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 (Imai et Ohno, 1995 ; Ferreira et *al.*, 1997 ; Pampulha et Loureiro-Dias, 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. L'égalité des concentrations de la forme non dissociée de part et d'autre de la membrane cytoplasmique conduit à l'expression suivante (Guillouet et Engasser , 1995) :

$$pH_{intra} - pH_{extra} = \Delta pH = \log \left(\frac{CH_3COO^-_{intra}}{CH_3COO^-_{extra}} \right) \quad (\text{Equation 4})$$

L'ajout de l'acide acétique dans le milieu de culture peut provoquer la mort programmée chez les levures (Fröhlich et Madeo, 2001 ; Knorre et *al.*, 2005 ; Gourel et *al.*, 2006 ; Zadrag et *al.*, 2006). Les travaux reportés par Ludovico et *al.*, (2002) considèrent que la concentration en acide acétique (1,2 à 4,8 g.L⁻¹) ajouté dans le milieu de

culture provoque une mort programmée (apoptose) au microorganisme ; pour des concentrations égales ou plus hautes de $7,2 \text{ g.L}^{-1}$, la levure présente un changement morphologique ainsi que le phénomène de nécrose. Un effet synergique de l'acide acétique et de l'éthanol induisant le décès cellulaire a été proposé dans les travaux de Ben Chabaane et *al.* (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} .

5.2 . Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est définie comme la capacité d'exécuter toutes les fonctions nécessaires pour la survie dans des conditions données, de se reproduire et former une colonie (Countinho, 2005).

5.3 . Pression Osmotique

La pression osmotique est la pression nécessaire pour empêcher la pénétration d'eau dans un compartiment à travers une membrane rigide semi-perméable (perméable à l'eau mais pas aux ions). Dans le domaine appliqué à la biologie, la pression osmotique ou osmolarité désigne la concentration de tout soluté dans une solution aqueuse, souvent exprimée en osmol (ou milliosmol) ; ceci correspond au nombre de moles de particules par litre de solution (Guillouet et Engasser, 1995 ; Yokozeki A. 2006 ; Djelal et *al.*, 2005 ; Djelal et *al.*, 2012b). La pression osmotique ou osmolarité est liée à l'agitation moléculaire des molécules en solution dans le solvant (Granik et *al.*, 2002). Par contre Wood (1999) considère que l'osmolalité « est la pression osmotique d'une solution à une température donnée ; elle est exprimée en moles de soluté par kilogramme de solvant ; elle peut être mesurée, mais pas calculée et que l'osmolarité est une estimation de l'osmolalité, exprimée en moles de soluté par litre de solution ; l'osmolarité est calculée à partir de l'addition des concentrations de solutés osmotiquement actives dans une solution ». Vinet, (2003) considère que la pression osmotique dépend uniquement du nombre total de particules en solution et pas de leur nature. Selon son équation de la pression osmotique (Tableau 5), une solution contenant 1 mol/kg d'eau exerce une pression osmotique de 1 atm . Cet auteur considère qu'il existe un écart osmotique entre l'osmolalité mesurée et celle calculée qui peut varier de 10 à 20 mosm/kg selon cet auteur. Guillouet et Engasser. (1995) considère que la pression osmotique en solution idéale et suffisamment diluée, est déterminée par la loi de Van't Hoff tandis que pour les solutions non idéales, il est nécessaire d'introduire le

coefficient d'activité (γ). Il considère aussi que l'osmolarité et l'osmolalité se définissent à partir de la molarité et de la molalité des solutés dissous. Debnm, (2005) considère que la seule différence entre l'osmolarité et l'osmolalité sont les unités dans lesquelles elles sont exprimées ; osmoles/kg de solvant pour l'osmolalité et osmoles/Litre de solution pour l'osmolarité. Cependant aucun de ces auteurs ne donne de modèle pour déterminer la pression osmotique. Pour toute substance non-électrolytique en solution, la pression osmotique est égale à la concentration molaire (molarité). Pour une substance électrolytique, on doit tenir compte de toutes les espèces ioniques en présence; la concentration osmotique est supérieure à la molarité de la solution.

Tableau 5. Définition de la pression osmotique, osmolalité et osmolarité.

6 Auteurs	La pression osmotique		L'osmolarité	
7 Vinet (2003)	Pression osmotique (Π) d'une solution aqueuse diluée : $\Pi = m RT$ m : la molalité de la solution		Osmolalité : Osmolalité = $\gamma n c$ γ : coefficient osmotique du soluté. n : nombre de particules dans le soluté. c : concentration en osmol/ kg d'eau.	
8 Wood (1999)	Pression osmotique (Π) d'une solution aqueuse : $\Pi = - (RT/V_w) \ln a_w$. V_w : volume molaire partiel de l'eau. A_w : activité de l'eau.		Pression osmotique exprimée en termes d'osmolalité (osmoles/kg) : Osmolalité = $\pi / (RT)$	Osmolarité (estimation de l'osmolarité) : Osmolarité = $\sum C_i$ = $\pi / (RT)$ C_i : concentration molaire des solutions osmotiquement actives.
Guillouet et Engasser. (1995)	Pression osmotique (Π) :		Osmolalité $\Pi = \Phi RT V_m \cdot \rho$ V : nombre d'ions par molécule. M : molalité (mol / kg solvant) P : densité de la solution	Osmolarité $\Pi = \Phi RT V C$ soluté V : nombre d'ions molécule.
	Solution Idéales $\Pi = (RT/V_w) \ln (1-x \text{ soluté})$ $\Pi = RT C$ soluté	Solutions non-idéales $\Pi = (RT/V_w) \ln (1-x \text{ soluté})$ $\Pi = \Phi RT C$ soluté (non électrolytes) $\Pi = \Phi RT C$ soluté (électrolytes)		

8.1.1 . Détermination expérimentale

L'osmolarité peut être mesurée avec des osmomètres. Leur fonctionnement est basé sur un des deux principes, soit l'abaissement du point de fusion, soit l'abaissement de la tension de vapeur. La majorité des osmomètres utilisent la détermination du point de fusion. Dans ces appareils, l'abaissement du point de congélation de la solution par rapport à l'eau distillée permet une mesure directe de la concentration osmolaire (milliosmol/Kg eau).

La pression osmotique est fréquemment exprimée en Pascal (Pa) (Gervais et Marechal, 1994 ; Marechal et *al.*, 1995 ; Marechal et *al.*, 1999 ; Beney et *al.*, 2001 (a, b) ; Gervais et Beney, 2001 ; Laroche et Gervais, 2003 ; Laroche et *al.*, 2005). En accord avec la loi de Van't Hoff dans des solutions diluées, (solutions idéales car les molécules sont très éloignées les unes des autres, sans interaction. Les valeurs de la pression osmotique en Pascal sont corrélées aux concentrations des composés dans le milieu de culture (Yokozeki, 2006).

$$\pi = \sum C_i \times R \times T \quad (\text{Equation 5})$$

où

π : Pression osmotique [Pa]

R : constante des gaz parfaits [8.314m3Pa/°Kmol]

T : Température absolue [°K = °C + 273,15]

$\sum C_i$: concentration molaire en substances dissoutes en mol/m³.

D'autres auteurs (Kopell et Westhead, 1982 ; Csonka et Hanson 1991 ; Vinet, 2003 ; Fullerton et *al.*, 2006) considèrent qu'il n'existe pas une corrélation linéaire entre la pression osmotique mesurée et celle calculée avec l'équation de Van't Hoff (Tableau 6); ces travaux sont réalisés lorsque la concentration de la substance d'étude augmente et que la solution devient non idéale. La pression osmotique pour des solutions non idéales peut être déterminée par l'équation de Gibbs.

$$\pi = - \left(\frac{RT}{V_{sol}} \right) \ln X_{sol} \quad (\text{Equation 6})$$

Où :

π : Pression osmotique (Pa)

R : constante des gaz parfait (m3 Pa / K • mol)

T : température absolue (°K)

Vsol : volume molaire partiel du solvant (m³/mol)

Xsol : fraction molaire partielle du solvant.

8.1.2 . Impacts biologiques de la pression osmotique

La disponibilité de l'eau, est un des facteurs les plus importants qui affectent la croissance et la survie d'un microorganisme. Une variation de pression osmotique cause un mouvement de l'eau en direction du gradient osmotique, en provoquant un gonflement voire un éclatement (dans des milieux hypotoniques ou hypo-osmotique) ou une plasmolyse (dans les environnements hyper-osmotiques) ; en général, le microorganisme répond plus rapidement à un environnement hypo-osmotique qu'hyper-osmotique, étant donné que le risque d'éclatement est plus sévère (Wood, 1999).

La cellule est capable de détecter un changement de la pression osmotique du milieu extérieur par déformation de la membrane cellulaire ou par un changement de l'hydratation des protéines de la membrane (Deardorff, 1980 ; Kopell et Westhead, 1982 ; Hohmann, 2002 ; Fullerton et *al.* 2006 ; Sun et *al.* 2007).

Les réponses de la levure *Saccharomyces cerevisiae* placée dans un milieu hyperosmotique sont nombreuses avec :

- a) Des changements immédiats (perte d'eau intracellulaire et donc perte de la structure cellulaire) comme conséquence directe des forces physico-mécaniques qui opèrent sous ces conditions ; les travaux de Plourde-Owobi et *al.* (2000) et Wojda et *al.* (2003) ont montré que la membrane cellulaire est la cible principale des dommages, les modifications structurales (tels que la fluidité de la membrane cellulaire, la perte de l'eau intracellulaire,...) survenant ultérieurement. Une augmentation de la concentration des ions intracellulaires, spécialement les ions sodium à travers la membrane cellulaire, est supposée être impliquée dans la dénaturation des macromolécules intracellulaires (protéines et enzymes) causée par le stress osmotique (Beney et *al.*, 2001 (b)).
- b) Une réponse de la cellule, cherchant à se protéger, réparer et/ou récupérer ses capacités avec arrêt temporaire de la croissance cellulaire, production de substances osmoprotectrices (*i.e.* glycérol) ; diminution du volume cellulaire (Marechal et *al.*, 1995).

- c) Des changements du métabolisme (répression ou activation de diverses enzymes) qui permettront à la cellule de s'adapter aux nouvelles circonstances (Mager et Siderius, 2002 ; Wojda et *al.*, 2003 ; Sun et *al.*, 2007). Le choc osmotique (vers un milieu contenant une pression osmotique plus grande) peut donc évidemment endommager les performances de la levure et par conséquent diminuer la production d'éthanol (Dragone et *al.*, 2004). Il a été démontré que la viabilité et la croissance cellulaire de plusieurs microorganismes, *Saccharomyces cerevisiae* compris, sont fortement affectées par une augmentation de la pression osmotique (Beney et *al.*, 2000 ; Beney et *al.*, 2001(a) ; Beney et *al.*, 2001(b) ; Hohmann, 2002 ; Laroche et *al.*, 2005). Laroche et Gervais (2003) considèrent que l'influence négative de la pression osmotique sur la viabilité cellulaire, ne dépend pas seulement de l'intensité du choc osmotique, mais aussi de la température auquel le milieu réactionnel se trouve. Une diminution de la viabilité est mentionnée en présence d'une pression osmotique élevée de l'ordre de 50 à 100 MPa (Beney et *al.*, 2001 (a)). Le mécanisme impliqué dans la mort cellulaire après un choc hyper osmotique n'a donc pas encore été complètement résolu.

8.2 . Les levures osmotolérantes

Certaines levures sont osmotolérantes, telles que *Candida pelliculosa* (Djelal et *al.*, 2012a), *Zygosaccharomyces rouxii* (Dakal et *al.*, 2014), *Debaryomyces hansenii* et *Pichia farinosa* (Bubrová et *al.*, 2014). Ces levures peuvent supporter des pressions osmotiques élevées, des pressions auxquelles 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.

9 . Conclusion

L'objectif de cette étude consiste à développer un procédé biotechnologique pour pouvoir utiliser les sucres des sous produits de dattes de la variété « *Deglet-Nour* » pour produire un biocarburant et étudier les fortes teneurs en sucres dans les milieux de cultures sur la capacité fermentaire des microorganismes utilisés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 . Matériel végétal

1.1 . Choix de la variété de datte

Le substrat utilisé pour cette étude est constitué des déchets de dattes (fruits avec défaut de texture, fruits très humides, fruits altérés par les microorganismes et les insectes...) produit par la variété de datte Tunisienne « *Deglet-Nour* » (Figure 12) la plus abondante et la plus commercialisée, venant de l'unité Tunisienne de conditionnement des dattes « ALKHALIG » installée à Nabeul.

Le choix de cette variété se justifie par son abondance à l'échelle nationale (60 % de la production annuelle) (Besbes et *al.*, 2009), et sa composition (richesse en sucre) qui présente un milieu favorable pour la croissance et le développement des levures et par conséquent la production d'éthanol suite à un métabolisme fermentaire.



Figure 12. Sous-produits de dattes de la variété « *Deglet-Nour* ».

1.1.1 . Echantillonnage

Le déchet de « *Deglet-Nour* » est exposé à l'air libre et à la température ambiante à l'unité de conditionnement. Après prélèvement, les échantillons sont conservés à 4°C afin de ralentir tout métabolisme et toute réaction chimique.

1.1.2 . Caractérisation physique

Les caractéristiques physiques sont réalisées sur 10 fruits prélevés au hasard, pour lesquels sont déterminés : Les dimensions du fruit entier et de son noyau (longueur et largeur) au moyen d'un pied à coulisse. Le poids de la datte entière, de la pulpe, ainsi que le noyau au moyen d'une balance analytique de précision.

1.1.3 . Caractéristiques biochimiques des pulpes de dattes

1.1.3.1 . Détermination de la teneur en eau (MH%)

La teneur en matière sèche a été déterminée par dessiccation de 2 g de pulpe, dans une étuve isotherme WEISEN à une température de 105°C et à la pression atmosphérique, jusqu'à l'obtention d'une masse constante de l'échantillon.

$$MH\% = \frac{Pe - (Mf - Mi)}{Pe} \times 100 \quad \text{Equation 8}$$

Avec :

- MH% : Teneur en matière sèche (%).
- Mi : Masse du creusé vide (g).
- Mf : Masse final « après dessiccation » (Matière sèche + capsule) (g).
- Pe : Masse de la prise d'essai (g).

1.1.3.2 .Détermination du pH

Les valeurs du pH ont été déterminées en utilisant la méthode de Dowson et Aten (1963). Quatre grammes de pulpe de datte découpés en petits morceaux, ont été dispersés dans 200 mL d'eau bouillante. Après refroidissement, cette solution est utilisée afin de déterminer le pH par un pH-mètre thermo-scientific, Orion 2 star.

1.1.3.3 . Détermination de l'acidité titrable (NF V05-101, 1974)

Elle consiste à effectuer un titrage de l'acidité d'une solution aqueuse avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N en présence de phénophtaléine comme indicateur coloré.

L'acidité titrable est exprimée en gramme d'acide acétique pour 100 g de produits (dattes):

$$A\% = \frac{250 \times V1 \times 100}{m \times V \times 10} \times 0,06 = 150 \times \frac{V1}{m \times V} \quad \text{Equation 9}$$

Avec :

- m : masse de la prise d'essai (g).
- V : volume de filtrat pris pour le titrage (mL).
- V1 : volume de la solution d'hydroxyde de sodium 0.1 N (mL).
- 0,06 : le facteur de conversion de l'acidité titrable en équivalent d'acide acétique.

1.1.3.4 . Détermination de la teneur en cendres. (NF V05-113, 1972)

Le dosage des cendres est basé sur la destruction de toute la matière organique sous l'effet de la température élevée (500±25°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 MERAUEUS type MR170, pendant une nuit. Après refroidissement dans un dessiccateur, les capsules contenant les cendres sont pesées à nouveaux. Le dosage est réalisé en triplicat pour chaque échantillon.

La teneur en cendres des échantillons est calculée selon la formule suivante :

$$C \% = \frac{M1 - M2}{M1 - M0} \times 100 \quad \text{Equation 10}$$

Avec :

- 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).

1.1.3.5 . Analyse des éléments minéraux

La spectrophotométrie d'absorption atomique (Nouva 400) est utilisée pour ce dosage. Elle est basée sur la capacité d'un élément donnée d'émettre une radiation caractéristique lorsqu'on lui fournit de l'énergie. L'intensité de l'émission des raies est alors proportionnelle au nombre d'atomes en présence.

• Préparation de la solution à analyser

Pour chaque échantillon, 100 mg de cendres obtenues par incinération sont humectés de 2 à 3 mL d'eau distillé. Le mélange est chauffé jusqu'à l'apparition d'une

première vapeur puis quelques ml d'eau distillée sont ajoutés. La solution ainsi obtenue est filtrée et rincée plusieurs fois avec de l'eau distillée tiède puis de l'eau distillée froide pour récupérer le plus d'éléments minéraux possibles. Le volume est enfin ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée.

- **Dosage des éléments minéraux**

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 Mg, Ca, Na, et K sont respectivement 285,2 nm ; 422,7 nm ; 589 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.

1.1.3.6 . Dosage de la matière grasse

- **Principe**

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.

- **Expression des résultats**

$$MG \% = \frac{M2-M1}{Pe} \times 100 \quad \text{Equation 11}$$

Avec :

- M1 : Masse de ballon vide.
- M2 : Masse de ballon après extraction et évaporation de l'hexane.

- Pe : Prise d'essai de l'échantillon.

2 . Optimisation de l'extraction de jus de datte

Plusieurs techniques d'extraction peuvent être mises en œuvre. Parmi les techniques, on trouve l'extarction par soxhlet et l'extraction en mode batch par agitation. L'énergie consommée par la première technique est très importante (Chandrika, Fereidoon, 2005), en plus les solavants utilisés comme l'éthanol, le méthanol et le benzène peuvent présenter des risques. Pour cela, nous avons choisi l'extraction à l'eau chaude en mode batch.

2.1 . Dispositif expérimental

L'extraction standard des sucres a été effectuée selon la procédure décrite sur la figure 13. Les dattes subissent comme traitement préliminaire, un lavage, un dénoyautage et elles sont ensuite découpées en petits morceaux (0,5 à 1 cm) (Al-Farsi et *al.*, 2007). Ensuite, l'extraction est réalisée en une seule phase. La filtration de l'extrait est effectuée en premier lieu sur un tissu gazes, puis une deuxième clarification par centrifugation pendant 30 min à 5000 rpm à 4°C pour obtenir un extrait clair. Ainsi, pour l'étude de l'extraction, le mélange pulpe/eau est réalisé dans des flacons de 250 ml et placés dans un bain-marie agitateur (JULABO 090), réglé à la température de travail. A la fin de l'extraction, les flacons sont sortis du bain-marie et immédiatement refroidis avec de l'eau froide jusqu'à 25°C. Ils sont ensuite filtrés et l'extrait est immédiatement stocké à basse température jusqu'à analyses.

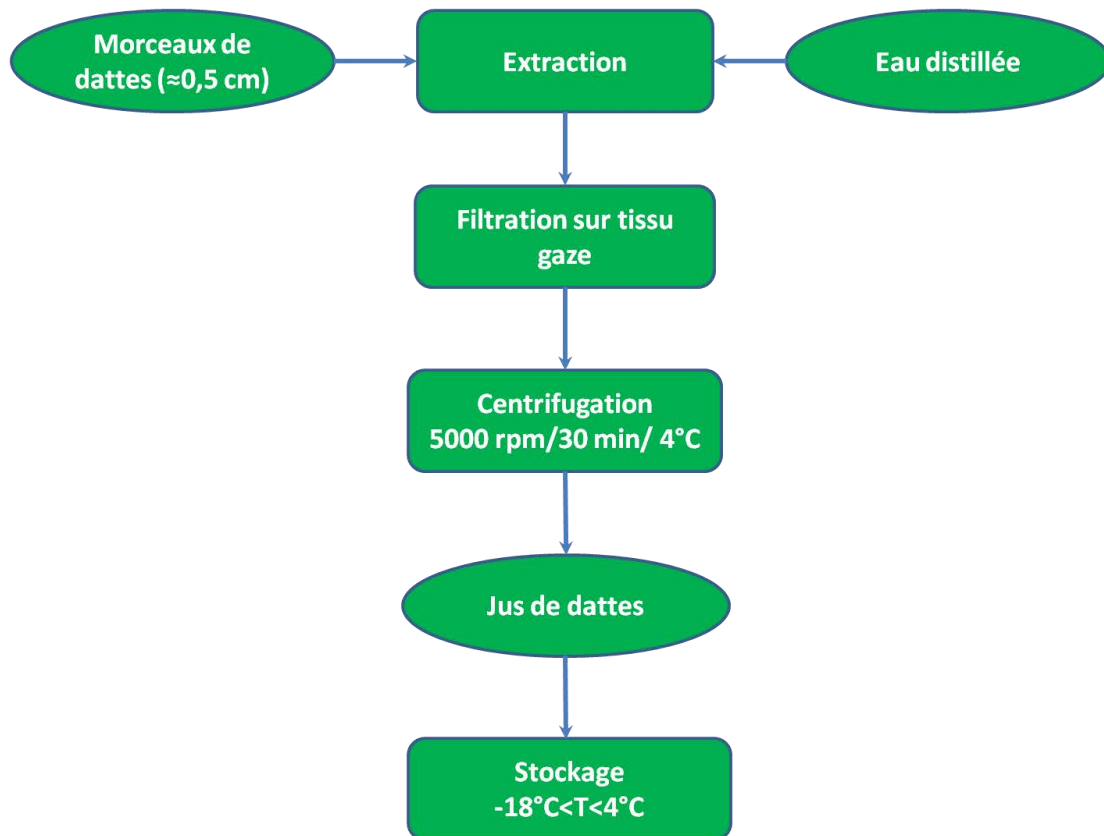


Figure 13. Processus d'extraction du jus de dattes.

2.2 . Etablissement des modèles mathématiques

Les facteurs exploités ont été ceux qui ont facilité le processus d'extraction du jus. Ces facteurs ont été, la température (X_1), le temps d'extraction (X_2), et le ratio datte/eau (X_3) (Tableau 7). Le plan d'expérience de Doehlert à 3 facteurs a été utilisé pour l'exécution des manipulations. Les facteurs retenus ont conduit à la construction d'une matrice d'expérience (W). Ces facteurs ont été choisis à cause de leur importance sur la qualité du jus final.

Tableau 6. Paramètres d'extraction.

Variable	Minimum	Maximum
Temperature (°C) X_1	70	90
Temps (min) X_2	30	90
Dilution X_3	1:2	1:4

Après le choix de la conception du plan d'expérience (Tableau 8) (celui de Doehlert pour ce qui nous concerne), l'équation modèle a été définie et des coefficients de l'équation modèle ont été prévus. Le modèle utilisé dans la méthode des surfaces de réponses a été généralement une équation quadratique pleine ou la forme diminuée de cette équation. Le modèle du second degré a pu être écrit (**Kuila et al., 2011**) comme suit :

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Equation 12}$$

Avec β_0 : la constante, ε : l'erreur et les β_j β_{jj} et β_{ij} ont été les coefficients du modèle.

Tableau 7. Plan d'extraction : méthode de surface de réponse (Box-Behnken).

N°	Température d'extraction (°C)	Temps d'extraction (min)	Ratio (pulpe/eau)
	$X_1 (X_1)$	$X_2 (X_2)$	$X_3 (X_2)$
1	80 (0)	60 (0)	1:2 (-1)

2	80 (0)	90 (1)	1:4 (1)
3	90 (1)	60 (0)	1:2 (-1)
4	90 (1)	90 (1)	1:3 (0)
5	90 (1)	60 (0)	1:4 (1)
6	80 (0)	60 (0)	1:3 (0)
7	70 (-1)	90 (1)	1:3 (0)
8	70 (-1)	60 (0)	1:4 (1)
9	70 (-1)	60 (0)	1:2 (-1)
10	80 (0)	90 (0)	1:2 (-1)
11	80 (0)	30 (-1)	1:2 (-1)
12	70 (-1)	30 (-1)	1:3 (0)
13	80 (0)	30 (-1)	1:4 (1)
14	90 (1)	30 (-1)	1:3 (0)
15	80 (0)	60 (0)	1:3 (0)

3 . Production de bioéthanol par les levures

3.1 . Matériel biologique

Les travaux ont été réalisés avec des souches de levures, 3 souches commercialisées par l'institut Pasteur (France) ; une souche de genre *Saccharomyces cerevisiae* 522D, et deux autres osmotolérantes : *Zygosaccharomyces rouxii* IP 2021.92 et *Candida*

***Pelliculosa* IP 820.63** et deux autres souches isolées des sous-produits des dattes, par le laboratoire et qui feront l'objet d'une publication.

3.2 . Milieux de culture

3.2.1 . Conservation des souches

Les souches sont stockées à - 20°C dans des tubes de cryoconservation, contenant un milieu Sabouraud (Merck) liquide (1 ml), supplémentés en glycérol (Carlo Ebra) (30 %), qui protège les cellules à l'éclatement par le froid.

Avant utilisation, les souches sont repiquées stérilement sous hotte à flux laminaire et sur gélose incliné et conservées à 4°C. La composition du milieu pour un litre de gélose de Sabouraud est la suivante : Peptone (10 g), Extrait de levure (10 g), Glucose (20 g), Agar-agar (15 g) dans l'eau osmosée (Merck MILLIPORE) qsp 1000 ml.

3.2.2 . Milieux de fermentation

3.2.2.1 . Milieu synthétique.

Le milieu minéral de culture utilisée pour cette étude, est le milieu Dw (Djelal et *al.*, 2012a) (milieu modifié de Wickerham, 1951). La composition est la suivante (Tableau 9) :

Tableau 8. Composition de milieu Dw.

Constituants	Milieu Dw (mg.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	5200
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1200
CaCl ₂ , 6 H ₂ O	150
FeSO ₄ , 7H ₂ O	100
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	30
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,79
H ₃ BO ₃	15
KI	2
Na ₂ M0O ₄ , 2H ₂ O	5
MnSO ₄ , H ₂ O	32
CoCl ₂ , 6H ₂ O	5,2
EDTA	100

La source d'azote est le chlorure d'ammonium (NH₄Cl, 500 mg.L⁻¹), la source de carbone un sucre simple, fermentescible. Les milieux sont « stérilisés » par filtration sur filtre 0,2 µm. Le pH est ramené à 5,5 à l'aide de KOH 1 mol.L⁻¹.

3.2.2.2 . Milieu enrichi avec des sels minéraux, oligo-éléments et une source d'azote.

Le pH dans les différents lots expérimentaux est ajusté à 5,5 par une solution KOH 1 mol.L⁻¹. Les flacons sont stérilisés par autoclavage à une température de 121°C pendant

20 min. Sauf les oligo-éléments (Tableau 9) qui sont préparés séparément et sont stérilisés par des filtres à seringue 0,2 μm .

3.3 . Fermentations

3.3.1 . Préparation de l'inoculum

Les levures sont pré-cultivées pendant 18 h à 28°C sous agitation (INNOVA 40, New Brunswick, USA) à 180 rpm. Les précultures sont réalisées dans des flacons de 250 mL contenant 25 mL de milieu constitué de glucose 10 g.L⁻¹, peptone 10 g.L⁻¹ et d'extrait de levure 10 g.L⁻¹. Après l'obtention d'une culture dont l'absorbance à 610 nm correspond à 1 unité d'absorbance, la suspension est centrifugée (4°C, 1800 g, 5 min). Le culot est ensuite récupéré puis remis en suspension à l'aide de 25 mL de KCl (150 mmol.L⁻¹). Après une seconde centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est repris dans 10 mL de KCl (150 mmol.L⁻¹) et est utilisé pour ensemer les cultures (Djelal et *al.*, 2005).

3.3.2 . Ensemencement des milieux

Les essais de fermentations sont dupliqués dans des flacons de 500 mL fermés par des bouchons à vis, contenant 300 mL de milieu. Les différents milieux sont inoculés par 200 μL de suspension de levure dans du KCl 150 mmol.L⁻¹ (Djelal et *al.*, 2005) et incubés par la suite dans un Shaker (New Brunswick, INNOVA 40) à 28°C, sous une agitation de 180 rpm.

3.4 . Techniques Analytiques

3.4.1 . Les prélèvements

Le suivi de la fermentation est réalisé, en effectuant des points de prélèvements de 5 mL à différents moments de fermentation. Les prélèvements sont ainsi effectués dans des tubes soigneusement annotés et conservés à -18°C en attente de dosage.

3.4.2 . Suivi de la croissance

3.4.2.1 . Densité optique

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 PRIM SECOMAM à 600 nm.

3.4.2.2 . Dénombrement sur gélose

Cette méthode permet un dénombrement de la biomasse viable, c'est-à-dire capable de se produire et donc pouvant former une colonie. Pour avoir un nombre significatif de colonies et que celles-ci soient bien isolées le nombre de colonies par boîte doit être compris entre 30 et 300. Pour cela des dilutions décimales successives de l'échantillon sont faites dans l'eau physiologique ($\text{NaCl} : 9 \text{ g.L}^{-1}$) jusqu'à la dilution désirée pour l'étalement. Le milieu gélosé est un milieu PCA (plate Count Agar (AES Chemunex)) contenant une faible concentration en glucose ce qui permet une croissance plus lente et donc un meilleur isolement des colonies.

Composition du milieu PCA :

- Tryptone : 5 g.L^{-1} .
- Extrait de levure : $2,5 \text{ g.L}^{-1}$.
- Glucose : 1 g.L^{-1} .
- Agar : 15 g.L^{-1} .

50 μL de deux dilutions sont déposés en triplicata, les boîtes sont ensuite incubées 48 h à 28°C et le nombre d'unités formant une colonie (UFC) est déterminé.

3.4.3 . Dosage par HPLC

3.4.3.1 . Préparation des échantillons

L'échantillon est centrifugé (1800 rpm, 10 min, 4°C), le surnageant est prélevé et placé dans un nouveau tube identifié en attente d'analyse à 4°C .

3.4.3.2 . Matériel

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, BIO-RAD). Elle 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 (H_2SO_4) 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 $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$.

3.4.3.3 . Molécules recherchées

La HPLC permet de quantifier les concentrations des molécules suivantes :

- Les oses et diholosides tels que le saccharose, glucose, fructose, xylose,
- Les polyols tels que le glycérol,
- Les acides organiques tels que l'acide acétique,
- Les alcools tels que l'éthanol, et le butanol.

La détection des différents composés se fait à l'aide d'un réfractomètre ERC 7512 (Saitama, Japan). Le logiciel utilisé est IC Net version 2.3, Metrohm AG, Herisau, Switzerland.

Tous ces composés ont fait l'objet d'un étalonnage (Tableau 10). Les temps de rétention t_r permettent alors d'identifier les composés présents dans les échantillons prélevés.

Tableau 9. Temps de rétention des composés quantifiés par HPLC.

	Sacchrose	Glucose	Fructose	Glycérol	Acide acétique	Ethanol
4						
$t_r(\text{min})$	5,98	7,16	7,87	10,87	12,39	17,16

4.1.1 . Dosage de NH_4Cl , Méthode de MANN (1963)

La concentration en NH_4Cl dans les milieux au cours de la fermentation a été déterminée par une réaction colorimétrique développée par MANN en 1963.

4.1.2 . Evaluation de la fermentation

4.1.2.1 . L'équivalent glucose

Le calcul de la concentration en sucres totaux en équivalent glucose (Equi Glu) est effectué grâce à la relation proposée par Carrasco et *al.*, 2001 :

$$\text{Equi Glu} = [\text{Glucose}] + [\text{Fructose}] + 1,05 \times [\text{Saccharose}] \text{ (g. L}^{-1}\text{)} \quad \text{Equation 13}$$

Le °Brix des milieux est déterminé par un réfractomètre manuel (ZUZI) à 3 échelles (0-90°), avec 0,2°Brix de précision. Le °Brix est la fraction de sucres dans un liquide, c'est-à-dire le pourcentage de matière sèche soluble.

4.1.2.2 . Rendement de la fermentation et Conversion du substrat

Nous avons caractérisé la fermentation par des grandeurs autres que les concentrations en produits, afin de pouvoir comparer les résultats avec l'ensemble des essais réalisés. Nous avons calculé, les rendements globaux en bioéthanol (Y_{EtOH}), en glycérol (Y_{Gly}), et la productivité de l'éthanol et de glycérol, à la fin de la fermentation par rapport au substrat consommé (s).

4.1.2.2.1 . Rendements en éthanol et en Glycérol

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

$$Y_{EtOH} = \frac{\Delta EtOH}{\Delta Substrat consommé} (g \cdot g^{-1}) \quad \text{Equation 14}$$

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

$$Y_{Gly} = \frac{\Delta Glycérol}{\Delta Substrat consommé} (g \cdot g^{-1}) \quad \text{Equation 15}$$

4.1.2.2.2 . Productivités volumiques horaire globale (Q)

Q est le rapport Ethanol ou Glycérol produit par durée globale de la fermentation (par exemple g (EtOH) par litre par heure).

4.1.3 . Analyse statistique

L'ensemble des résultats a été analysé à l'aide du logiciel XLSTAT ; l'analyse ANOVA, a été réalisée pour étudier les variables qualitatives. L'optimisation de l'extraction des jus a été réalisée par JMP 10 (SAS institute Cary, NC, USA).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 1.EXTRACTION DE JUS DE DATTES

1 . Caractéristiques physicochimiques des sous-produits de dattes

Le substrat utilisé dans ce travail de recherche, nous a été fourni par l'unité de conditionnement « ALKHALIGI » installée à Nabeul en Tunisie.

La variété « *Deglet-Nour* », est la variété la plus répandue et la plus commercialisée. Elle constitue à l'heure actuelle, l'unique variété appréciée sur les marchés nationaux et internationaux et de ce fait, elle est très plus sensible à l'altération et se conservant mal sur les lieux de production et les unités de conditionnement.

D'après Acourène et *al.*, (2001), une datte est dite de qualité physique et biochimique acceptable lorsque les critères suivants sont respectés :

- Aucune anomalie et non endommagé ;
- Un poids supérieur ou égal à 6 g ;
- Un poids en pulpe supérieur ou égale à 5 g ;
- Une longueur supérieure ou égale à 3,5 cm ;
- Un diamètre supérieur ou égal à 1,4 cm ;
- Un pH supérieur ou égal à 5,4 ;
- Une humidité comprise entre 10 – 30 % ;
- Une teneur en sucres supérieure ou égale à 65%.

1.1 . Caractéristiques morphologiques des sous-produits de dattes

Les caractéristiques morphologiques des dattes « *Deglet-Nour* » sont mentionnées dans le tableau 11.

Tableau 10. Caractéristiques physiques des dattes « *Deglet-Nour* ».

Paramètres	Datte <i>Deglet-Nour</i>
Couleur	Brune
Consistance	Demi-molle
Poids de la datte entière (g)	8,7±1,51
Poids de la pulpe (g)	7,87±1,51
Poids du noyau (g)	0,81±0,11
Longueur de la datte (cm)	4,03±0,41
Largeur de la datte (cm)	1,87±0,21
Noyau / datte entière (%)	9,31
Pulpe / datte entière (%)	90,45
Longueur/Largeur	2,16

1.1.1 . Couleur

La couleur des fruits (déterminée visuellement) est brune. La couleur est due à la composition biochimique et aux critères génétiques. Il convient de rappeler ici l'importance de la couleur en tant que critère objectif de qualité, car elle varie avec le niveau de maturité des dattes et peut être un indicateur de l'état de fraîcheur ou d'altération. Pour les consommateurs, il s'agit d'un critère de choix pour l'appréciation de la qualité de produit.

1.1.2 . Consistance

Selon leur consistance, les dattes sont classées comme suit :

- Datte molle : elles ont une chaire très aqueuse ;

- Datte demi-molle : dont la teneur en eau est moins importante que la catégorie précédente, mais qui reste de consistance molle ;
- Datte sèche : dont la pulpe est naturellement sèche (Munier, 1973).

La consistance des fruits utilisés est généralement demi- molle, avec un petit pourcentage des dattes molles et sèches.

1.1.3 . Longueur, poids et largeur des dattes

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 11, la longueur moyenne des fruits est de 4,03 cm et la largeur de 1,87 cm, conforme avec les mesures trouvées par El Arem et *al* (2011) sur des dattes commerciales et qui ont trouvé 4,10 cm et 1,60 cm. Le poids moyen de la datte entière est de 8,7 g, tandis que celui de la pulpe est de 7,87 g, bien inférieur aux résultats trouvés par El Arem et *al*, (2011) 10,49 g et 9,5 g. Cette différence de poids, est expliquée par la contamination par des parasites qui dégradent les dattes durant le stockage.

Les caractéristiques morphologique des dattes utilisées, présente une valeur supérieure à celle mentionnée par Acourene et Ammouche, (2012). Mais, ces dattes sont considérées comme déchets à cause des altérations physiques qui se produisent au cours des différentes opérations de manipulation (Chocs, écrasement et dessèchement). Ces altérations provoquent des lésions qui accélèrent les processus d'altération biologique, qui comprennent les altérations microbiologiques causées par les levures et les moisissures et les altérations parasitaires par les insectes ravageurs qui dégradent les dattes stockées et causent une perte de poids et une dépréciation de la valeur commerciale du fruit (figure 14)



Figure 14. Altération parasitaire d'une datte.

1.2 . Caractéristiques biochimiques des sous-produits de dattes

Le tableau 12 regroupe les caractéristiques biochimiques du substrat utilisé.

1.2.1 . Taux d'humidité

L'eau est l'un des constituants essentiels du fruit. Elle a une importance fondamentale sur la qualité de la datte et agit sur sa conservation. Le taux d'humidité des sous-produits utilisés est de 21,7% (Tableau 12). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Besbes et *al* (2006).

De nombreux auteurs utilisent cette variable pour classer les dattes. Pour Toutain (1977), les dattes sont qualifiées de molles si elles dépassent un taux d'humidité de 30% et de sèches si ce taux est de moins de 10%. Les dattes sont demi-sèches ou demi-molles si le taux est compris entre 10 et 30%. Selon ce classement, les dattes utilisées dans ce travail sont demi-molles.

1.2.2 . Le pH

Le pH est un indice de qualité déterminant l'aptitude à la conservation des aliments. Il est donc important de mesurer le pH, afin de connaître la stabilité de l'aliment vis-à-vis des microorganismes.

Selon Meligi et sourial (1982), on peut classer les dattes en trois groupes selon leur pH :

- Dattes de mauvaise qualité : pH inférieur à 5,4. ;
- Dattes de qualité acceptable : pH compris entre 5,4 et 5,8 ;
- Dattes de bonne qualité : pH supérieur à 5,8.

Les résidus de dattes utilisé a un pH 5,3 ; ce qui montre que les dattes sont de mauvaise qualité.

Tableau 11. Caractéristiques biochimiques des sous-produits de dattes.

	Pulpe
Matière sèche (%)(*)	78,5±0,05
pH (*)	5,3±0,08
Acidité titrable (g /100 g du poids sec) (*)	0,27±0,01
Protéines (g / 100 g du poids sec) (*)	0,34±0,01

Cendre (%) (*)	0,61±0,11
Sucres totaux (%) (*)	65,3±0,23
Glucose (*)	16,20±0,16
Fructose (*)	15,3±0,03
Saccharose (*)	33,8±0,18
Matière grasse (%) (*)	0,19±0,05

(*) Valeur exprimée par rapport à la matière sèche (MS).

1.2.3 . Teneur en sucres

Les sous-produits des dattes sont considérés comme un substrat riche en sucres. Ceux-ci existent sous deux formes : saccharose et sucres réducteurs. Les sucres réducteurs principaux sont le fructose et le glucose. L'analyse de la composition des déchets utilisés montre un taux remarquable de sucres qui dépasse 60% du poids sec des fruits (MS) (Tableau 12).

Les sucres totaux sont composés de sucres en C12 (Saccharose) et de sucres simples ou sucres réducteurs en C6. La majorité des sucres est du saccharose (33,8%), le substrat montre un taux de fructose (15,3%) presque égal au taux de glucose (16,2%). Ces résultats sont en accord avec ceux de El-Arem et *al.* (2011), qui ont trouvé un taux de saccharose de 33,3% et un taux de sucres réducteurs de 29,8%.

1.2.4 . Composition minérale

La composition des dattes en matière minérale est présentée dans le tableau 13, *Deglet-Nour* contient 0,61% de cendres (tableau 12). Dans notre analyse, le potassium, le magnésium et le calcium sont les minéraux qui ont les teneurs les plus élevées et qui présentent respectivement 596,8, 92,2 et 38,7 mg/100 g de matière fraîche.

Tableau 12. Composition en éléments minéraux de pulpe de Deglet-Nour (mg/100 g de matière fraîche).

	Na	K	Mg	Cu	Fe	Ca	Zn
Pulpe	13,37±1,83	596,79±0,01	92,176±4,8	<0,1	1,5±0,41	38,70±1,2	0,72±0,009

1.3 . Conclusion

Les caractéristiques morphologiques et physicochimiques des fruits constituant la biomasse utilisée montrent qu'ils sont majoritairement constitués de dattes de la variété demi-molle ; ils renferment une humidité de 21,5%, ont un pH légèrement acide, un taux de protéine supérieur à 0,34% et un taux de sucres totaux qui dépasse les 60%. Ces résultats montrent que le sous-produit des dattes est un substrat très riche en sucres fermentescibles et qui peut donc être intéressant pour la transformation en bioéthanol par des levures.

2 . Optimisation de l'extraction

Le choix du plan d'expérience pour l'optimisation des conditions opératoires de l'extraction de jus du sous-produit de dattes prend en compte plusieurs critères. Tout d'abord, les paramètres à optimiser sont trois variables continues et supposées dépendantes les unes des autres : la température (X_1), le temps d'extraction (X_2) et le ratio pulpe/eau (X_3). L'objectif est d'optimiser ces trois facteurs et de modéliser leur influence sur la concentration en sucres, tout en réalisant un minimum d'expériences.

La macération est effectuée sous agitation en faisant varier le temps d'extraction. Une fois le temps de macération écoulé, le tout est filtré, puis conservé pour analyses physicochimiques.

2.1 . Dosage des sucres dans le jus

La concentration en sucres (glucose, fructose et saccharose) est déterminée par HPLC (voir Partie Matériel et méthodes 4.3). Les teneurs sont exprimés en g.L⁻¹.

2.2 . Modélisation

2.2.1 . Etablissement des modèles mathématiques

Le plan d'expérience de Doehlert à 3 facteurs a été utilisé pour l'exécution des manipulations. Les facteurs retenus ont conduit à la construction d'une matrice d'expérience. Ces facteurs ont été choisis en raison de leur importance et de leur influence sur la composition du jus final. En effet, le ratio pulpe/eau (X_1) a une influence sur la qualité du jus. Le temps de macération (X_2) et la température d'extraction ont un impact sur la diffusion des constituants de la chair dans l'eau de macération. La réponse qui a été retenue après la filtration est le rendement en sucres exprimés en Equivalent Glucose (Equi Glu) g.L⁻¹.

2.2.2 . Optimisation de l'extraction

Les manipulations effectuées à partir du plan d'expérience de Doehlert (3 facteurs) ont conduits aux résultats consignés dans le tableau 14. Le modèle mathématique obtenu tient compte des variables codées et se présente comme suit pour le suivi de la concentration en sucres des jus.

$$Y(X_1, X_2, X_3) = 156 - 0,625 X_1 + 5,125 X_2 - 46,25 X_3 - 2,25 X_1 X_2 + 1 X_1 X_3 + 0,5 X_2 X_3 + 4,125 X_1^2 + 1,625 X_2^2 + 10,875 X_3^2 \quad (\text{Equation 16})$$

$Y(X_1, X_2, X_3)$ = modèle mathématique pour le suivi de la concentration en sucres des jus de datte ;

X_1 = température (°C) ;

X_2 = temps d'extraction (min) ;

X_3 = Ratio dattes/eau.

Les facteurs des modèles sont linéaires (X_1, X_2, X_3), quadratiques (X_1^2, X_2^2, X_3^2) et avec interaction ($X_1 X_2, X_1 X_3, X_2 X_3$). Ils sont statistiquement considérés significatifs pour la concentration en sucres des jus des dattes si la probabilité (P) est $\leq 0,05$ (Tableau 14).

Le tableau 14 présente l'impact des différents facteurs sur la réponse. Il ressort du tableau 14 que, toutes singulières (X_2 et X_3) et quadratique (X_3^2) ont un impact significatif sur la concentration en sucres du jus de dattes ($p < 0,05$).

Tableau 13. Analyse de la réponse de surface de l'extraction du jus de dattes.

	T (°C)	Temps (min)	Ratio (pulpe/eau)	Equi Glu (g.L ⁻¹) (a)	Equi Glu prédite (b)	Res (c)
1	80	60	1:3	156	156,0	0
2	90	30	1:3	154	158,3	-4,25
3	70	90	1:3	174	169,8	4,25
4	80	90	1:2	216	219,4	-3,375
5	90	60	1:2	218	215,6	2,375
6	90	60	1:4	126	125,1	0,875
7	80	60	1:3	156	156,0	0
8	70	60	1:4	122	124,4	-2,375
9	80	30	1:2	212	210,1	1,875
10	80	60	1:3	156	156,0	0
11	80	30	1:4	120	116,6	3,375
12	90	90	1:3	165	164,0	1
13	70	60	1:2	218	218,0	-0,875
14	70	30	1:3	154	155,0	-1
15	80	90	1:4	126	127,9	-1,875

(a) Valeurs expérimentales.

(b) Valeurs théoriques.

(c) Résidus.

2.2.2.1 . Effet du ratio pulpe/eau (X_3) sur la concentration en sucres

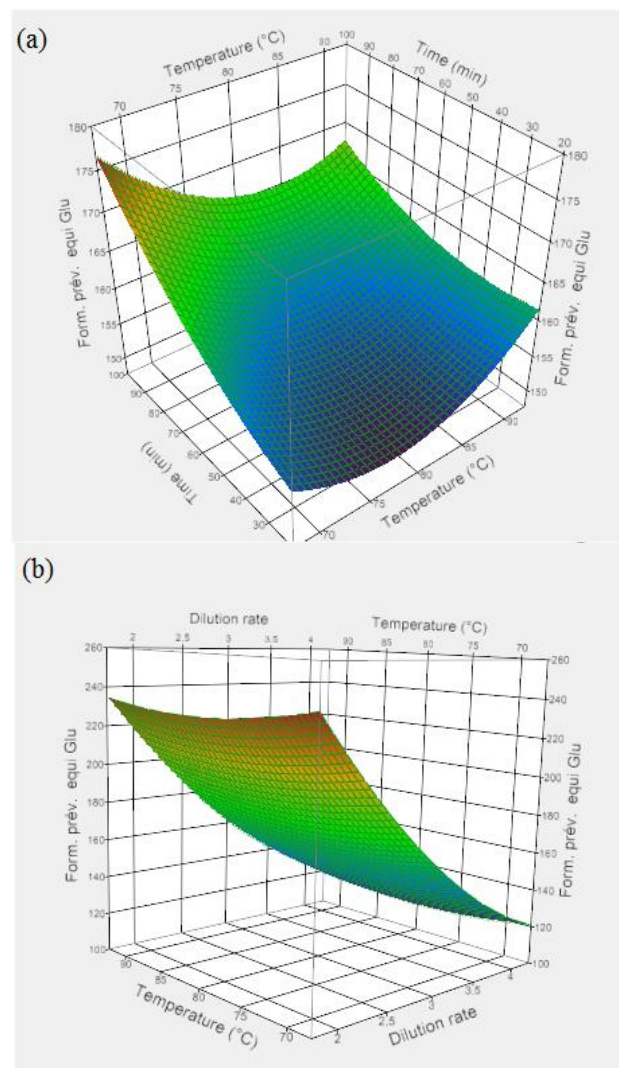
La figure 15 présente l'influence de différents facteurs sur la concentration en sucres des dattes. En présence du ratio pulpe/eau le plus faible (1:2), nous avons obtenu la concentration de jus la plus élevée (218 g.L⁻¹). Cette concentration diminue jusqu'à atteindre un minimum de concentration de 120 g.L⁻¹ à un ratio de pulpe/eau de 1:4, pour la même température 70°C (figure 15b) et le même temps d'extraction (60 min). En effet, la macération des pulpes dans l'eau, permettrait le passage des sucres dans l'eau. D'après le modèle mathématique, dans sa forme linéaire (X_2 et X_3) et quadratique (X_3^2), le ratio pulpe/eau a un impact significatif sur l'équivalent Glucose dans le jus, soit les probabilités 0,0154, 0,0001 et 0,0035 successivement (tableau 15).

Tableau 14. Estimation des coefficients du modèle pour suivre de la concentration en sucres en jus.

Terme	Estimation	Standard	T	Prob
constante	156	2,32	67,24	< 0,0001
X_1	-0,625	1,42	-0,44	0,6784
X_2	5,125	1,42	6,61	0,0154
X_3	-46,25	1,42	-32,55	< 0,0001
$X_1 * X_2$	-2,25	2,01	-1,12	0,3137
$X_1 * X_3$	1	2,01	0,5	0,6398
$X_2 * X_3$	0,5	2,01	0,25	0,8134
X_1^2	4,125	2,09	1,97	0,1056
X_2^2	1,625	2,09	0,78	0,4723
X_3^2	10,875	2,09	5,2	0,0035

2.2.2.2 . Effet du temps d'extraction sur la concentration en sucres

La figure 15b présente l'influence du temps de macération (X_2) sur la concentration en sucres. On constate qu'en présence du ratio pulpe/eau le plus faible (correspondant à -1 en valeur codée et 25% en valeur réelle) et temps de macération le plus court (30 minutes), on a également une concentration de 120 g.L⁻¹. Cette concentration augmente jusqu'à atteindre un maximum de concentration de 126 g.L⁻¹ pour un temps de macération de 90 minutes. En effet, un contact prolongé (X_2) des dattes (pulpe) avec l'eau, permettrait une extraction plus grande des sucres.



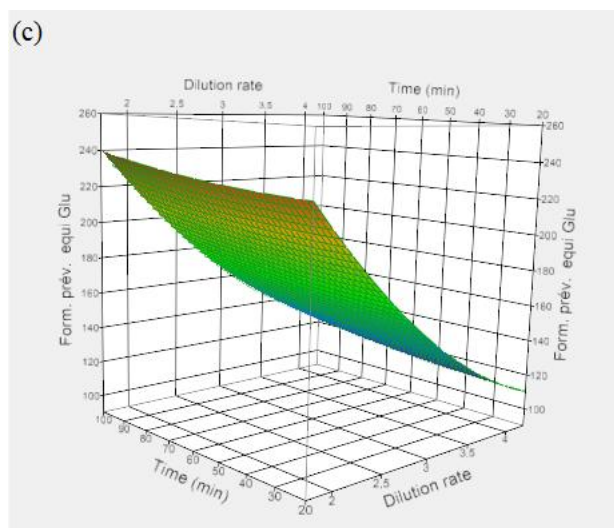


Figure 15. Surface de réponse traduisant l'impact des interactions entre les facteurs X_1 , X_2 et X_3 sur l'équivalent glucose des jus de dattes (a) interaction (X_1-X_2) , (X_1-X_3) et (X_2-X_3) .

2.3 . Conclusion

L'objectif de cette première partie de l'étude était d'optimiser la concentration en sucres des jus extraits des sous-produits de dattes « *Deglet-Nour* ». Ainsi, au terme de ce travail, nous avons constaté que la concentration en sucres du jus de dattes respecte un modèle du second degré avec interaction et que le ratio pulpe/eau et les temps de macération ont un impact significatif sur la concentration finale en sucres du jus obtenu. Cette étude a également permis de définir des conditions permettant d'extraire un jus très riches en sucres et qui sont (80°C, 90 min et 1:2 ratio pulpe/eau). La concentration en sucres fermentescibles est un élément important pour transformer le sirop en bioéthanol par des levures.

PARTIE 2. SIROPS DE DATTES

Le jus des dattes obtenu juste après l'extraction peut être transformé en sirop par condensation ou déshydratation. La condensation est une opération essentielle permettant d'inhiber les réactions enzymatiques, faciliter l'entreposage et diminuer le développement des microorganismes, ce qui améliore la conservation du produit.

Le sirop des sous-produits de dattes, faisant l'objet de la présente étude, est obtenu par la méthode d'extraction par diffusion (décrite ci-dessus). Il présente une coloration foncée et il est limpide, ce qui permet d'éviter d'avoir recours aux procédés de clarification. Ses caractéristiques sont données ci-dessous.

1. Caractérisation du sirop de dattes

Le jus de fruits est le liquide non fermenté, mais fermentescible, tiré de la partie comestible de fruits (Codex Stan, 2005).

Le concentré de jus ou sirop est le produit obtenu à partir des jus de fruit, après l'élimination d'une quantité suffisante d'eau pour porter la valeur de °Brix à un niveau supérieur de 50% au moins de la valeur initiale de °Brix de jus utilisé (Codex Stan, 2005).

$$^{\circ}\text{Brix de sirop} = 1,5 \times ^{\circ}\text{Brix de jus de fruit.}$$

Dans notre cas, le jus de dattes, on peut le nommer sirop de dattes à partir de 300 g de sucres par litre de jus.

1.1. Rendement en sirop

Le rendement d'extraction de jus de dattes est de 62,5%. Après condensation à 80°C, le rendement en sirop (72°Brix) diminue pour atteindre une valeur finale de 25%.

1.2. Caractéristiques physico-chimiques de sirop de datte

1.2.1. pH

Le sirop présente un pH 4,9, cette valeur est relativement faible comparativement au pH des dattes entières (pH 5,8). La diminution du pH peut être due à la présence d'une quantité élevée d'eau dans le sirop, ce qui permet d'entraîner les acides préexistants de la datte vers son extrait. Ces acides organiques (acide acétique, acide citrique) sont produits

par des microorganismes tels que les levures et les moisissures qui se trouvent naturellement dans les dattes. Nos résultats se rapprochent de ceux de Mekki et *al.* (1983) qui ont trouvé un pH 4,85 dans du jus concentré des dattes.

1.2.2. Teneur en eau

La teneur en eau du sirop est de 26,33%, ce qui indique que la vitesse de détérioration des constituants du sirop est très faible. En effet, l'humidité constitue le principal facteur favorisant le développement des microorganismes. Ceci permet de classer le sirop des dattes parmi les aliments à faible humidité dont la conservation est très facile.

1.2.3. Teneur en cendres

Les résultats obtenus (tableau 16) indiquent que le sirop renferme des taux appréciables d'éléments minéraux (1,49 %). Al-Farsi et *al.*, 2006 qui ont travaillé sur des dattes provenant du Sultanat d'Oman, ont montré que le sirop (72°Brix) obtenu renferme une teneur en cendre comprise entre 1,23 et 1,76%, ce qui est en accord avec nos résultats.

1.2.4. Teneur en protéines

Le taux de protéines du sirop de datte *Deglet-Nour* (72°Brix) est de 0,97 g /100g de matière sèche) (tableau 16), très proche de la valeur citée par Alfarsi et *al.* (2007) qui ont trouvé 0,95, 0,95 et 1,09 pour respectivement les sirops obtenus à partir des variétés *Mabseeli*, *Um-sellal* et *shahal* provenant du Sultanat d'Oman.

1.2.5. Teneur en sucres

Les sucres sont les constituants les plus importants dans le sirop de dattes (73,7% MS). Les résultats présentés dans le tableau 16 montrent que le sirop renferme 56,14% de sucres réducteurs et 17,4% de saccharose.

Tableau 15. Caractéristique biochimique du sirop et de la pulpe de datte Deglet-Nour (72°Brix).

	Sirop	Pulpe
Matière sèche (%)(*)	73,65±0,67	78,5±0,07
pH (*)	4,34±0,02	5,3±0,08
Acidité titrable (g/100 g du poids sec) (*)	0,22±0,03	0,27±0,01
Protéines (g/100 g du poids sec) (*)	0,97±0,02	0,34±0,01
Sucres totaux (%)*	73,65±0,09	65,3±0,23
Glucose (%)*	33,06±0,04	16,2±0,16
Fructose (%)*	23,08±0,05	15,3±0,03
Saccharose (%)*	17,37±0,02	33,8±0,18
Cendre (%)*	1,49±0,52	0,61±0,11
Matière grasse (%)(*)	0,03±0,02	0,19±0,05

(*) Valeur moyenne ± écart-type, exprimée par rapport à la matière sèche.

1.2.6. Eléments minéraux

Les résultats de la composition minérale des sirops obtenus à partir des sous-produits des dattes sont présentés dans le tableau 16. Les teneurs en Mg et Ca sont respectivement de 123,5 et 47,5 mg/100 g de matière fraîche (sirop) (tableau 17).

Tableau 16. Composition en éléments minéraux du sirop (mg/100 g de matière sèche).

	Na (*)	K (*)	Mg (*)	Cu (*)	Fe (*)	Ca (*)	Zn (*)
Sirop	80,1±2,12	670,7±0,01	123,5±3,32	<0,1	0,8±0,57	47,5±1,5	0,67±0,012

(*) Valeur moyenne ± écart-type exprimée par rapport à la matière sèche.

Le sirop de dattes est très riche en oligo-éléments, qui sont nécessaires à la croissance de la levure et donc à la production d'éthanol. L'extrait concentré de déchets de dattes est très riche en K^+ (670,7 mg par 100 g) (tableau 17), qui participe à la régulation du pH intercellulaire, et en Ca^+ (47,5 mg par 100 g), qui s'incorpore dans les protéines membranaires et participe à la protection de la levure contre la pression osmotique causée par les concentrations élevées en sucres et qui augmente sa tolérance contre la concentration élevée en éthanol (Regina *et al.* 1988), ainsi qu'en Na^+ (80,1 mg par 100g) qui diffuse passivement à travers la cellule et stimule le transport des sucres (Jones *et al.* 1981).

2. Effet de la haute température sur la composition du sirop de dattes

La stérilisation est un traitement thermique qui a pour finalité de détruire toute forme microbienne vivante. Il consiste à chauffer les milieux de culture à 120°C pendant 20 min avant leur utilisation pour la production d'éthanol.

La haute température (120°C) affecte les caractéristiques physico-chimiques du milieu traité. Ce qui nous a amené à étudier son effet sur la composition du sirop de dattes le substrat qui va être utilisé pour la production d'éthanol par fermentation. Les résultats sont illustrés dans la figure 16.

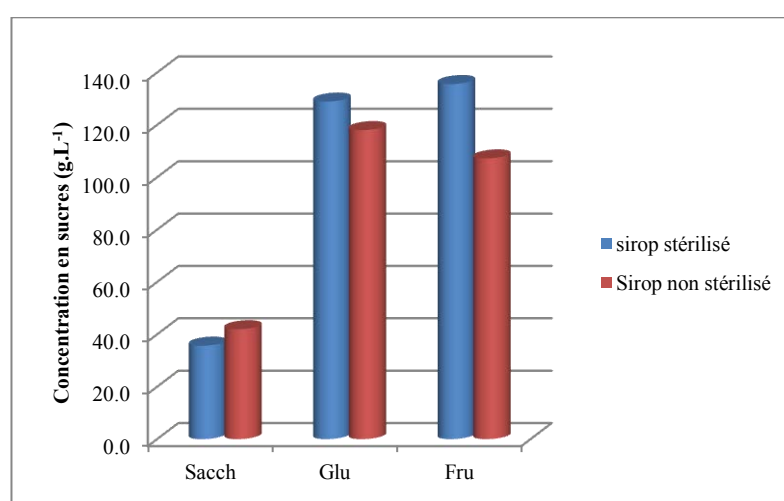


Figure 16. Effet de la stérilisation sur la composition du sirop en sucres.

2.1. Sucres totaux

La teneur en sucres totaux du sirop avant traitement thermique est $269,3 \text{ g.L}^{-1}$, cette valeur augmente après le traitement thermique pour atteindre 302 g.L^{-1} . D'après les résultats présentés figure 16, seuls les sucres réducteurs augmentent dans le milieu contrairement au taux de saccharose qui diminue. Cette augmentation est probablement expliquée par l'hydrolyse de la cellulose et du mannose présents dans le sirop traité à haute température (120°C) durant 20 minutes à pH 5,3. Ce résultat est validé par Shafiei et *al.*, (2010), qui ont travaillé sur l'hydrolyse de fibres de dattes.

2.2. Sucres réducteurs

La teneur en sucres réducteurs (Glucose et Fructose) augmente dans le sirop autoclavé. Le glucose est également influencé par la haute température (120°C) et le pH acide (5,3), qui génèrent des dérivés furfuraliques, en raison de l'instabilité des oses en milieu acide et à chaud. Par ailleurs, certains phénomènes biologiques (réaction de Maillard, oxydation...), sensible à la température (120°C), pourraient être à l'origine de la diminution de la teneur en sucres réducteurs. D'après Weil, (2001), la fonction aldéhydique des oses est en effet susceptible d'être oxydée en présence de sels.

2.3. Saccharose

La teneur en saccharose du sirop traité est inférieure à celle de sirop non stérilisé (figure 16). Quand on chauffe le sirop de dattes durant la stérilisation, les liaisons de saccharose se cassent pour former du glucose et du fructose. L'action de la température élevée 120°C durant l'autoclavage (20 minutes), provoque l'hydrolyse du Saccharose en sucres réducteurs (Glucose et fructose).

La couleur du sirop de dattes devient plus foncée après le traitement thermique. Roufegari-Nejad, (2002) affirme que les substances colorantes sont le résultat d'un brunissement non enzymatique (Reaction de Maillard) qui est définie comme l'ensemble des interactions résultant de la réaction initiale entre un sucre réducteur et un groupement aminé. Les mélanoides produits de réaction de Maillard sont les responsables majeur de la couleur foncée du sirop (Wang et *al.*, 2001 ; Nasehi et Ansari, 2012),.

3. Conclusion

Le jus de datte obtenu par la méthode d'extraction par diffusion est transformé en sirop par concentration, ce qui entrave le développement des microorganismes et facilite la conservation du produit. Le sirop est caractérisé par une teneur élevée en sucres fermentescibles (glucose, fructose et saccharose) et éléments minéraux. Ce substrat riche en matière organique doit être valorisé. Pour cela, nous avons développé un procédé biotechnologique pour pouvoir utiliser le sirop obtenu pour produire du biocarburant à l'aide de microorganismes, tels les levures.

PARTIE 3. PRODUCTION DE BIOETHANOL PAR DES LEVURES

Les fermentations alcooliques présentées dans cette thèse ont été réalisées en mode « batch » sur milieu de culture (décrit dans la partie Matériel et méthodes) utilisant le sirop des sous-produits des dattes comme substrat carboné et le NH_4Cl et l'extrait de levure comme source d'azote, ainsi que les sels et les oligo-éléments. Des milieux non enrichis ont été aussi fermentés afin de vérifier de la pertinence de rajouter une source d'azote.

Les travaux ont été réalisés avec 3 souches de levures, commercialisées par L'Institut Pasteur (France) ; une souche de *Saccharomyces cerevisiae* 522D, et deux autres osmotolérantes : *Zygosaccharomyces rouxii* IP 2021.92 et *Candida Pelliculosa* IP 820.63, ainsi qu'une souche isolée des sous-produits de dattes, par Monia JEMNI au centre régional de la recherche en Agriculture Oasienne de Deguech à Tozeur en Tunisie.

1 . Production de bioéthanol par *S. cerevisiae* 522D

La première expérience a été réalisée en mode batch (en duplicata), contenant une concentration de 90 g. L^{-1} en substrat. Les flacons stérilisés à une température de 120°C durant 20 minutes sous pression de 1 bar, ont étéensemencés avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* 522D et incubés à 28°C, durant 72 h sous une agitation de 180 rpm.

1.1. Cinétique fermentaire

1.1.1. Biomasse

La fermentation se caractérise par un profil en deux phases (figure 17). Lors de la première phase, la production d'éthanol et de glycérol sont couplées à la croissance cellulaire. Le taux de croissance maximale est atteint après 48 heures de la fermentation (Figure 17). On observe ensuite le début de la seconde phase correspondant à une phase stationnaire.

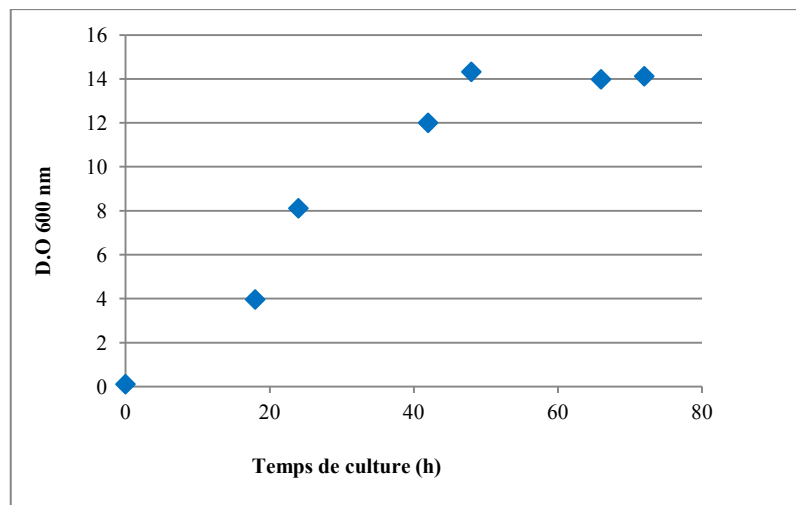


Figure 17. Evolution de la biomasse au cours de la fermentation de M-S100, par *S. cerevisiae*.

1.1.2. Evolution des sucres dans le milieu de fermentation

Au cours de la fermentation, la concentration en sucres résiduels est quantifiée. Durant les premières heures de fermentation, la levure a dégradé le glucose et le fructose, qui diminuent de $31,8 \text{ g.L}^{-1}$ et $33,6 \text{ g.L}^{-1}$ initialement à respectivement $21,3 \text{ g.L}^{-1}$ et $14,4 \text{ g.L}^{-1}$ en fin de culture. En revanche, le saccharose n'est pas consommé.

Les sucres simples (glucose et fructose), pouvant pénétrer facilement à travers la paroi et la membrane cellulaire des levures, sont par conséquent rapidement fermentés. Par contre, le saccharose, ne pénètre dans la cellule que si la membrane est pourvue d'une perméase spécifique, ou après hydrolyse enzymatique.

L'augmentation de la quantité de fructose de $14,4 \text{ g.L}^{-1}$ (18 heures de fermentation) à $16,5 \text{ g.L}^{-1}$ (24 heures de fermentation), alors que la quantité de saccharose diminue de $23,6 \text{ g.L}^{-1}$ à $9,8 \text{ g.L}^{-1}$ durant le même laps de temps (figure 18), montre bien que le saccharose est hydrolysé par les levures qui sont capables de sécréter une invertase dans le milieu extracellulaire.

Le saccharose est un diholoside formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose reliées par une liaison osidique α (1 $\rightarrow$ 2) β . D'après Siqueira et *al.*, 2008, le saccharose, par l'effet de l'enzyme invertase (β -fructofuranosidase) secrété dans le milieu extracellulaire par *Saccharomyces cerevisiae*, s'hydrolyse en glucose et en fructose, ce qui permet son assimilation par la levure.

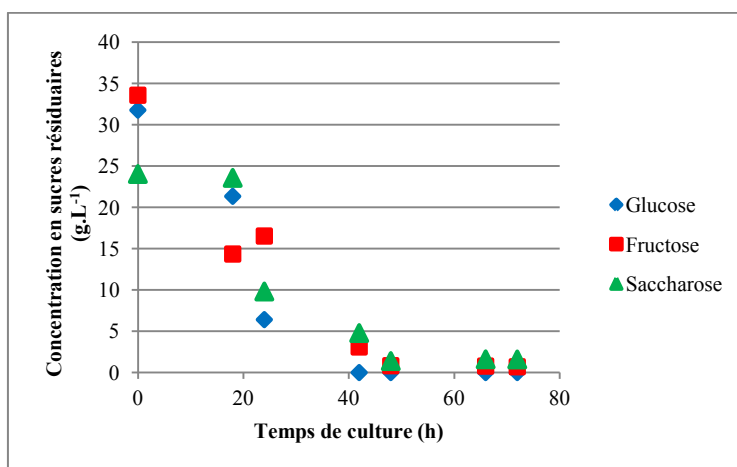


Figure 18. Evolution des sucres au cours de la fermentation de M-S100, par *S. cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae a consommé la totalité des sucres après 48 heures de fermentation.

1.1.3. Evolution de la source d'azote (NH_4Cl) et du pH

La fermentation sur le milieu à base de sirop de datte (10°Brix) peut être découpée en deux périodes, de 0 à 18 heures, la production de bioéthanol et de glycérol est faible (respectivement 6,4 g.L⁻¹ et 1,8 g.L⁻¹), alors que la quantité de NH_4Cl diminue rapidement dans le milieu, de 570,7 mg.L⁻¹ à 79,1 mg.L⁻¹ après 18 heures de fermentation (Figure 19).

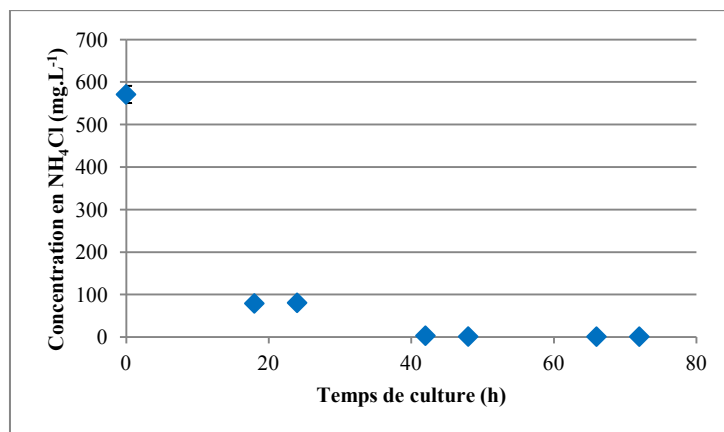


Figure 19. Evolution de la concentration en NH_4Cl au cours de la fermentation de M-S100, par *S. cerevisiae*.

Cette croissance a un impact sur l'évolution du pH, qui diminue de pH 5,0 à pH 3,4 (Figure 20).

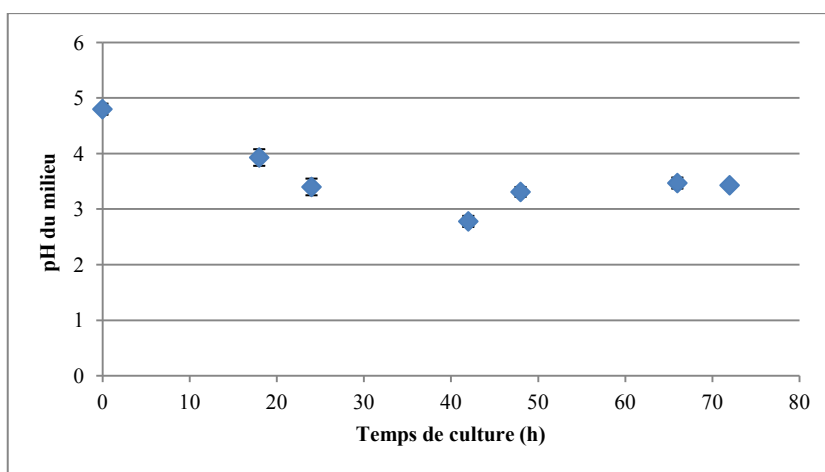


Figure 20. Evolution du pH au cours de la fermentation de M-S100, par *S. cerevisiae*.

Au cours de la fermentation, la consommation des sucres par la levure conduit à la formation d'acides organiques typiques de la fermentation, les plus importants sont l'acide succinique, l'acide lactique et l'acide acétique. D'après Torija et *al.* (2003), Les acides organiques consommés ou produits subissent une dissociation et libèrent des ions hydrogènes dans le milieu de fermentation influençant ainsi le pH. Les auteurs précisent aussi que certains ions hydrogènes proviennent de l'assimilation de la source azotée notamment des ions ammonium et des acides aminés qui pourraient contribuer à la chute du pH par assimilation des acides aminés de charge positive.

1.1.4. Evolution des produits de fermentation

Au début de la fermentation (0 heure à 18 heures), la production de bioéthanol et de glycérol est faible (respectivement $6,4 \text{ g.L}^{-1}$ et $1,8 \text{ g.L}^{-1}$), elle devient ensuite

conséquence pour atteindre 40 g.L^{-1} d'éthanol et 5 g.L^{-1} de glycérol après 72 heures de fermentation (Figure 21). Selon Hohmann, (2002), les levures doivent en permanence mettre en œuvre des mécanismes de régulation pour s'adapter à leur environnement et maintenir leur homéostasie. 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. La réponse la plus significative à ce stress consiste en l'accumulation de solutés neutres dans le cytoplasme, en particulier des polyols, pour contrebalancer la pression osmotique (Djelal et *al.*, 2012b). Ceux-ci, en augmentant l'osmolarité de la cellule, permettent de préserver l'eau dans le cytoplasme, assurant le maintien de la pression de turgescence et du volume de la cellule.

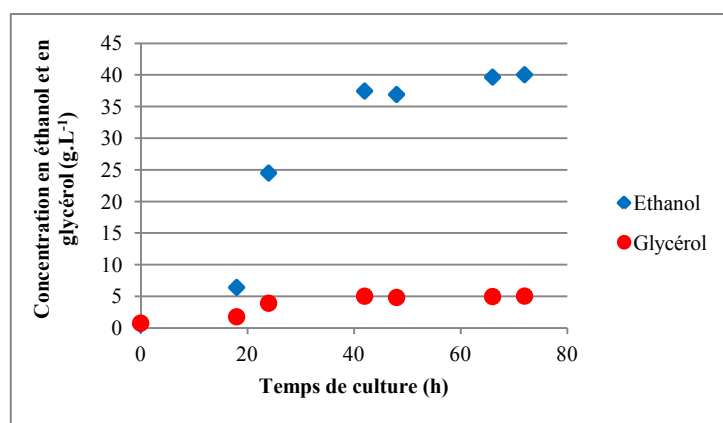


Figure 21. Evolution de la concentration en éthanol et en glycérol, au cours de la fermentation de M-S100, par *S. cerevisiae*.

1.1.5. Efficacité fermentaire

Au cours de la fermentation alcoolique, les sucres fermentescibles contenus dans le milieu de culture peuvent être convertis en éthanol (alcool éthylique) et en gaz carbonique par l'action des microorganismes, principalement des levures.

Selon l'équation (2), une mole de glucose serait convertie par la levure en deux moles d'éthanol et deux moles de CO_2 . A partir de cette relation nous avons calculé la quantité théorique d'éthanol produite à partir de la quantité initiale de sucres totaux du milieu, exprimée en équivalent glucose et nous avons comparé la quantité d'éthanol obtenue à la fin de la fermentation et la quantité d'éthanol théorique, pour pouvoir ensuite calculer le TC_{EtOH} .

Tableau 17. Sucres totaux, sucres consommés, rendement en éthanol, glycérol et taux de conversion de la fermentation de M-S100, par *S. cerevisiae*.

Milieu à base de sirop de datte	
Equi Glu (g.L ⁻¹)	90,6
Sucres totaux consommés : Equi Glu (g.L ⁻¹)	88,2
Concentration finale en éthanol (g.L ⁻¹)	40,0
Rendement en éthanol (g.g ⁻¹)	0,4
Rendement en glycérol (g.g ⁻¹)	0,05
Concentration théorique en éthanol (g.L ⁻¹)	45,1
TC EtOH (%)	88,8

(*) Les concentrations en sucres simples du milieu synthétique sont similaires à celles du milieu de culture à base de sirop de dattes.

L'éthanol obtenu est inférieur à l'éthanol théorique. Le milieu de culture à base de sirop de datte présente un taux de conversion élevé (88,8%) (Tableau 18). Ce résultat est expliqué par le fait qu'une partie des sucres consommés par les *S. cerevisiae*, est détournée vers des fonctions de maintenance à l'intérieur de la cellule.

1.1.6. Conclusion

Le présent travail a montré que la valorisation des dattes en général, écarts de triage de la variété *Deglet-Nour*, la plus commercialisée en Tunisie, en vue de leur éventuelle transformation en bioéthanol est possible. Après l'extraction des sucres du déchet de dattes, le jus obtenu a été concentré et utilisé par la suite comme milieu de culture pour produire du biocarburant (Bioéthanol) par *Saccharomyces cerevisiae* 522 D.

Les objectifs que nous nous étions fixés étaient de produire des bio-alcools et d'examiner leur évolution quantitative au cours d'une fermentation sur sirop de dattes. Sur ce substrat, *Scerevisiae* 522D a produit 40 g.L⁻¹ d'éthanol, et 5 g.L⁻¹ de glycérol comme produit secondaire de la fermentation.

2. Influence de la nature de la source d'azote et du substrat sur la production de bioéthanol

2.1. Impact de la Nature de source d'azote

Pour déterminer l'effet de l'enrichissement en source d'azote sur la production de bioéthanol, des cultures ont été effectuées sur des milieux à base de sirop de dattes avec une concentration en sucres de 90 g.L^{-1} et en présence de deux types de sources d'azote ; une source minérale (NH_4Cl) et une source organique (Extrait de levure).

Trois types de milieux de fermentation ont été utilisés : un milieu enrichi par une source d'azote minérale, le chlorure d'ammonium ($\text{M_NH}_4\text{Cl}$) à une concentration de 500 mg.L^{-1} et un autre enrichi par une source organique, l'extrait de levure (M_EL) à une concentration de 16 g.L^{-1} ; et un dernier milieu non enrichi et qui sert de témoin (M_T). Les cultures sont conduites en duplicata, en mode *batch* et sontensemencées par la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Toutes les cultures sont incubées 55 heures à 28°C à 180 rpm et à pH initial de 5.

L'évolution de la biomasse ainsi que les concentrations en éthanol, en sucres et le pH ont été suivies au cours de la fermentation.

2.1.1. Effet des sources d'azote sur la biomasse

Il est bien clair que la croissance de *S. cerevisiae* 522D est plus appréciable pour les milieux enrichis en azote. En effet, à la fin de la fermentation, la biomasse, dans un milieu enrichi par le NH_4Cl est presque deux fois plus importante qu'un milieu non enrichi ; elle atteint $4,85 \cdot 10^8 \text{ UFC. mL}^{-1}$, alors que le milieu enrichi par l'extrait de levure a une densité cellulaire trois fois plus élevé ($7,51 \cdot 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$) (Figure 22).

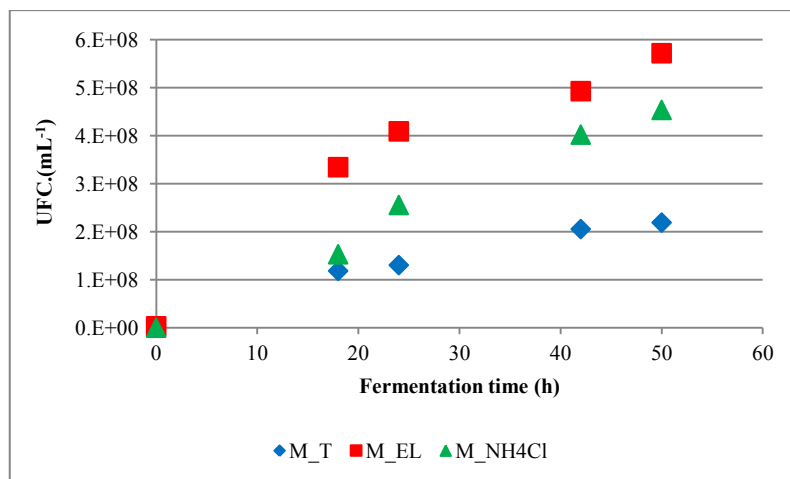


Figure 22. Evolution de la biomasse au cours de la fermentation par *S. cerevisiae*.

L'extrait de levure favorise la croissance cellulaire, il donne une meilleure croissance cellulaire suivi de NH_4Cl , alors que le milieu non enrichi présente une croissance cellulaire faible, par rapport aux milieux enrichis, ce qui prouve que le sirop de datte contient de l'azote assimilable par la levure comme les acides aminés (Assiery et *al.*, 2015) mais pas en quantité suffisante. D'après Henschke et Jiranck, (1993), Les acides aminés pénètrent dans les cellules par transport actif et peuvent s'y accumuler. Une fois à l'intérieur, les acides aminés, selon les cas, sont intégrés directement dans les protéines, dégradés en ammonium (NH_4^+) ou convertis en glutamate.

Ces résultats coïncident avec ceux de Laopaiboon et *al.* (2009), qui ont étudié l'effet de l'ajout de différentes sources d'azote (Extrait de levure et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), sur la production d'éthanol à partir de jus de sorgho, et qui ont trouvé que la levure se développe aussi sur le milieu non enrichi, comme sur les milieux enrichis par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et l'extrait de levure.

2.1.2. Effet de l'enrichissement sur La consommation des sucres

L'observation des courbes (a), (b) et (c) de la figure 23, fait ressortir la différence entre les effets de l'azote ammoniacal (NH_4Cl) et de l'azote organique (Extrait de levure) sur la consommation des sucres existants dans le moût.

Environ 24 et 42 h sont nécessaires pour une consommation totale des sucres dans le cas d'un ajout respectivement d'extrait de levure et de NH_4Cl . Par contre, dans le cas du milieu non enrichi, même après deux jours de culture, il reste du saccharose dans le milieu. Dans les trois milieux, la diminution de la concentration en saccharose est faible les 18

premières heures de fermentation (Figure 23, (a), (b), (c)), par rapport à celles des monomères.

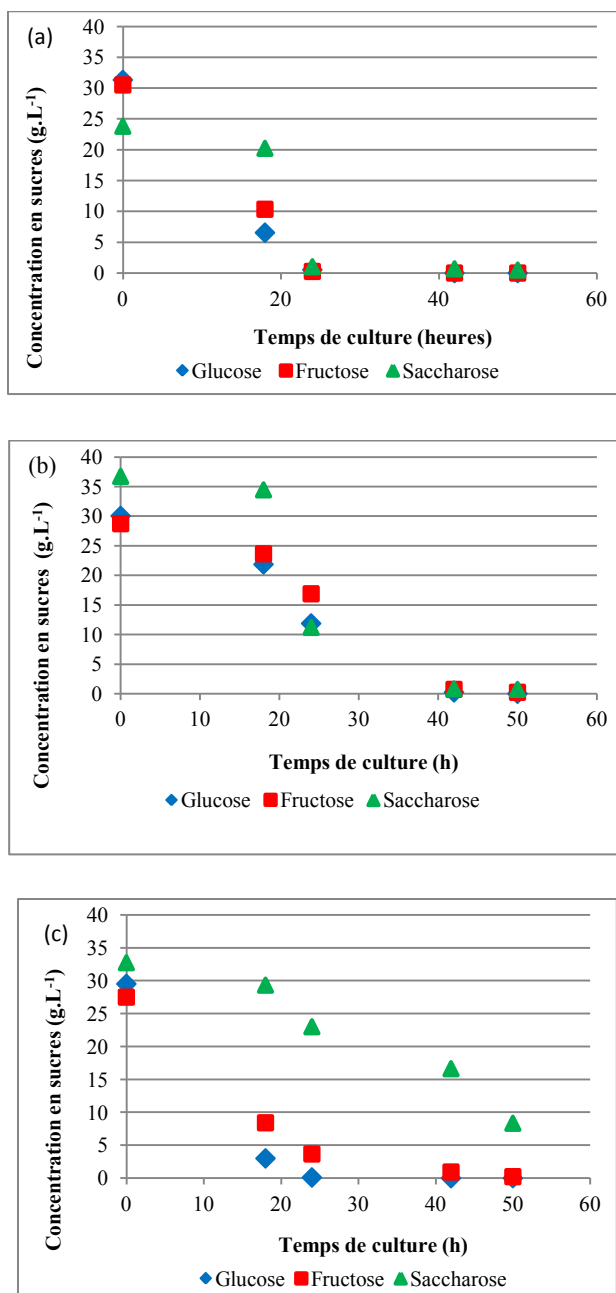


Figure 23. Concentration en sucres au cours de la fermentation par *S. cerevisiae* ; (a) *M_EL*, (b) *Milieu_NH₄Cl*, (c) *M_T*

Selon Bely et *al.* (1990) l'azote assimilable est généralement le nutriment le plus limitant dans les milieux de culture pour les levures ; il joue donc un rôle essentiel sur la cinétique fermentaire. Ils confirment que les carences en azote assimilable peuvent être considérées comme les causes essentielles des fermentations «lentes».

2.1.3. Effet de la source d'azote sur la Production d'éthanol

L'ammonium, assimilé très rapidement par la levure, a un impact significatif sur la croissance, qui est cependant moins remarquable que l'impact d'un substrat complexe comme l'extrait de levure. produit à partir des cellules de levures (Chae et *al.*, 2001). Ces résultats sont dus essentiellement à la richesse de l'extrait de levure en glutamate, glucanes, nucléotides et en vitamine B, composés indispensables pour la régénération et la formation des molécules (Jorgensen, 2009).

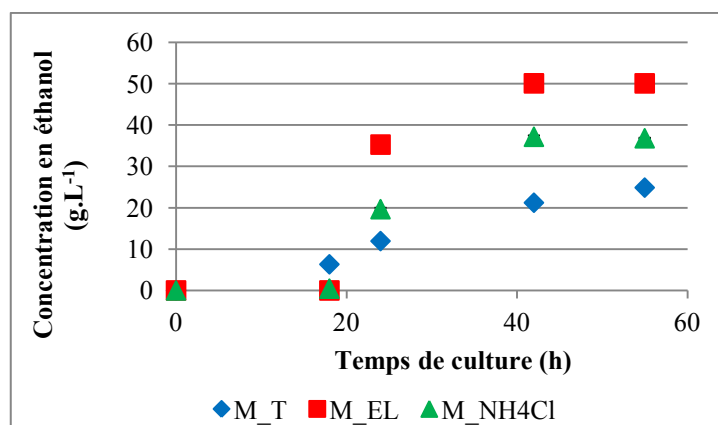


Figure 24. Evolution de la concentration en éthanol durant la fermentation par *S. cerevisiae*.

Le taux d'éthanol pour les trois milieux augmente pour atteindre une valeur maximale de 50 g.L⁻¹ pour le milieu enrichi par l'extrait de levure ; il est de 36,8 g.L⁻¹ en présence de NH₄Cl et de 24,8 g.L⁻¹ en absence de supplémentation azotée (Figure 24).

La production d'éthanol est meilleure en présence d'extrait de levure qu'en présence d'une source d'azote inorganique comme le NH₄⁺. Ces résultats sont validés par Laopaiboon et *al.*(2009) qui ont trouvé que l'extrait de levure permet une meilleur production d'éthanol à partir d'un jus de sorgho à 30°Brix.

2.1.4. Effet de la source d'azote sur Le pH du milieu

Le profil de pH indique une évolution très faible pour le milieu non enrichi et le milieu enrichi par de l'extrait de levure, il diminue d'une valeur proche de 5 initialement à 3,9 en fin de culture ; alors que le pH du milieu enrichi par du NH₄Cl diminue plus rapidement pour se stabiliser à 2,4 en fin de culture (Figure 25).

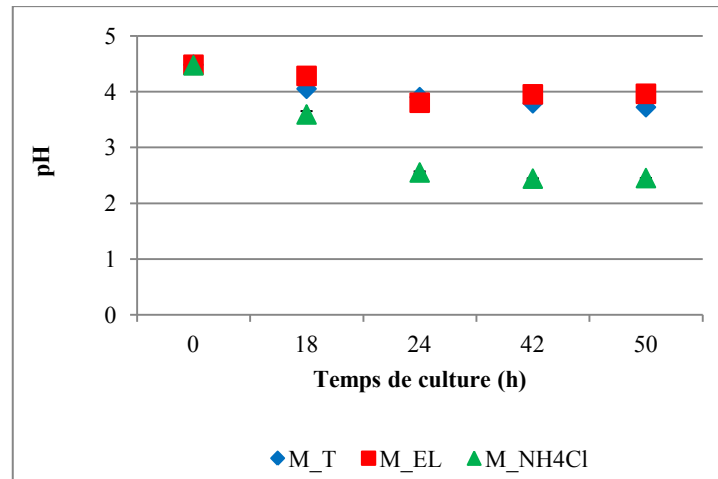


Figure 25. Evolution du pH durant la fermentation par *S. cerevisiae*.

Diverses études (Kotyk, (1989) et Sigler et *al.*, (1981)) ont montré qu'au cours de la fermentation alcoolique par *S. cerevisiae* sur un milieu où l'ion ammonium est la seule source d'azote, il y a une baisse du pH. Cette assimilation de l'ion ammonium serait donc liée à l'excrétion des protons dans le milieu extracellulaire. Ainsi, selon Won et *al.* (1993), une mole d'ions ammonium assimilée correspond à une mole de protons excrétée (Equation 17).

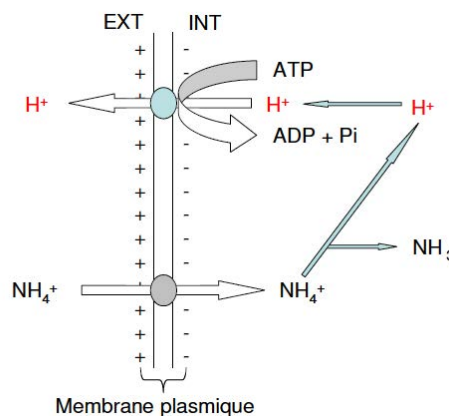
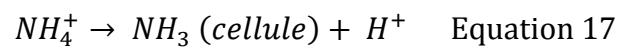


Figure 26. Schéma de fonctionnement de l'uniport électrophorétique accumulatif responsable de l'entrée de l'ion ammonium chez *Saccharomyces cerevisiae* (Salmon, 1998).

Pour des raisons d'équilibre de charge de part et d'autre de la membrane plasmique, l'entrée de l'ion ammonium est couplée à l'excrétion d'un proton par la pompe ATPase de la membrane selon le mécanisme présenté dans la figure 26.

2.1.5. Conclusions

Les résultats ci-dessus montrent que les carences en azote assimilables peuvent donc être considérées comme les causes essentielles des fermentations « lentes ».

D'après Liu. (2013) et Pandey et al, (2014), les sources d'azotes organiques comme l'extrait de levure, sont onéreuses par rapport aux sources d'azote minérales comme les sels d'ammonium. Ils affirment aussi que ces derniers sont les plus étudiés à l'échelle industrielle. Nous avons donc choisi l'utilisation de NH_4Cl comme source d'azote pour le reste de notre étude.

2.2. Effet de la concentration en substrat sur la production d'éthanol

Un des objectifs de ces travaux de recherche est d'étudier la tolérance des levures utilisées à une concentration élevée en substrat pour identifier les phénomènes biologiques impliqués. Les travaux antérieurs de Hohmann en 2002 et Djelal et *al.* en 2005 s'accordent sur le fait qu'une concentration élevée en sucres inhibe la croissance cellulaire et la capacité fermentaire de la levure et réduit la viabilité cellulaire. En ce sens, une 3^{ème} série de fermentation a été réalisée en mode batch. 4 milieux contenant 500 mg.L^{-1} de NH_4Cl et différentes concentrations initiales en Equivalent glucose 45, 90, 175 et 350 g.L^{-1} , nommées respectivement M-S45, M-S90, M-S175 et M-S350 ont étéensemencés avec la même quantité de levure *S. cerevisiae* et incubés à 28°C, à 180 rpm. Toutes les cultures ont été dupliquées.

L'impact de la pression osmotique causée par la concentration élevée en sucres sur le comportement macro-cinétique (croissance cellulaire, capacités et performances (rendement, production, ...)) a été analysée, afin de contribuer à l'identification et à la caractérisation de la réponse du microorganisme à son environnement pour optimiser son activité et intensifier les performances de production de bioéthanol.

2.2.1. Effet sur la biomasse

Pour une concentration initiale en Equivalent glucose de 175 g.L^{-1} , une faible activité est observée en début de culture (Figure 27). Après 24 heures, seulement $10,9 \text{ g.L}^{-1}$ d'Equi Glu ont été consommés. *S.cerevisiae* 522 D, a donc besoin d'une période d'adaptation plus longue lorsque la concentration initiale en sucres est élevée.

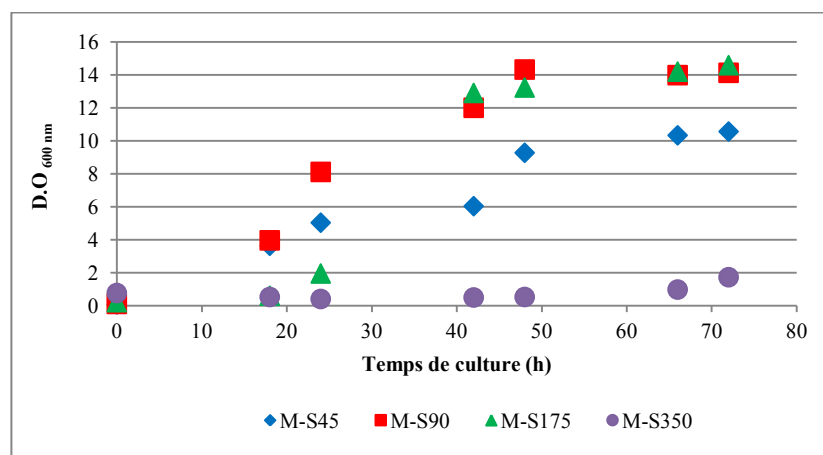
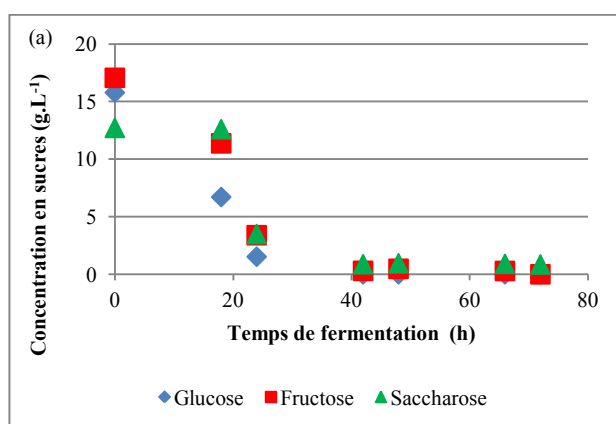


Figure 27. Evolution de la biomasse au cours de la fermentation par *S. cerevisiae*.

2.2.2. Effet sur la concentration en sucres

La figure 28 présente l'évolution en fonction du temps des concentrations en sucres. La consommation des sucres est presque totale après 40 heures de culture pour les milieux contenant initialement 45 g.L^{-1} et 90 g.L^{-1} d'Equi Glu, alors que pour les milieux contenant 175 g.L^{-1} d'Equi Glu, la consommation des sucres est presque totale après 70 heures de fermentation. Pour une concentration initiale de 350 g.L^{-1} , nous avons observé une inhibition totale de toute activité fermentaire.



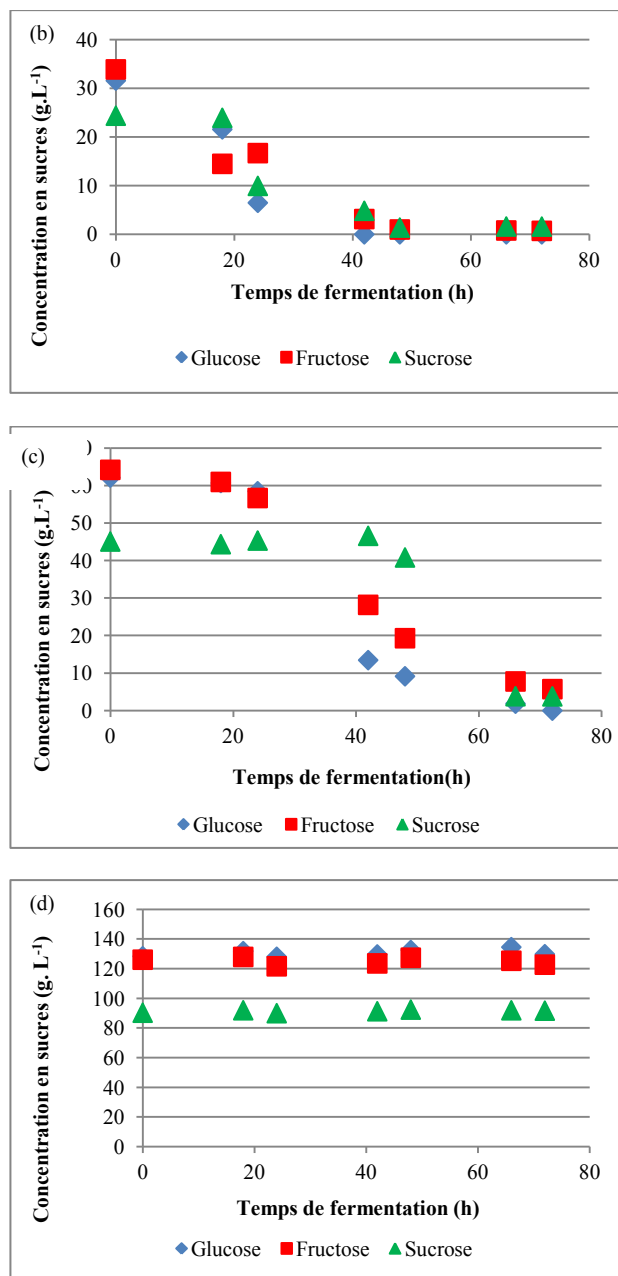


Figure 28. Concentration en sucres au cours de la fermentation. (a) M-S45, (b) M-S90, (c) M-S175, (d) M-S350 par *S. cerevisiae*.

Les résultats montrent une inhibition totale de toute activité fermentaire pour une concentration en sucres dans le milieu à 350 g.L⁻¹ et une légère inhibition à 175 g.L⁻¹, puisque la phase de latence (24 h) pour M-S175 est plus importante que pour M-S45 et M-S90. Les sucres du M-S175 sont totalement consommés au bout de 72 heures de fermentation.

Une forte concentration en sucres (350 g.L⁻¹) occasionne un stress osmotique des levures puisque l'eau va diffuser à travers la membrane cytoplasmique des cellules pour équilibrer les concentrations intra et extra-cellulaires. Cette perte d'eau peut s'avérer fatale pour certaines levures, ce qui est le cas pour *S. cerevisiae* 522D.

2.2.3. Effet sur la concentration en NH_4Cl

Les fermentations sur les milieux à 45 g.L^{-1} et 90 g.L^{-1} en substrat, nous montrent d'après les figures qui suivent, une première phase de 0 à 18 h, où la production de bioéthanol et de glycérol est faible (respectivement $7,4 \text{ g.L}^{-1}$ et $1,1 \text{ g.L}^{-1}$). La quantité de sucres réducteurs diminue rapidement dans le milieu (Figure 31). Durant la première phase, la levure a bien dégradé 90,4% de glucose, 80,1% de fructose qui peuvent pénétrer facilement à travers la paroi et la membrane cellulaire et 72,5% de Saccharose dans le Milieu M-S45. Pour le milieu M-S90, *S. cerevisiae* a métabolisé durant les 24 premières heures de fermentation environ 60% des sucres ; 68,5% de glucose, 50,8% de fructose et 73,4% de saccharose.

L'évolution de NH_4Cl suit l'évolution des sucres dans les milieux. Dans M-S45 et M-S90, le NH_4Cl diminue rapidement à $79,1 \text{ mg.L}^{-1}$. Pour M-S175, la consommation de NH_4Cl commence après 18 heures de fermentation pour atteindre une concentration de 59 mg.L^{-1} après 42 heures de fermentation (Figure 29).

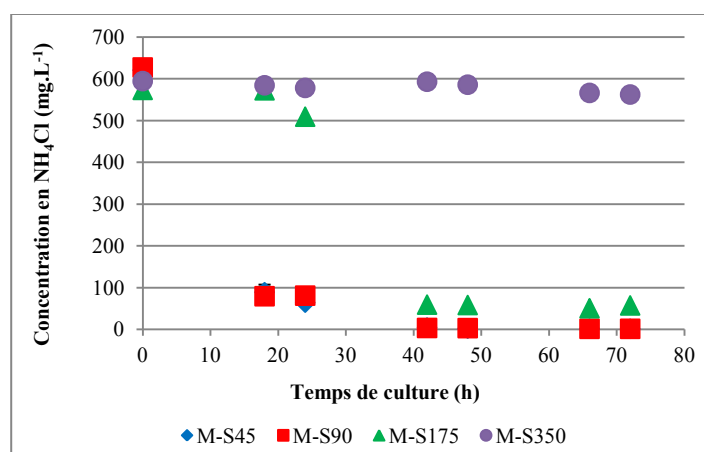


Figure 29. Concentration en NH_4Cl au cours de la fermentation par *S. cerevisiae*.

Généralement, lors de la fermentation alcoolique, les ions ammonium sont totalement consommés au bout des 50 premières heures de la fermentation (Jiranek et *al.*, 1990 ; Beltran et *al.*, 2004).

2.2.4. Effet sur la concentration en éthanol et glycérol

L'étude de l'effet de la concentration en substrat, montre d'après la figure 30, que ce facteur a une influence significative sur la production d'éthanol, les valeurs optimales sont comprises entre 20 g.L^{-1} pour le milieu à 45 g.L^{-1} à 70 g.L^{-1} , pour le milieu à 175 g.L^{-1}

¹. A 350 g.L⁻¹ et en absence de croissance, aucune production de bioéthanol n'a été observée (Figure 30).

Ces résultats sont confirmés par Lin *et al.* (2012), qui ont étudié l'influence de la concentration initiale en Substrat (20, 40, 80, 160, et 300 g.L⁻¹) sur la production d'éthanol en mode « *batch* », par *S. cerevisiae* et qui ont trouvé que la production d'éthanol diminue de 28 g.L⁻¹ pour 160 g.L⁻¹ de glucose à 15 g.L⁻¹ à 300 g.L⁻¹ en glucose.

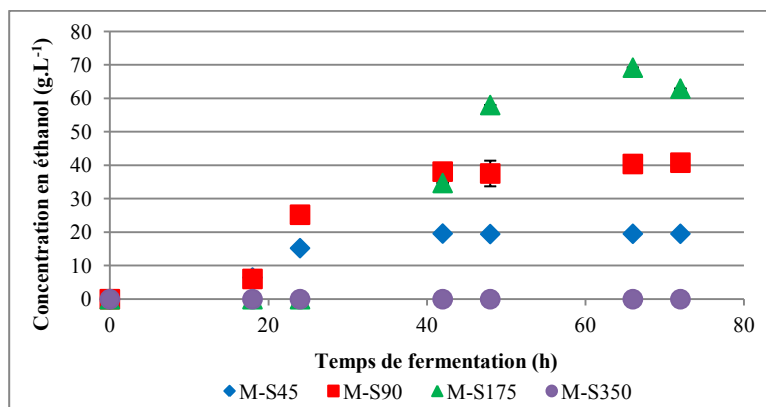


Figure 30. Concentration en éthanol au cours de la fermentation par *S. cerevisiae*.

La concentration en glycérol produit est directement proportionnelle à la reprise ou pas de l'activité métabolique du microorganisme. A mesure que la concentration en substrat dans le milieu augmente, la quantité de glycérol produit augmente, elle passe de 2.2 g.L⁻¹ dans le milieu M-S45 à 5,2 g.L⁻¹ dans le milieu M-S175 (Figure 31). Ces résultats sont validés par les travaux de Petrovska *et al.*, (1999) qui ont étudié la production de glycérol par les levures dans des milieux dont la concentration en glucose varie de 50 g.L⁻¹ à 200 g.L⁻¹ et qui ont trouvé que la production de glycérol par *S. cerevisiae* augmente de 1 g.L⁻¹ dans le milieu le moins concentré à 4,7 g.L⁻¹ dans le milieu le plus concentré en glucose ; ce comportement peut être lié au rôle attribué au glycérol, un soluté compatible, qui agit comme soluté osmoprotecteur permettant à *S. cerevisiae* de survivre au stress osmotique causé par la concentration initiale élevée en sucres. Selon plusieurs auteurs, cet osmoprotecteur s'accumule dans le cytoplasme des cellules afin d'équilibrer la pression osmotique entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire (Wang *et al.*, 2001 ; Taherzadeh *et al.*, 2002 ; Aldiguier *et al.*, 2004 ; Djelal *et al.*, 2005 ; Geertman *et al.*, 2006).

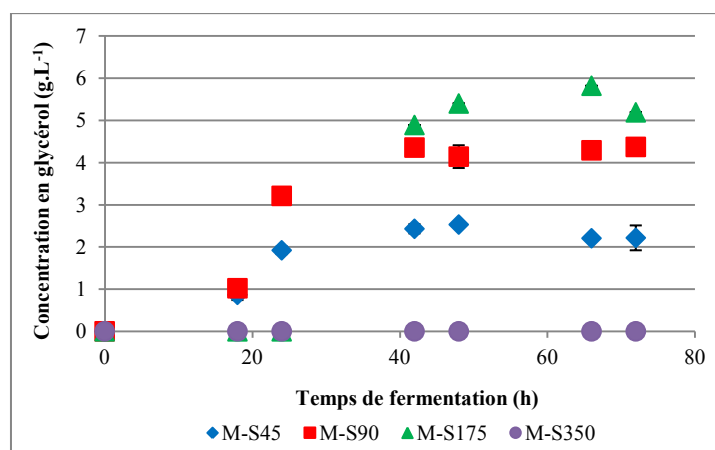


Figure 31. Concentration en glycérol au cours de la fermentation par *S. cerevisiae*.

Le tableau 19, montre un bilan des concentrations, rendements et productivités globales en éthanol, glycérol produit et en sucres résiduels observés à l'arrêt des cultures.

Tableau 18. Bilan des cultures en discontinu de la souche *S. cerevisiae* 522D en présence de différentes concentrations en sucres.

	M-S45	M-S90	M-S175	M-S350
Equi Glu	45 (a)	90 (b)	175 (c)	350 (d)
Equi Glu consommé (%)	98 (a)	97,4 (a)	94,4 (b)	2,8 (c)
Ethanol (g.L⁻¹)	19,9 (a)	40,8 (b)	62,9 (c)	< LD (*)
Glycérol (g.L⁻¹)	2,5 (a)	4,2 (b)	5,2 (c)	< LD (*)
Y_{EtOH} (%)	43 (a)	45 (a)	38 (b)	< LD (*)
Y_{Gly} (%)	5 (a)	4 (b)	3 (c)	< LD (*)
Q_{EtOH} (g.L⁻¹ h⁻¹)	0,3 (a)	0,6 (b)	1,1 (c)	< LD (*)
Q_{Gly} (g.L⁻¹ h⁻¹)	0,03 (a)	0,05 (b)	0,07 (c)	< LD (*)

(*) < LD: Inférieur à la limite de détection.

Les moyennes portant les mêmes lettres dans la même ligne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

Une augmentation de la productivité d'éthanol de 100% est observée en passant de M-S45 à M-S90. Cette augmentation s'accroît à mesure que la concentration en sucres augmente dans le milieu M-S175 ($Q_{EtOH} = 1,1 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Les rendements globaux $Y_{EtOH}(\%)$, diminuent de manière très nette pour M-S175 ($Y_{EtOH}=38\%$), par rapport au M-S45 et M-S90 qui sont respectivement 43% et 45%. Ces résultats sont accords avec ceux de Petrovska et *al*, (1999) qui ont remarqué que le rendement en éthanol diminue de 44,4% dans un milieu à 50 g.L⁻¹ en glucose à 35,3% dans un milieu à 200 g.L⁻¹. La capacité de production semble donc plus faiblement affectée par la concentration initiale en substrat. Dès que la concentration initiale en substrat augmente à 350 g.L⁻¹, les capacités de croissance et de production sont altérées.

Un effet négatif de l'augmentation de la concentration en substrat sur les paramètres globaux de croissance, de production et sur la productivité globale du microorganisme est donc observé et quantifié.

2.2.5. Conclusions

La levure, comme les autres cellules, est capable de détecter un changement de la pression osmotique du milieu extérieur et y répondre par une déformation de la membrane cellulaire ou par un changement de l'hydratation des protéines de la membrane (Hohmann, 2002 ; Fullerton et *al.*, 2006 ; sun et *al.*, 2007). Le mécanisme de résistance de *S cerevisiae* se traduit par l'accumulation dans la cellule de glycérol. Mais à une concentration élevée en sucres (350 g.L⁻¹), l'environnement hyper-osmotique a causé un dysfonctionnement pouvant aller jusqu'à une inhibition totale de la croissance.

Notre objectif était la production de bioéthanol à partir de sirop extrait des sous-produits de dattes. Toutefois, les fortes teneurs en sucres induisent une forte pression osmotique qui limite la capacité fermentaire de la levure utilisée (*Saccharomyces cerevisiae* 522D), ce qui nous a amené à utiliser pour la suite de notre étude des souches osmotolérantes qui sont *Zygosaccharomyces rouxii* et *Candida pelliculosa*.

PARTIE 4. PRODUCTION DE BIOETHANOL PAR FERMENTATION « *VHG* » (VERY HIGH GRAVITY)

Afin d'augmenter la productivité et diminuer les coûts de la production, de nombreuses recherches ont été menées sur la fermentation *VHG* (Das Neves et *al.*, 2006). Ces fermentations sont dites *VHG* car les milieux utilisés contiennent plus de 250 g.L⁻¹ de sucre, ce qui permet d'obtenir en théorie en fin de fermentation 15% (v/v) d'éthanol contrairement aux 10 à 12% généralement obtenus dans la plupart des distilleries à travers le monde (Pulligandla et *al.*, 2011). Les fermentations *VHG* possèdent de nombreux avantages (Bvochora et *al.*, 2000 ; Laopaiboon et *al.*, 2009 ; Pulligundla et *al.*, 2011) car elles permettent de :

- Augmenter les capacités de production sans modification de la structure de production ;
- Augmenter la concentration en éthanol dans le milieu ;
- Diminuer les coûts énergétiques par litre d'éthanol, pour les étapes : fermentation et distillation. En effet, cette dernière est facilitée par des concentrations plus élevées en éthanol.
- Limiter les risques de contamination grâce à des pressions osmotiques élevées et aux fortes concentrations en éthanol.
- 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 qui ne cesse d'augmenter d'une année à une autre (Tableau 20) 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.

Tableau 19. Evolution des prix de production d'éthanol (euros/hectolitre) (OCDEstat, 2013).

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
UE28	55,55 (P)	57,11(F)	63,19 (F)	62,23(F)	64,98 (F)	66,54(F)	68,98 (F)	67,95(F)

(P) Valeur projetée, (F) Valeur provisoir.

1 . Production de bioéthanol par différentes souches de levures

La forte sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* 522D à de forte teneur en sucres dans le milieu de culture à base de sirop des dattes, nous a poussé à chercher des levures plus performantes pour la production de bioéthanol et particulièrement résistantes à des taux élevés en sucres et capables de s'adapter dans un milieu hyperosmotique et de croître rapidement dans ces conditions. Deux souches de levures osmophiles ont été sélectionnées : *Zygosaccharomyces rouxii* et *Candida pelliculosa*. Des fermentations contenant les concentrations élevées en sucres 175 g.L^{-1} (M-S175) et 350 g.L^{-1} (M-S350) et une concentration initiale en NH_4Cl de 10 mmol.L^{-1} , ont été ensemencées avec des levures osmotolérantes (*Z. rouxii* et *C. pelliculosa* et avec la souche témoin *S. cerevisiae*).

1.1. Cinétique fermentaire

1.1.1. Evolution de la biomasse

Le milieu M-S175, permet une évolution normale de la biomasse au cours de la fermentation. Les deux souches *Z. rouxii* et *C. pelliculosa* donnent après 72 h de la culture, une quantité de biomasse presque deux fois plus élevée que *S. cerevisiae*, ce qui nous amène à dire qu'elles résistent mieux aux facteurs stressants (hyperosmolarité), lors de la fermentation.

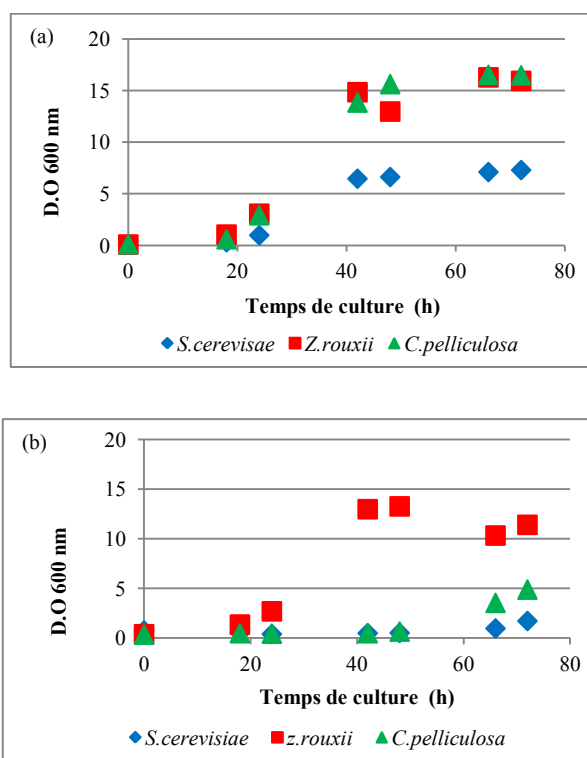


Figure 32. Suivi de la croissance des levures au cours de la fermentation pour M-S175(a) et M-S350(b) ; cultures additionnées de 500 mg.L^{-1} de NH_4Cl .

La comparaison des cinétiques de croissance (Figure 32) montre que le passage d'une concentration de 175 g.L⁻¹ à 350 g.L⁻¹ a perturbé la croissance, non seulement de *S. cerevisiae*, mais également de *C. pelliculosa*. Seule *Z. rouxii* arrive à croître à une teneur en sucres de 350 g.L⁻¹ (Figure 32b).

1.1.2. Évolution des sucres au cours de la fermentation

Le taux de croissance des levures atteint son maximum à la phase exponentielle, durant laquelle les microorganismes sont complètement adaptés au milieu, ils se multiplient le plus rapidement possible (Figure 32), durant laquelle la totalité des sucres sont consommés (Figure 33 et 34).

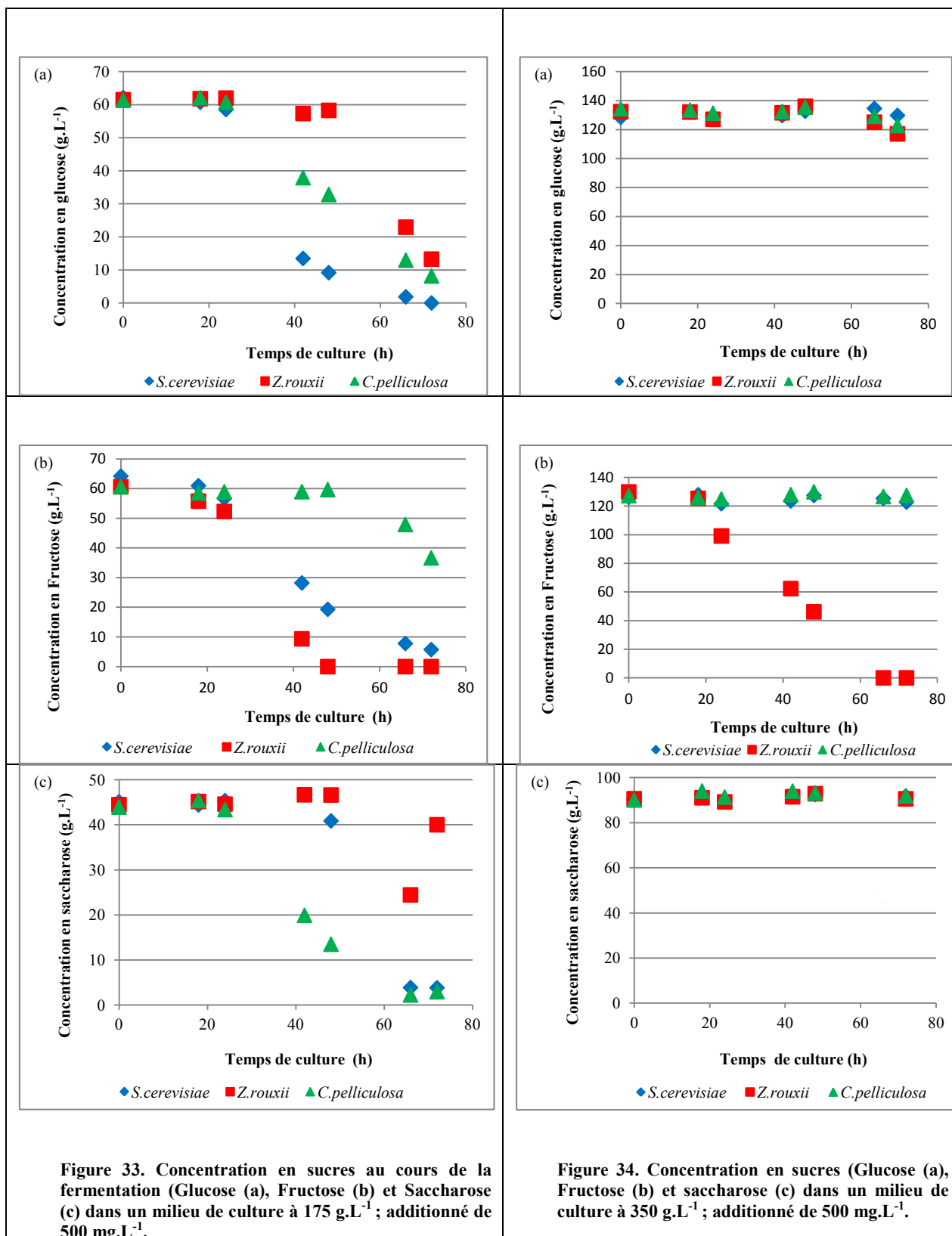
Dans les milieux à base de sirop de dattes, les principaux sucres fermentescibles sont le glucose, le fructose et le saccharose. Ils présentent des quantités équivalentes des deux hexoses (glucose et fructose). *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida pelliculosa* métabolisent le glucose de préférence ; C'est pourquoi, à la fin de la fermentation, l'analyse des sucres dans le milieu M-S175 révèle la prédominance de fructose et de saccharose.

Au niveau moléculaire, les travaux de recherche (Perez et *al.*, 2005 ; Guillaume et *al.*, 2007) ont identifiés les gènes associés au transport des hexoses dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans des conditions de fermentation, plusieurs gènes de la famille HXT participent à la régulation du transport des sucres. On compte 20 gènes dont les principaux transporteurs, Hxt1 et Hxt7. Hxt2, Hxt6 et Hxt7 sont des transporteurs à haute affinité, et Hxt1 et Hxt3 sont des transporteurs à basse affinité. Plusieurs gènes Hxt sont considérés comme des transporteurs à affinité intermédiaire. Les transporteurs à haute comme à basse affinité préfèrent le glucose au fructose, ce qui peut influencer la vitesse à laquelle ces deux sucres seront utilisés. Aussi la concentration des hexoses peuvent avoir un impact sur l'expression des gènes HXT (Guillaume et *al.*, 2007).

Zygosaccharomyces rouxii métabolise de préférence le fructose. Lorsque la plus grande partie de fructose a été consommée, *Z. rouxii* métabolise le glucose. D'après Pina et *al.*, 2004 ; Leandro et *al.*, 2011 ; Leandro et *al.*, 2013 ; Dakal et *al.*, 2014), *Z. rouxii*, présentent deux type de transporteurs : ZrFfz1 et ZrFsy1, à haute affinité au fructose et ZrFfz2 qui a une affinité pour le fructose et le glucose aussi. Sousa-Dias et *al.*, 1996, ont

trouvé qu'une concentration élevée en fructose dans le milieu de culture cause l'inactivation des transporteurs de glucose, ce qui explique la non consommation de glucose durant les premières 48 heures de fermentation (Figure 33 a,b).

Les fortes concentrations initiales en sucres, 175 g.L^{-1} et 350 g.L^{-1} conduisent à une utilisation incomplète du substrat pour la durée de fermentation considérée (72 h). Une inhibition totale est observée au M-S350 pour *S. cerevisiae* et *C. pelliculosa*, contrairement à *Z. rouxii* qui est une levure plus tolérante que les deux autres levures aux fortes concentrations initiales en substrat (Figure 34).



Ces résultats suggèrent que la fermentation alcoolique de milieu à forte teneurs initiales en substrat carboné par les levures est principalement limitée par la faible tolérance à une pression osmotique élevée. De plus, l'éthanol, dont la concentration

augmente, a un effet toxique sur la cellule (Lina-Costa et *al.*, 2012 ; Abe et *al.*, 2009 ; Hou et *al.*, 2009 ; Pratt et *al.*, 2003 ; Ansanary-Galeote et *al.*, 2001) et par conséquent, réduit également la capacité de consommation des sucres.

1.1.3. Évolution du NH_4Cl dans les milieux de culture

En présence de 175 g.L^{-1} de sucres, la quantité de NH_4Cl diminue rapidement dans le milieu, de 500 mg.L^{-1} à 55 mg.L^{-1} , après 42 heures de fermentation (Figure 35a). Par contre, sur le milieu à 350 g.L^{-1} , la consommation de NH_4Cl par *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida Pelliculosa* est presque nulle (Figure 35b).

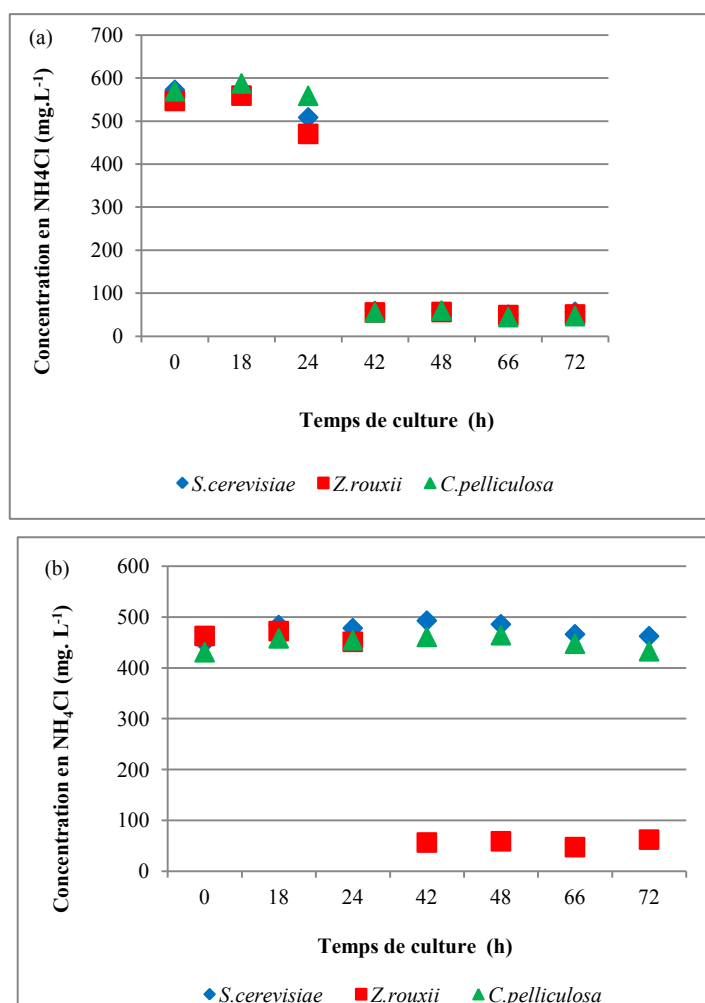


Figure 35. Concentration en NH_4Cl dans les milieux à 175 (a) et à 350 g.L^{-1} en sucres (b) ; additionnés de 500 mg.L^{-1} de NH_4Cl .

1.1.4. Produits de la fermentation alcoolique des sirops de dattes concentrés

Une forte concentration en sucres occasionne un stress osmotique des levures puisque l'eau va diffuser au travers de la membrane cytoplasmique des cellules pour équilibrer les concentrations intra et extra cellulaires. Cette perte d'eau peut s'avérer fatale pour les levures sensibles, ce qui est le cas pour *C. pelliculosa* mais surtout pour *S. cerevisiae*. L'osmoadaptation des levures, cultivées sur les deux milieux, caractérisés par une faible activité en eau, se fait par la production d'un soluté compatible qui sera accumulé en partie dans le cytoplasme. Dans notre cas le principal soluté compatible produit est le glycérol. Une partie du glycérol sera retenue par la levure pour contrebalancer la pression osmotique de part et d'autre de la paroi cytoplasmique (Figure 36) mais une partie variable, selon le microorganisme et la composition du milieu de culture, diffusera et s'accumulera dans le milieu extracellulaire ; plus la cellule est osmotolérante et plus elle retiendra du glycérol (Taherzadeh *et al.*, 2002 ; Djelal *et al.*, 2005 ; Djelal *et al.*, 2012b).

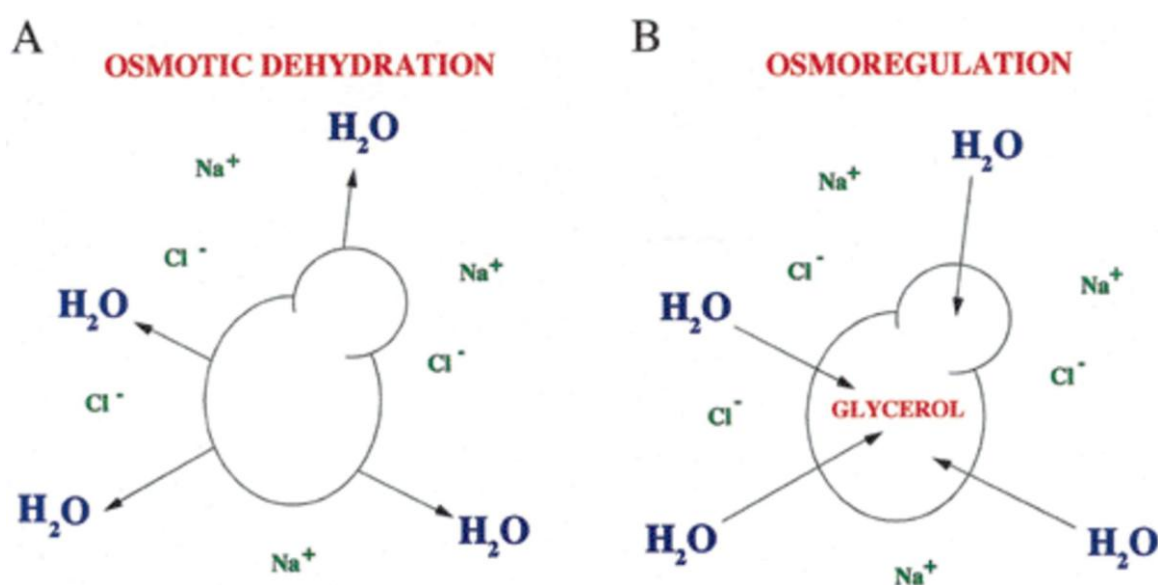


Figure 36. Réponse de la levure à un milieu hyperosmotique. A : La première réponse de la cellule. B. L'osmoadaptation de la cellule (Blomberg, 2000)

La quantité de glycérol produite, par *Z. rouxii* augmente de 54% en passant du M-S175 au M-S350 (Figure 37b). L'augmentation de la quantité de glycérol produite est liée au rôle osmoprotecteur de la levure en condition stressante en accord avec plusieurs auteurs (Taherzadeh *et al.*, 2002 ; Djelal *et al.*, 2005 et Geerman *et al.*, 2006).

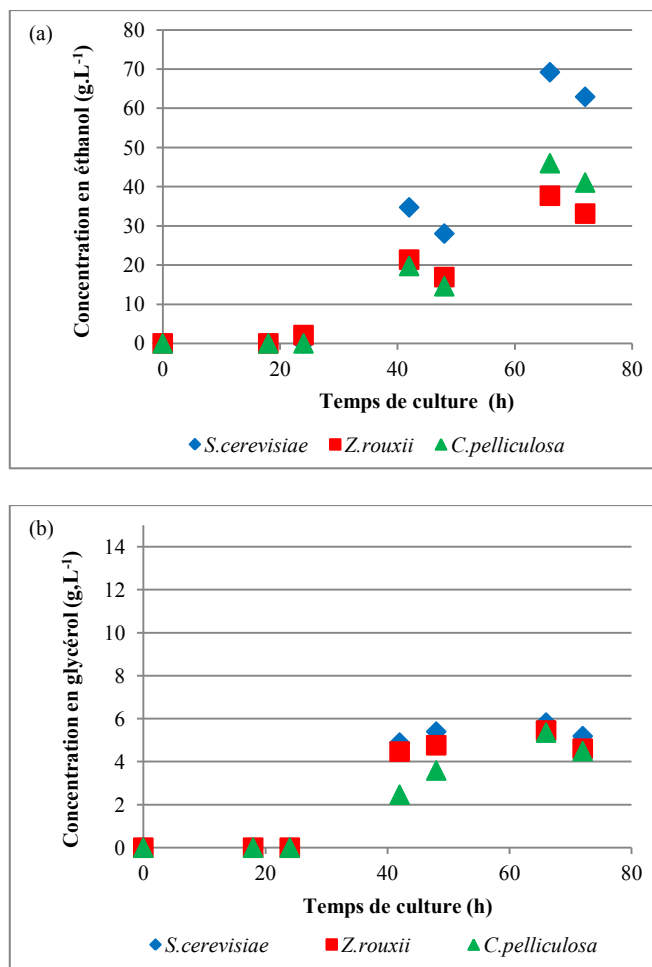


Figure 37. Evolution de la concentration en éthanol (a) et glycérol (b) durant la fermentation sur milieux à 175 g.L⁻¹ en sucres ; additionnés de 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

Les performances fermentaires des levures fermentant les milieux à 17,5°Brix et 35,8°Brix, sont très dépendantes de la concentration en sucres du milieu de culture. L'augmentation du degré brix inhibe la croissance et la production d'éthanol par *S. cerevisiae* et *C. pelliculosa* (Figure 38a); à 35,8°Brix seule la souche *Z. rouxii* peut produire de l'éthanol.

Avec *Z. rouxii* les performances fermentaires maximales sont observées aussi lorsque $S_0 = 35,8^\circ\text{Brix}$, l'éthanol est alors produit avec un rendement de 38,1% et une efficacité de conversion des sucres consommés en éthanol d'environ 74,7% (Tableau 21).

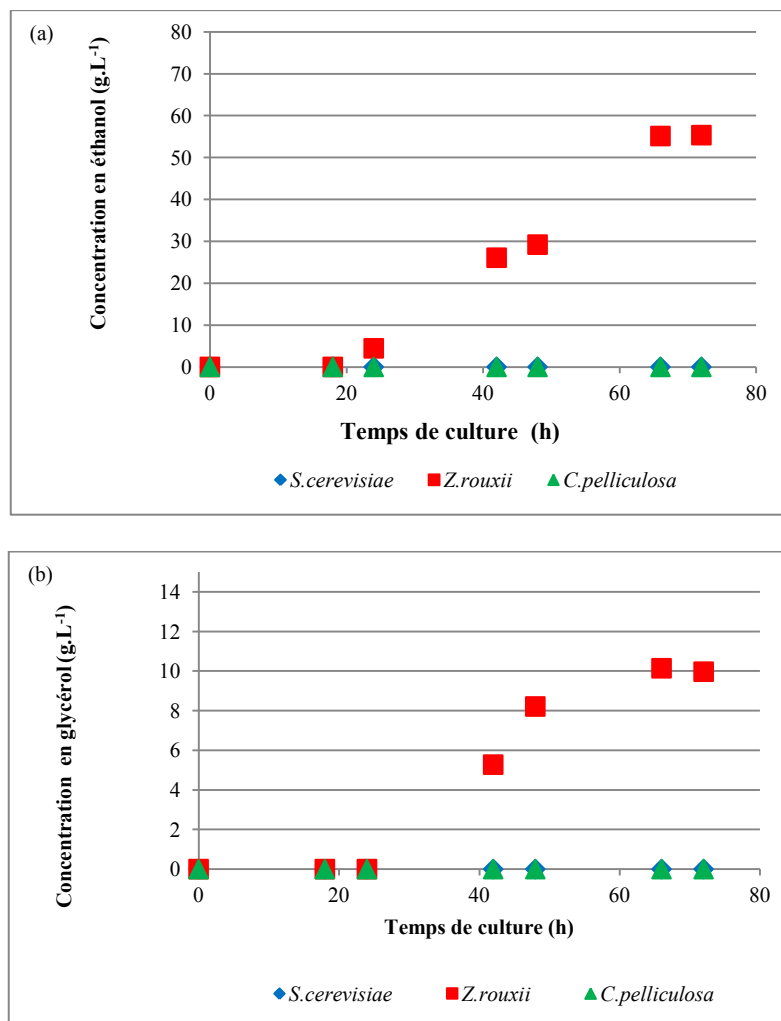


Figure 38. Evolution de la concentration en éthanol (a) et glycérol (b) durant la fermentation sur milieux à 350 g.L⁻¹ ; additionnés de 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

Ces résultats suggèrent que la fermentation alcoolique d'un milieu à forte teneur initiale en substrat par les deux levures *S. cerevisiae* et *C. pelliculosa* est principalement limitée par leur faible tolérance à la pression osmotique du milieu de culture, contrairement à *Z. rouxii* qui possède un remarquable potentiel de croissance et d'adaptation dans les mêmes conditions de culture. La performance fermentaire est donc, très dépendante de la souche de levure utilisée et de la concentration en sucres. Le tableau 21 regroupe les différentes concentrations obtenues pour les produits de la fermentation.

L'apparition d'un stress osmotique dans le milieu de culture se traduit au niveau du métabolisme des cellules par des modifications des flux de carbone et d'énergie. Ainsi, une partie du carbone (sucres) est détournée vers la production de glycérol, qui est accumulé dans la cellule pour assurer son adaptation à son environnement et qui permet aux levures de préserver son métabolisme fermentaire en produisant de l'éthanol (Figure 38).

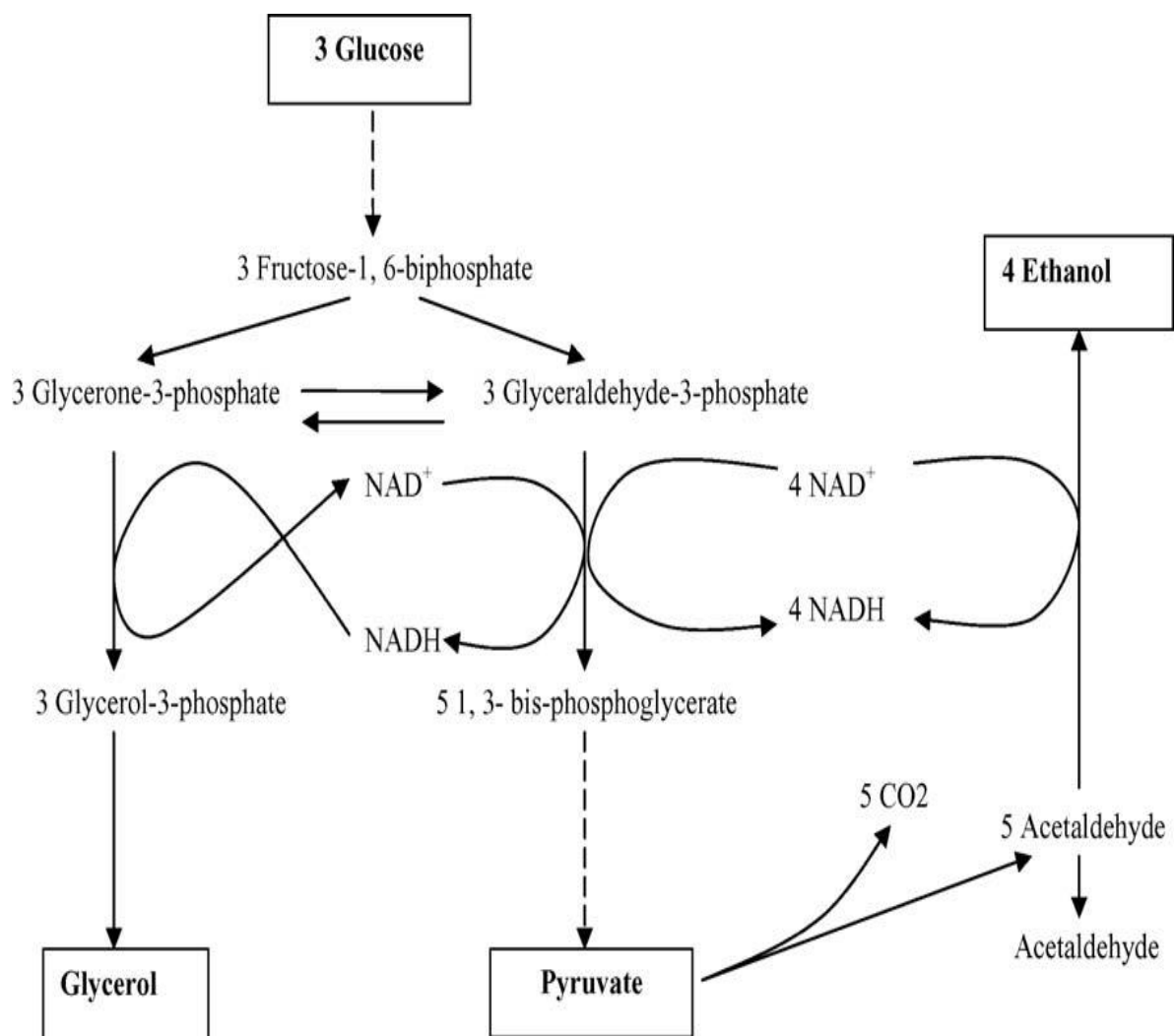


Figure 39. Voies de synthèse de glycérol et de l'éthanol (Djelal et *al.*, 2005).

Tableau 20. Fermentation alcoolique du milieu à base de dattes par les levures (après 72 h de culture) sur M-S175 et M-S350 additionnés de 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

	Equi Glu (g.L ⁻¹)	Equi Glu consommé (%)	EtOH (g.L ⁻¹)	Gly (g.L ⁻¹)	Y _{EtOH} (%)	Y _{Gly} (%)	TC EtOH (%)**
<i>S. cerevisiae</i>	174±0,2	94,0±0,2	63,0±0,1	10,0±0,1	38,3±0,5	3,0±0,1	75,3±1,1
	349,0±0,8	4,0±0,1	< LD ^(*)	< LD ^(*)	< LD ^(*)	< LD ^(*)	< LD ^(*)
<i>Z.rouxii</i>	169,0±1,7	67,0±2	33±2	4,6±0,1	29±0,1	4±0,1	57,2 ± 0,06
	357,0±1	41,0±0,6	55±1,0	10,0±0,1	38±0,1	7±0,1	74,7 ± 2,5
<i>C.pelliculosa</i>	168,0±0,1	71,0±0,1	41±0,3	4,6±0,1	34±0,2	4±0,1	66,9 ± 0,5
	356,0±0,2	3,0±0,4	< LD ^(*)	< LD ^(*)	< LD ^(*)	< LD ^(*)	< LD ^(*)

^(*)< LD : inférieur à la limite de détection.

^(**) TC_{EtOH} : EtOH expérimental / EtOH théorique x 100

Les rendements éthanol sur substrats consommés (Y_{EtOH}) pour les trois souches, sur une même durée de culture (72 h), sont de 38, 29 et 34%, respectivement pour *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* et *C. pelliculosa* sur milieu à 175 g.L⁻¹ de sucre. Le rendement est nul pour *S. cerevisiae* et *C. pelliculosa* sur milieu à 350 g.L⁻¹ de sucre et il est de 38% pour *Z. rouxii* (Tableau 21).

L'apparition d'un stress osmotique dans le milieu de culture se traduit au niveau du métabolisme des levures par des modifications des flux de carbone et d'énergie. Une partie du carbone est détournée vers la production de glycérol (Figure 39). Ainsi la composition de la membrane pourrait engendrer une modification de la perméabilité de celle-ci au glycérol, qui est en partie accumulé dans la cellule en tant que principal soluté compatible (Hohmann, 2002).

Différents substrats sont utilisés pour produire de l'éthanol (tableau 21). Parmi ceux-ci, on trouve la canne à sucre, la betterave à sucre, le sorgho doux, les amylacés les plus courants sont le maïs et le blé. Les rendements d'éthanol varient considérablement d'un substrat à un autre dans une fourchette comprise entre 29 g.L⁻¹ pour le melasse de soja et 120 g.L⁻¹ pour le sorgho doux. Ces variations tiennent surtout aux différences dans l'efficacité de conversion des différentes matières premières (Hydrolyse, extraction...) et le procédé de fermentation utilisé.

Tableau 21. Production de bioéthanol à partir de différentes matières premières.

Matière première	Concentration initiale en sucres (g.L ⁻¹)	Fermentation (F)	Microorganisme	Temps de culture (h)	Ethanol (g.L ⁻¹)	Productivité (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	Références
Sirop des dattes	175	Batch	<i>S. cerevisiae</i> 522D	72	63	0,87	Chniti et al., 2014
			<i>Z. rouxii</i>		33	0,45	Chniti et al., 2014
			<i>C. pelliculosa</i>		41	0,56	Chniti et al., 2014
	350		<i>Z. rouxii</i>		55	0,76	Chniti et al., 2014
Jus de canne à sucre	200	batch	<i>K. marxianus</i> DMKU 3-1042	42-96	67,9	1,42	Limtong et al., 2007
	166	batch	<i>P. kudriavzevii</i>	24	71,9	4	Dhaliwal et al., 2011
	173	Repeated batch	<i>S. cerevisiae</i>	32	89,73	2,48	Liang et al., 2008
	220	batch	<i>K. marxianus</i> DMKU 3,1042 and <i>S. cerevisiae</i> M30	72	77,3-81,3	1,07-1,1	Eiadpum et al., 2012
	180	F continue	Souches de <i>Saccharomyces</i>	117	13,3-19,4	*	Wendhausen et al., 2001
	200	F. continue	<i>S. cerevisiae</i> IR-2	72	90	1,8	Paiva et al., 1996
Jus de sorgho	190	Fed-batch	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5048	108	116,62-120,28	1,08-1,11	Laopaiboon et al., 2007
	240-320	batch	<i>S. cerevisiae</i> NP 01	40-72	120,68	2,01	Loapaiboon et al., 2009
Mélasse de soja	200	batch	<i>Zymomonas mobilis</i> NRRL 806		29,3	*	Letti et al., 2012

1.1.5. Conclusions

La levure, comme les autres cellules, est capable de détecter un changement de la pression osmotique du milieu extérieur. En général, elles répondent plus rapidement à un environnement hypo-osmotique qu'à un milieu hyper-osmotique, puisque le risque d'éclatement est plus sévère. Le mécanisme de résistance des levures se traduit par l'accumulation dans la cellule de polyols, solutés compatibles. C'est le cas de *Zygosaccharomyce rouxii*, souche xérotolérante, qui accumule du glycérol. Cette souche a été très remarquable grâce à sa résistance au stress osmotique ; cette souche est restée viable en raison de sa tolérance à des concentrations en sucres allant jusqu'à 350 g.L⁻¹ ; concentration totalement inhibitrice pour *S. cerevisiae* et *C. pelliculosa*.

2 . Effet de la fermentation « VHG » sur la production d'éthanol par

Z. rouxii

L'objectif des expériences présentées dans la partie suivante est de quantifier et de caractériser l'adaptation de *Zygosaccharomyces rouxii* à une fermentation « VHG ». La 4^{ème} série d'expériences a été réalisée en mode « Batch » durant 72 heures, à 500 mg.L⁻¹ en NH₄Cl, des concentrations élevées en sucres (175, 250, 350 et 500 g.L⁻¹).

Les cinétiques de réponse de la levure, doivent permettre de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le maintien de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration élevée en substrat. L'impact de la fermentation « VHG », est analysé sur le comportement macro-cinétique (croissance cellulaire, capacité et performances, rendement, production, ...) afin de contribuer à l'identification et la caractérisation de la réponse de *Z. rouxii* à une fermentation « VHG » pour optimiser son activité et identifier les meilleures performances de production de bioéthanol.

2.1 . Cinétique fermentaire

2.1.1 . Evolution de la biomasse

La figure 40, présente l'évolution de la biomasse au cours de la fermentation (72 heures). La durée de la phase de latence est influencée par la concentration initiale en sucres.

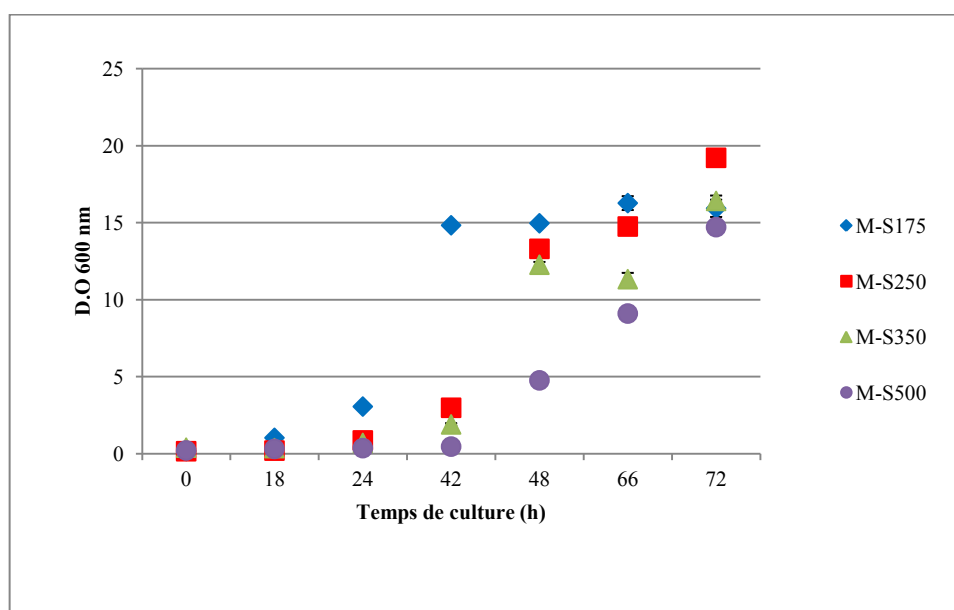


Figure 40. Cinétique de croissance de *Z. rouxii*, sur des milieux à différentes concentrations initiales en sucres (175, 250, 350 et 500 g.L⁻¹) ; additionnés de 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

2.1.2 . Evolution de la consommation des sucres

La figure 41 montre que la consommation du fructose est totale après 48 heures de culture pour la fermentation de M-S175 après 66 heures pour les fermentations M-S250, M-S350 et M-S500. *Zygosaccharomyces* a donc été capable de consommer la totalité de fructose quelque soit la concentration initiale en sucres ; par contre elle ne consomme pas les autres sucres (glucose et saccharose) de la même façon, c'est une souche fructophile (Leandro et *al.*, 2011 et Leandro et *al.*, 2013). En observant les temps de consommation, nous avons constaté que *Z. rouxii* consomme systématiquement le glucose après l'épuisement en fructose, traduisant ainsi la préférence de cette levure pour le fructose, plutôt que le glucose.

Le transport des sucres est une étape essentielle dans le métabolisme des sucres ; il détermine le taux de consommation des sucres par la levure. *Zygosaccharomyces rouxii* a plusieurs gènes codant les transporteurs d'hexoses (Figure 43), 3 d'entre eux (*ZrFsy1*, *ZrFfz1p* et *Zrfz2p*) jouent un rôle significatif dans la fermentation alcoolique (Sousa-Dias et *al.*, 1996 ; Pina et *al.*, 2004 ; Leandro et *al.*, 2011 ; Dakal et *al.*, 2014).

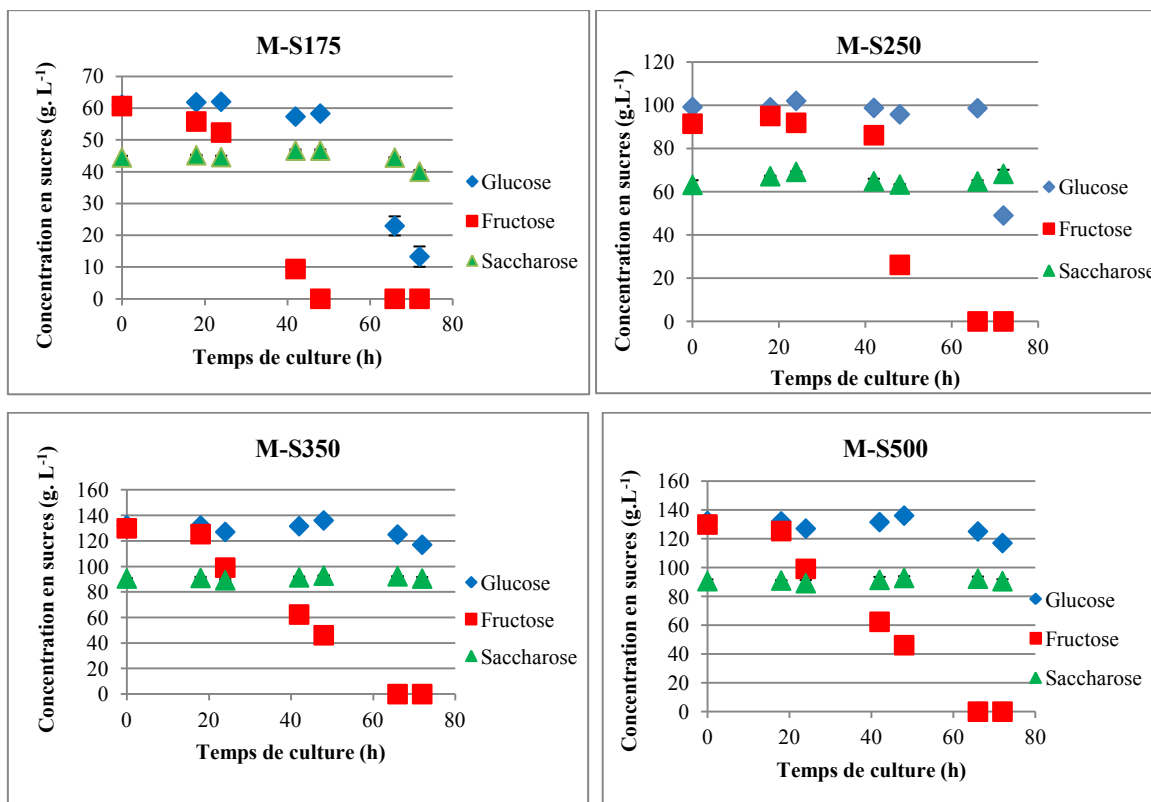


Figure 41. Cinétique de consommation des sucres durant la culture de *Z. rouxii* sur milieux à 175 g.L⁻¹ (M-S175), 250 g.L⁻¹ (M-S250), 350 g.L⁻¹ (M-S350) et 500 g.L⁻¹ ; additionnés de 10 mmol.L⁻¹ de NH₄Cl.

Le fructose est préférentiellement et totalement utilisé par *Z. rouxii*. Des études menées sur la fructophilie des souches *Zygosaccharomyces* par Sousa-Dias et al. (1996), Pina et al. (2004), Leandro et al. (2011) et Loureiro-Dias et al. (2013), ont révélé que le processus d'utilisation des sucres dépend de la nature des transporteurs d'hexoses présents dans la paroi de la levure. Ils ont déterminé plusieurs transporteurs de sucres particuliers, nommé Ffz (*Fructose Facilitator of Zygosaccharomyces*) ; ZrFfz1 spécifiques au fructose et ZrFfz2 transporte le glucose et le fructose (Affinité similaire). Sousa-Dias et al. (1996), ont montré que le transport de glucose de milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire dépend de la concentration en fructose dans le milieu extracellulaire et qu'à certaines concentration, ZrFfz2 sont bloqués, ne laissant passer que le fructose (Figure 43).

Récemment Leandro et al. (2013) ont caractérisé un nouveau transporteur de fructose ZrFsy1 (*High Affinity Fructose/H⁺ Symporter*) qui ne transporte pas le glucose, et qui est en activité lorsque la concentration en fructose dans le milieu extracellulaire est inférieure à 0,2%.

2.1.3 . Evolution de la concentration en substrat d'azote

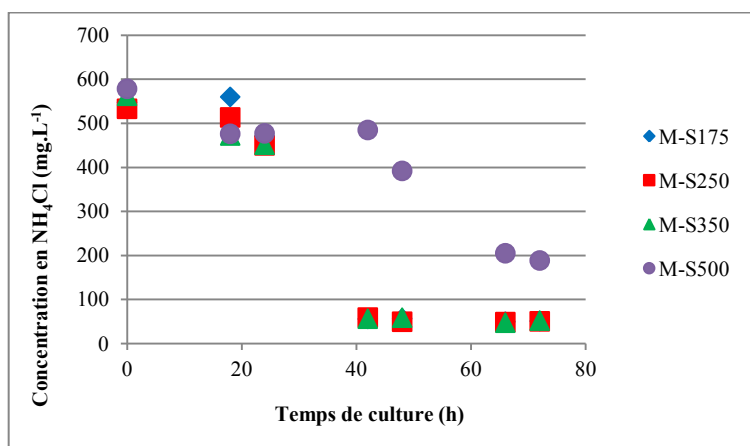


Figure 42. Cinétique de consommation de NH_4Cl durant la culture de *Z. rouxii* sur milieux à 175 g.L^{-1} (M-S175), 250 g.L^{-1} (M-S250), 350 g.L^{-1} (M-S350) et 500 g.L^{-1} ; additionnés de 10 mmol.L^{-1} de NH_4Cl .

La concentration en azote assimilé est variable suivant la concentration en sucres des milieux de fermentation. Pour les milieux M-S175, M-S250 et M-S350, l'azote ammoniacal passe de 550 à 50 mg.L^{-1} après 40 heures de fermentation ; alors que pour le milieu M-S500, l'azote ammoniacal passe à $204,7 \text{ mg.L}^{-1}$ après 68 heures de fermentation (Figure 42).

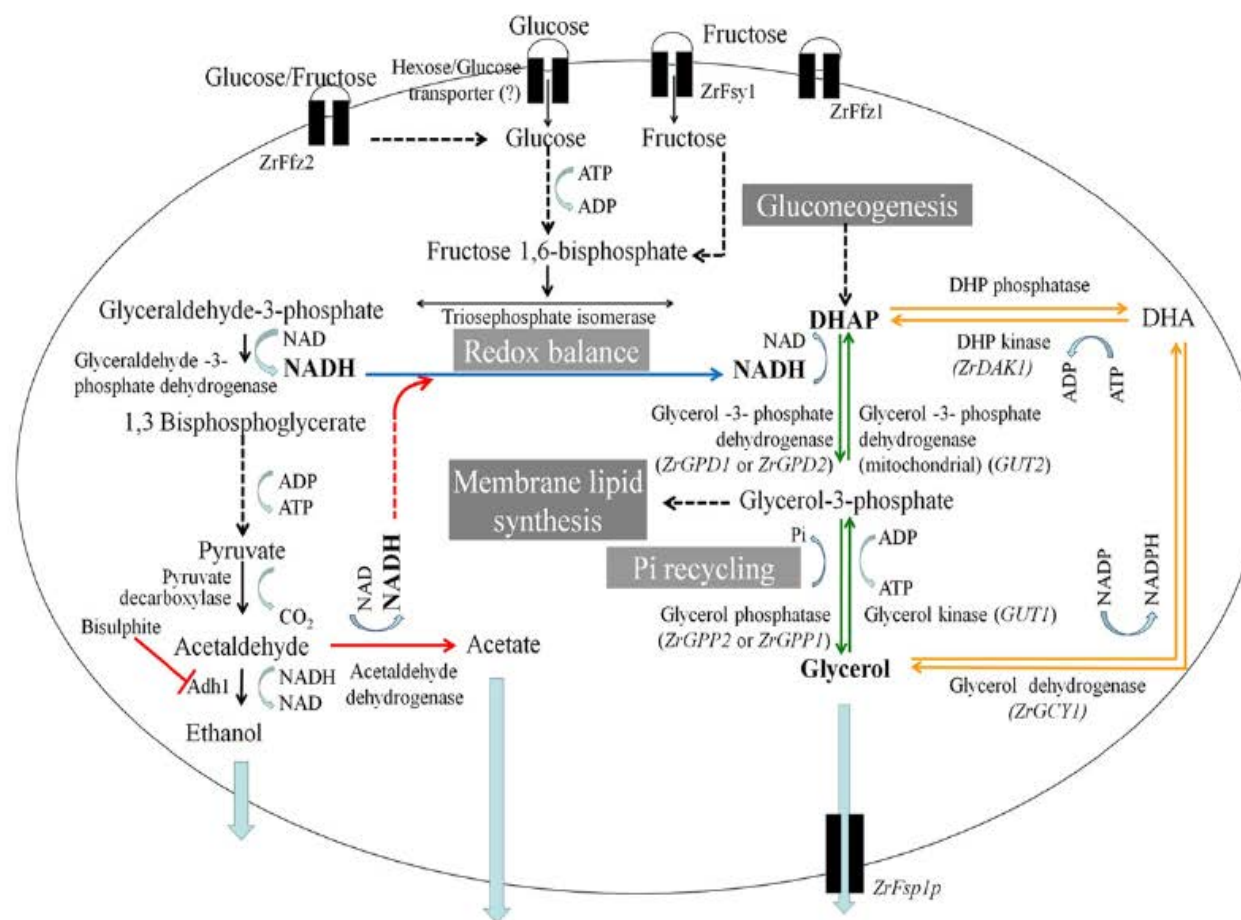
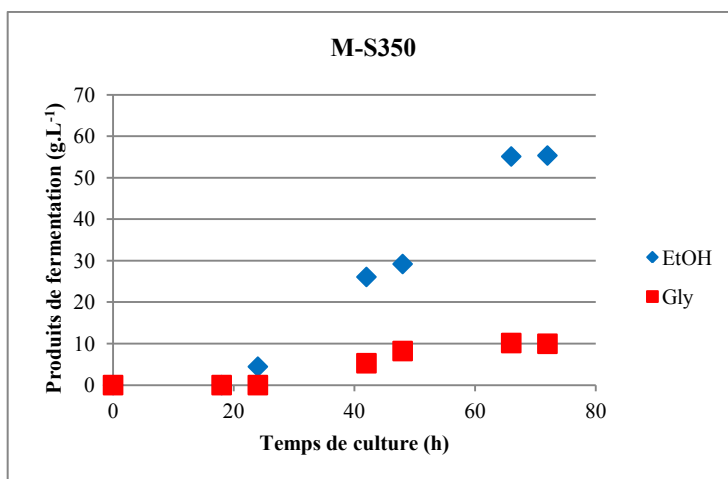
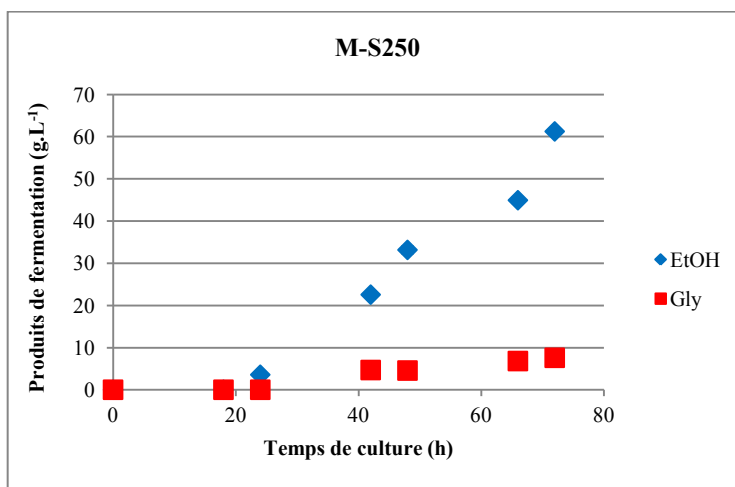
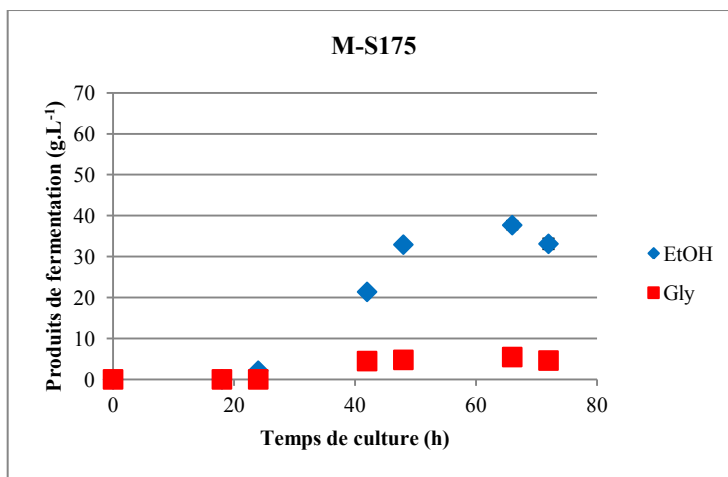


Figure 43. Transport des hexoses lors de la fermentation alcoolique par *Zygosaccharomyces rouxii* (Production d'éthanol et de glycérol) (Dakal et al., 2014).

2.1.4 . Produits de fermentation

Les figures 44, 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 37,6 g.L⁻¹ pour le milieu M-S175 à 61,2 g.L⁻¹ pour M-S500.



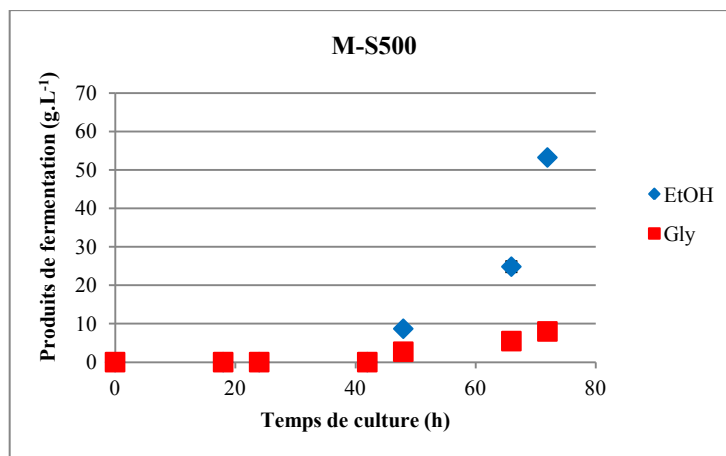


Figure 44. Cinétique de production de bioéthanol et de glycérol durant la culture de *Z. rouxii* sur milieux à 175 g.L⁻¹ (M-S175), 250 g.L⁻¹ (M-S250), 350 g.L⁻¹ (M-S350) et 500 g.L⁻¹ ; additionnés de 10 mmol.L⁻¹ de NH₄Cl.

La quantité de glycérol produite augmente avec la quantité de sucre dans le milieu, en accord avec le rôle d'osmoprotecteur du glycérol (Wang et *al.*, 2001; Taherzadeh et *al.*, 2002, Aldiguier et *al.*, 2004 ; Geertman et *al.* ; 2006).

Pour le milieu M-S350 la figure 44 montre bien que la concentration en glycérol dans le milieu de culture est inférieure à celles relevées pour les autres milieux, en réponse au stress osmotique (8 g.L⁻¹) ;

En absence de pression osmotique élevée, Le rôle du glycérol produit est de maintenir l'équilibre rédox et l'excès sera rejeté dans le milieu extracellulaire par transport facilité à travers un canal protéique Fps1. La majeure partie de la diffusion du glycérol se fait à travers le Fps1, qui est une aquaglycéroporine, membrane de la famille des canaux protéiques MIP (Major Intrinsic Protein), codée par le gène *Fps1*.

Fps1 permet aux levures d'ajuster rapidement la perméabilité de la membrane pour le glycérol et aussi de régler le flux de glycérol sortant de la cellule (Luyten et *al.*, 1995 ; Tamas-Luyten et *al.*, 1999). Cette protéine joue un rôle majeur dans l'adaptation des cellules aux chocs hypo-osmotiques, en permettant la sortie du glycérol. Elle est aussi impliquée dans la réponse au stress hyperosmotique ; ainsi, dans ce cas, une diminution du flux de glycérol à travers la membrane est observée pour M-S500 ou la quantité de glycérol trouvée dans le milieu extracellulaire est 8 g.L⁻¹, inférieure à celle trouvée dans le milieu M-S350 (10 g.L⁻¹) est peut être due à la fermeture des canaux Fsp1 (Petelenz-Kurdzziel et *al.*, 2013) pour maintenir le glycérol qui continue à sortir en faible quantité soit par diffusion passive grâce à ses propriétés liposolubles et/ou par un phénomène de transport actif (Oliveira et *al.*, 2003).

2.1.5 . Cinétique fermentaire

Le bilan des concentrations, rendements, et productivités volumiques en éthanol et glycérol obtenus à l'arrêt des cultures (72 h) est donnée au tableau 23. Le rendement en éthanol des milieux utilisés est compris entre 29 et 45%. L'analyse statistique (Test Duncan) des résultats montre que les valeurs moyennes des rendements en éthanol sont significativement différentes d'un milieu à un autre ($p < 0,05$), à l'exception de M-S250 et M-S500 qui sont statistiquement identiques avec un rendement en éthanol de 45%.

Le rendement en glycérol produit à la fin de la fermentation varie significativement avec la concentration initiale en sucres ; il augmente de 0,04% pour M-S175 à 0,07% pour M-S350. Les rendements en glycérol de M-S350 et M-S500 sont statistiquement identiques (0,07%).

Tableau 22. Paramètres cinétiques des fermentations alcooliques par *Z. rouxii* sur milieux à 175 g.L⁻¹ (M-S175), 250 g.L⁻¹ (M-S250), 350 g.L⁻¹ (M-S350) et 500 g.L⁻¹ ; additionnés de 10 mmol.L⁻¹ de NH₄Cl.

	M-S175	M-S250	M-S350	M-S500
3				
Equi Glu (g.L⁻¹)	168,7	256,9	360,7	488,4
Equi Glu consommés (%)	67,1	53	41,4	24
[EtOH] g.L⁻¹	33,7± 1,33 ^(a)	61,2± 0,3 ^(b)	55,3± 0,6 ^(c)	53,2± 0,5 ^(c)
[Glycérol] g.L⁻¹	4,6± 0,01 ^(a)	7,6± 0,05 ^(b)	10± 0,06 ^(c)	8± 0,01 ^(d)
Y_{EtOH} g.g⁻¹	0,29± 0,01 ^(a)	0,45± 0,02 ^(b)	0,37± 0,01 ^(c)	0,45± 0,01 ^(b)
Y_{Gly} g.g⁻¹	0,04± 0 ^(a)	0,05± 0 ^(b)	0,07± 0 ^(c)	0,07± 0 ^(c)
Q_{EtOH} g.L⁻¹.h⁻¹	0,46± 0,02 ^(a)	0,85± 0 ^(b)	0,76± 0,01 ^(c)	0,74± 0 ^(c)
Q_{gly} g.L⁻¹.h⁻¹	0,06± 0,001 ^(a)	0,10± 0,001 ^(b)	0,13± 0,001 ^(c)	0,11± 0,001 ^(d)

Les moyennes portant les mêmes lettres dans la même ligne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

Le tableau montre que la productivité volumique Q_{EtOH} dans M-S250 (0,85 g.L⁻¹.h⁻¹) est supérieure à la productivité en éthanol des autres milieux. Les productivités (Q_{EtOH}) de M-S350 et M-S500 sont statistiquement identiques.

L'osmorégulation à la suite d'un choc osmotique peut se décomposer en 2 ou 3 phases :

- Une phase passive : purement thermodynamique : un efflux d'eau de la cellule. Ce mouvement d'eau est passif et simplement régi par la loi de l'osmose. Cette sortie d'eau entraîne souvent une variation du volume cellulaire. Cette étape est très rapide et dure quelques secondes.
- Une phase active : au cours de cette phase, la cellule tend à restaurer son volume initial. Elle va accumuler un certain nombre restreint de solutés dans le cytoplasme

afin de rétablir une pression de turgescence. Cette accumulation de solutés peut se faire par synthèse (solutés compatible) ou simplement par transport (composés osmoprotecteurs) s'ils sont présents dans le milieu de culture. Cette accumulation de solutés entraîne un flux d'eau vers l'intérieur de la cellule et permet donc de restaurer le volume cellulaire initial. Cette phase active, consommatrice d'énergie a une durée plus longue que la première. A la fin de cette dernière phase, du fait des nouvelles conditions intracellulaire, l'ensemble des réactions métaboliques peuvent reprendre. Une reprise de la croissance des cellules est observée (après 18 heures de fermentation).

- Une phase d'osmorégulation homoéostatique qui correspond au maintien de la pression de turgescence (Dromigny, 2008).

Il faut noter qu'il est souvent difficile de distinguer le moment de transition entre ces trois phases.

4 . Fermentation « VHG » par *Z. rouxii* : effet du temps de fermentation et de la concentration initiale en NH_4Cl

Comme cela est développé dans la première partie de ce chapitre, la difficulté majeure de la fermentation « VHG » est la sensibilité de la levure à la pression osmotique du milieu de culture. *Z. rouxii* semble être la seule levure qui arrive à produire de l'éthanol dans un milieu à 500 g.L⁻¹ de sucres. D'après la littérature il paraît que c'est la première fois qu'on arrive à produire de l'éthanol à partir d'un substrat à une telle concentration ; Eiadpum et *al.* (2012) ont produit 81 g.L⁻¹ d'éthanol à partir de jus de canne à sucre à 220 g.L⁻¹ de sucres en utilisant *Saccharomyces cerevisiae* M30 et *Klyveromyces marxianus*. Le Jus de sorgho (240-320 g.L⁻¹ en sucres) a été utilisé par Loapaiboon et *al.* (2009), qui ont réussi à produire 120 g.L⁻¹ d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae*. La bactérie *Zymomonas mobilis* NRRL806, a été utilisée par Letti et *al.* (2012) pour produire 29,3 g.L⁻¹ à partir de Mélasse de soja à 200 g.L⁻¹ en sucres (Tableau 22).

A partir de 350 g.L⁻¹, le substrat utilisé est nommé « Sirop » (Partie 2.1). L'objectif des expériences présentées dans les deux parties qui suivent est d'optimiser la production d'éthanol à partir de sirop de dattes, en se focalisant sur la durée de fermentation d'une part, et d'autre part, étudier l'effet de la concentration initiale en NH_4Cl .

4.1 . Effet de la durée de culture

La stratégie expérimentale choisie consiste à cultiver *Z. rouxii* dans un milieu à 350 g.L⁻¹ en substrat (M-S350) à base de sirop de dattes et de prolonger le temps de fermentation « VHG » de 72 heures à 230 heures, afin de définir les cinétiques d'osmoadaptation et le temps nécessaire pour obtenir le rendement maximal en éthanol. Le mode de réponse et les dynamiques d'adaptation des cellules durant la fermentation seront quantifiés par une analyse dynamique de culture (rendement, productivité) après 72, 160 et 230 h de fermentation.

4.1.1 . Cinétique de la croissance

Toute cellule en croissance dans un milieu de culture donné se trouve dans un état d'équilibre osmotique et elle tend à maintenir dans son cytoplasme une pression osmotique supérieure à celle du milieu de culture. Cette différence positive entre osmolarité intra- et extracellulaire est appelée pression de turgescence. Une modification de la pression osmotique du milieu extracellulaire modifie donc cet état d'équilibre. On parlera ici de choc osmotique.

Pour une concentration initiale en sucres de 350 g.L⁻¹, la phase de latence est très courte (Figure 45), et Après 72 heures de fermentation, commence la phase stationnaire, durant la quelle *Z. rouxii* ne se multiplie plus et l'activité cellulaire diminue.

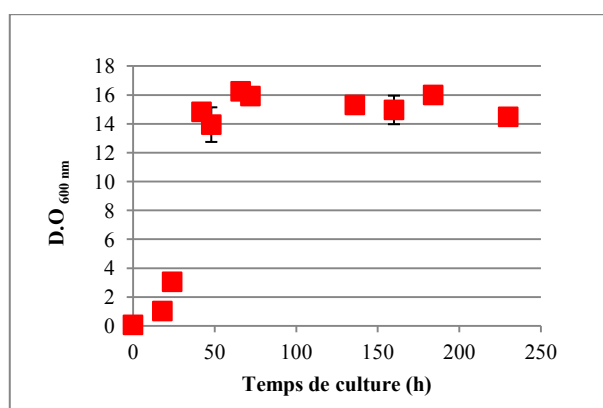


Figure 45. Cinétique de croissance de *Z.rouxii* sur milieux 350 g.L⁻¹ (M-S350); additionnés de 10 mmol.L⁻¹ de NH₄Cl.

4.1.2 . Cinétique de consommation des sucres

Les concentrations en sucres ont été quantifiées durant la culture. La levure a bien dégradé le fructose qui diminue très vite dans le milieu de culture. Après avoir consommé la totalité du fructose, la consommation du glucose débute, qui diminue progressivement dans le milieu de 140 g.L^{-1} au début de la fermentation à $85,5 \text{ g.L}^{-1}$ à 136 heures de fermentation. En revanche, les cellules n'arrivent pas à dégrader le saccharose ; aucune dégradation de ce dernier n'est observée. Un arrêt de la consommation des sucres est observé après 136 h (Figure 46).

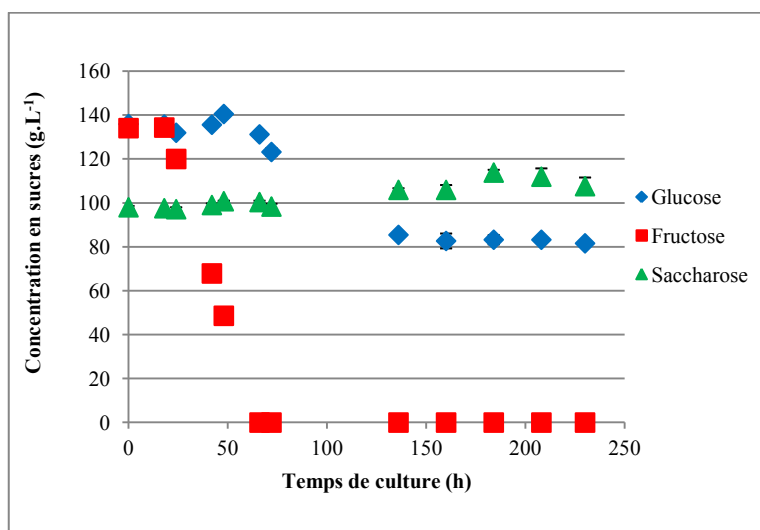


Figure 46. Cinétique de consommation des sucres par *Z. rouxii* sur milieux 350 g.L^{-1} (M-S350); additionnés de 10 mmol.L^{-1} de NH_4Cl .

Pour la concentration en sucres de 350 g.L^{-1} , l'allongement de la durée de culture permet à *Z. rouxii*, qui est une souche fructophile, de consommer presque 60% du glucose présent dans le milieu.

Une partie du fructose consommé par *Z. rouxii* a été utilisée pour la production de soluté compatible (glycérol) qui sera accumulé dans le cytoplasme de la cellule, afin de rétablir une pression de turgescence et qui permet la reprise de la croissance et l'ensemble des réactions métaboliques (dégradation de fructose, glucose pour produire de l'éthanol et de glycérol).

4.1.3 . Cinétique de production de bioéthanol et de glycérol.

La figure 47 présente la production de bioéthanol et le glycérol au cours la fermentation. La production de bioéthanol devient maximale et dépasse 80 g.L^{-1} après 160 heures de fermentation, puis reste stable jusqu'à l'arrêt de culture.

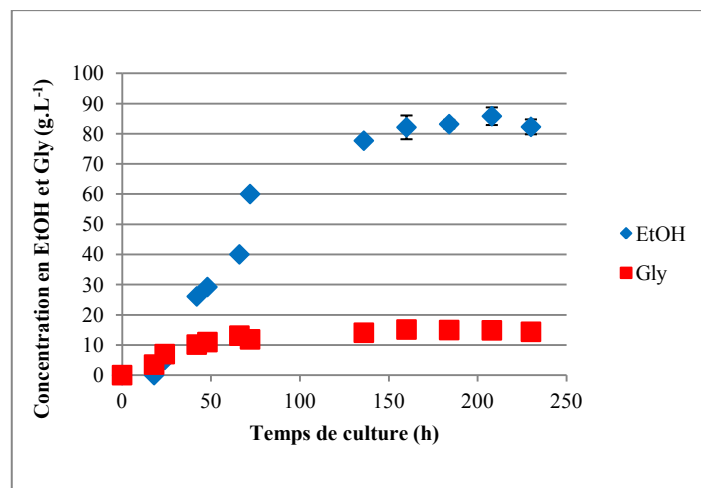


Figure 47. Cinétique de production de bioéthanol et de glycérol sur milieux 350 g.L⁻¹ (M-S350); additionnés de 10 mmol.L⁻¹ de NH₄Cl.

Le profil du glycérol dans le milieu M-S350 est différent de ceux observés pour l'éthanol (Figure 47). La concentration en glycérol augmente pendant les premières heures jusqu'à une concentration de 13 g.L⁻¹ et se stabilise jusqu'à l'arrêt de la culture, alors qu'après 66 heures de fermentation, la concentration en éthanol atteinte est de 40 g.L⁻¹, qui continue à augmenter pour atteindre 82 g.L⁻¹ après 160 h et se stabilise autour de 85 g.L⁻¹ jusqu'à la fin de la culture.

Z. rouxii accumule le glycérol dans le cytoplasme durant le stress osmotique exercé par la concentration élevée en sucres (350 g.L⁻¹). La majeure partie du glycérol diffusée vers le milieu extracellulaire se fait par transport facilité à travers un canal protéique FSP1 qui permet aux levures d'ajuster rapidement la perméabilité de la membrane pour le glycérol et ainsi de régler le flux de glycérol sortant de la cellule (Luyten et al., 1995 ; Tamás et al., 2003). FSP1 est impliquée dans la réponse de *Z. rouxii* au stress hyperosmotique dans le milieu M-S350 ; ainsi, dans ce cas, une diminution du flux de glycérol à travers la membrane est observée. Cette diminution est principalement due à la fermeture des canaux FSP1. (Petelenz-Kurdziel et al., 2013), ce qui explique la stabilité de quantité de glycérol dans le milieu de culture jusqu'à la fin de culture.

4.1.4 . Cinétique de consommation de NH₄Cl

La figure 48, présente l'évolution de la concentration de NH₄Cl dans le milieu de culture au cours de la fermentation. Au cours des premières 18 heures de fermentation, l'activité métabolique lente se traduit par une faible consommation de substrats et de production de métabolites (éthanol et glycérol) et de biomasse. Durant la seconde phase,

l'activité métabolique est plus importante. La biomasse augmente fortement. Les productions d'alcool et de glycérol passent respectivement à 85 g.L⁻¹ et 15 g.L⁻¹. L'ammonium a été pratiquement totalement consommé après 136 heures ; il diminue de 462,5 mg.L⁻¹ à 10 mg.L⁻¹ à la fin de la culture.

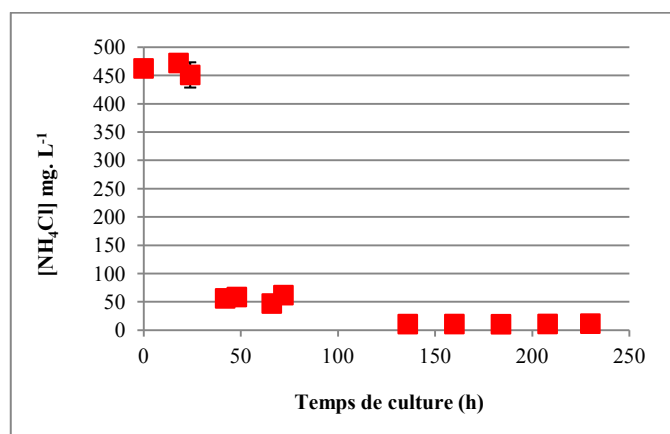


Figure 48. Cinétique de consommation de NH₄Cl sur milieux 350 g.L⁻¹ (M-S350); additionnés de 10 mmol.L⁻¹ de NH₄Cl.

L'azote est un nutriment essentiel au bon déroulement de la fermentation. La carence en azote dans le milieu a un effet inhibiteur sur le métabolisme de *Z. rouxii* et a augmenté le ralentissement et l'arrêt de la fermentation. Le NH₄Cl est un facteur limitant pour *Z. rouxii*.

4.1.5 . Cinétique fermentaire

Le tableau 24 présente un bilan des concentrations, rendements et productivités volumiques en éthanol et glycérol obtenus à 72 h, 160 h et 230 heures de fermentation. L'allongement de la durée de fermentation, permet d'augmenter la production de bioéthanol, de 54 g.L⁻¹ à 72 h à 82,3 g.L⁻¹ en fin de culture, c'est à dire un gain de 52 %. Quant au rendement en éthanol Y_{EtOH} , il augmente de 0,37 g.g⁻¹ après 72 h à 0,47 g.g⁻¹ en fin de culture.

Il convient de noter que le rendement en glycérol reste le même pour les trois temps de fermentation (0,08 g.g⁻¹). La productivité en glycérol à 72 de fermentation est statistiquement différente ($p < 0,05$) de la productivité à 160 h, et cette dernière est statistiquement identique à Q_{Gly} à 230 heures de fermentation.

Tableau 23. Paramètres cinétiques des fermentations alcooliques par *Z. rouxii* sur milieux 350 g.L⁻¹ (M-S350); additionnés de 10 mmol.L⁻¹ de NH₄Cl.

	72 h	160 h	230 h
EtOH (g.L ⁻¹)	55,3 ± 0,64 ^(a)	82,1 ± 3,95 ^(b)	82,3 ± 2,47 ^(b)
Gly (g.L ⁻¹)	11,9 ± 0,14 ^(a)	15,11 ± 2,37 ^(a)	14,4 ± 0,89 ^(a)
Y _{EtOH} (g.g ⁻¹)	0,37 ± 0,02 ^(a)	0,45 ± 0,02 ^(b)	0,47 ± 0,02 ^(b)
Y _{Gly} (g.g ⁻¹)	0,08 ± 0,003 ^(a)	0,08 ± 0,017 ^(a)	0,08 ± 0,01 ^(a)
Q _{EtOH} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,76 ± 0,02 ^(a)	0,51 ± 0,03 ^(b)	0,35 ± 0,02 ^(c)
Q _{Gly} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,16 ± 0,001 ^(a)	0,09 ± 0,001 ^(b)	0,06 ± 0,001 ^(b)

Les moyennes portant les mêmes lettres dans la même ligne ne sont pas significativement différentes (p<0,05).

Les productivités instantanées en éthanol et en glycérol diminuent avec la durée de la culture. A 72 heures, nous avons obtenus les productivités les plus élevées en éthanol (0,76 g.L⁻¹.h⁻¹) et en glycérol (0,16 g.L⁻¹.h⁻¹).

4.2 . Effet de la concentration en NH₄⁺

Il est possible de calculer la quantité d'azote nécessaire dans le milieu pour obtenir une production maximale de microorganismes. On peut calculer la quantité d'azote qui doit être disponible pour obtenir une culture de levure à 1 g.L⁻¹ en poids sec. La composition moyenne de la levure est C : 47%, H : 6,5%, O : 31% et N : 7,5% (Atkinson et *al.*, 1983). La masse moyenne d'une levure est 10⁻⁹g. 1 gramme de levure contient 0,075 g d'azote qui constitue le minimum disponible obligatoire, soit 320 mg de NH₄Cl. Si l'on tient compte des pertes lors de l'intégration de ce composé, il faut au moins multiplier cette valeur par 2. Sachant que ce calcul n'est pas précis mais permet d'avoir une idée de la composition minimale du milieu.

Afin d'évaluer expérimentalement l'impact de la concentration en substrat azoté sur la production d'éthanol pour une fermentation « VHG », des milieux de culture à 250 g.L⁻¹

ont été enrichis par différentes concentration en NH_4Cl (500 mg.L^{-1} le minimum disponible obligatoire (M-N500), 1500 mg.L^{-1} (M-N1500) et 3000 mg.L^{-1} (M-N3000)) et ensemencés par *Z. rouxii*. Dans cette expérience, la fermentation en mode « batch » a été volontairement arrêtée après 72 heures.

Nous nous intéressons à l'évolution de la biomasse, des sucres, de l'éthanol, du glycérol et de NH_4Cl .

4.2.1 . Cinétique de croissance

La figure 49 montre que l'évolution de la biomasse au cours de la fermentation est similaire pour les trois milieux de culture. Les 20 premières heures de culture, correspondent à la phase de latence, pendant laquelle, nous observons une faible croissance cellulaire et une faible consommation des sucres et également une production quasi-nulle d'éthanol et de glycérol, comme cela sera discuté ci-dessous. Même en fin de culture, au bout de 72 h, la phase stationnaire n'est pas atteinte.

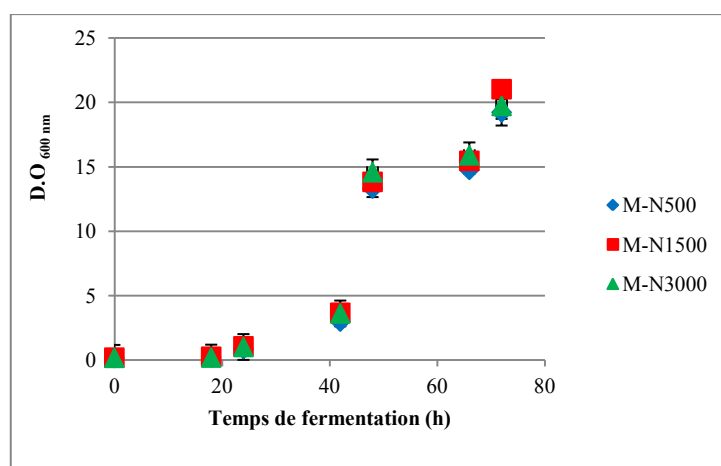


Figure 49. Cinétique de croissance de *Z.rouxii* sur milieux 250 g.L^{-1} ; additionnés de 500 (M-N500), 1500 (M-N1500) et 3000 (M-N3000) mg.L^{-1} de NH_4Cl .

4.2.2 . Cinétiques de consommation des sucres

Comme précédemment, le fructose est préférentiellement assimilé (figure 50); le glucose est assimilé après épuisement de ce dernier. En revanche, L'assimilation du saccharose est négligeable. Ces résultats confirment que *Z. rouxii* est une levure fructophile.

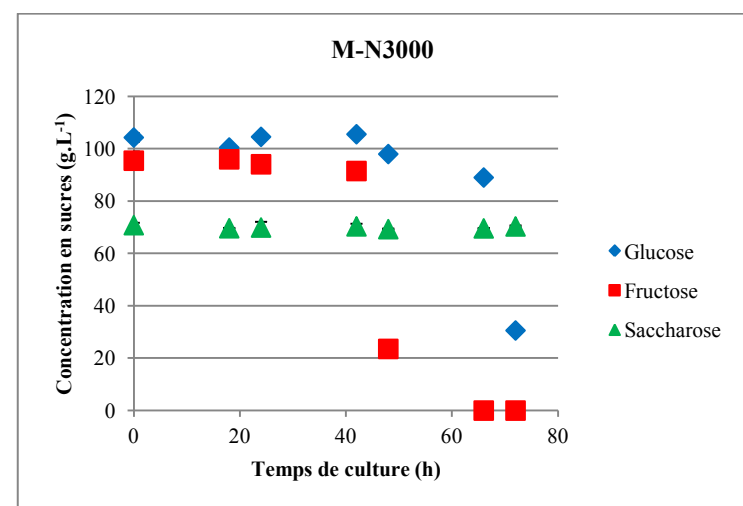
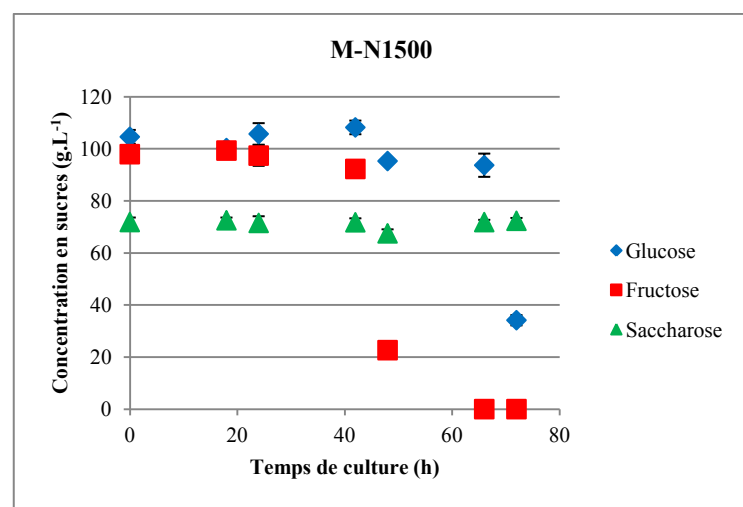
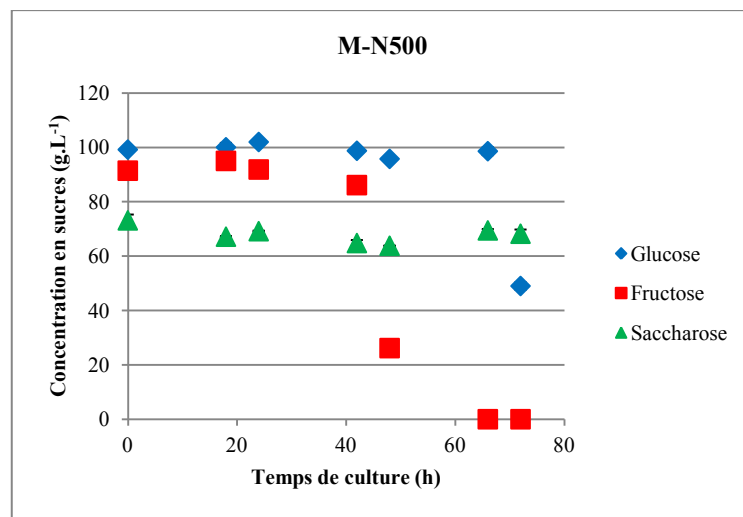


Figure 50. Cinétique de consommation des sucres sur milieux 250 g.L⁻¹; additionnés de 500 (M-N500), 1500 (M-N1500) et 3000 (M-N3000) mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

4.2.3 . Cinétique de production d'éthanol

En lien avec la croissance, les productions d'éthanol et de glycérol ne débutent qu'après la phase de latence. La concentration en éthanol atteint 61 g.L⁻¹ pour M-N500 et est d'environ 72 g.L⁻¹ pour les deux autres milieux (Figure 51). Les concentrations en glycérol sont de 7,6 g.L⁻¹ pour le milieu M-N500 et 8,4 g.L⁻¹ pour les deux autres milieux.

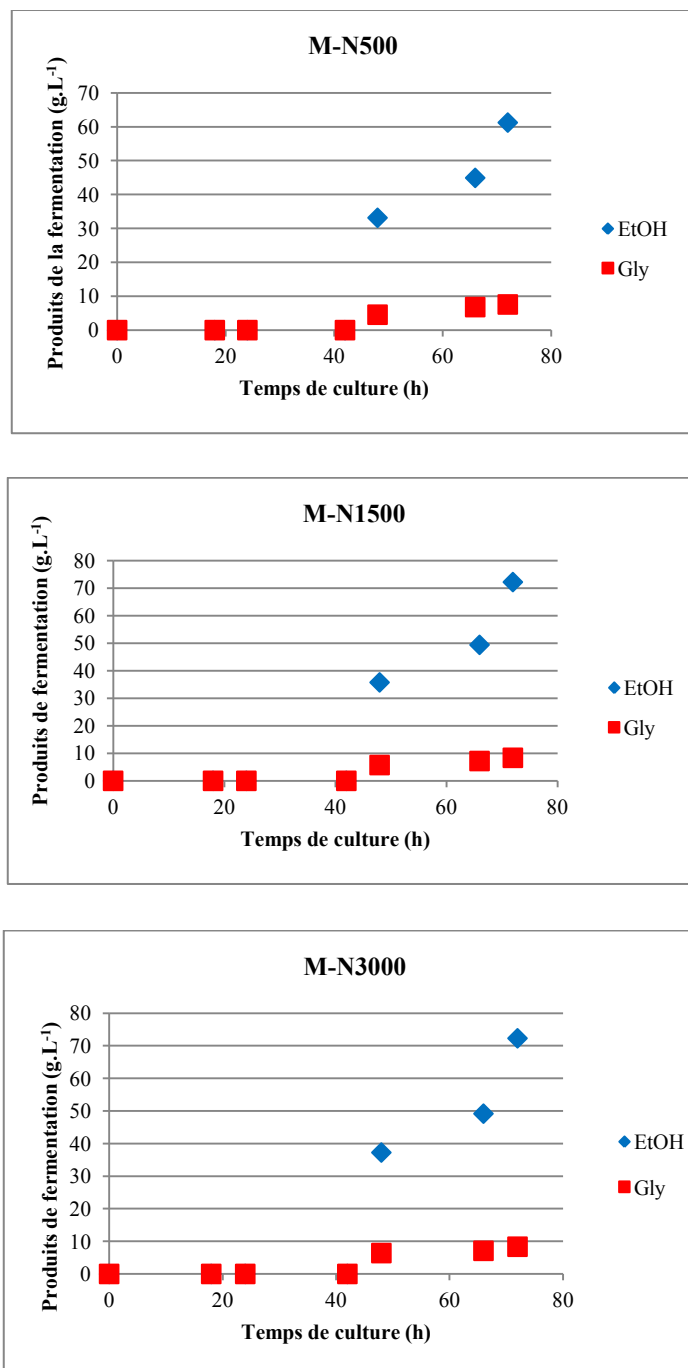


Figure 51. Cinétique de production de bioéthanol et de glycérol par *Z. rouxii* sur milieux 250 g.L⁻¹; additionnés de 500 (M-N500), 1500 (M-N1500) et 3000 (M-N3000) mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

4.2.4 . Cinétique de consommation de NH_4Cl .

La figure 52 illustre l'évolution de la concentration en NH_4Cl dans les milieux de cultures au cours de la fermentation, qui est similaire à celle observée pour les autres paramètres ; une latence de près de 40 h, puis une consommation de l'ammonium, presque totale pour 500 mg.L^{-1} de NH_4^+ , et 30 et 50% pour les milieux supplémentés avec 1500 mg.L^{-1} et 3000 mg.L^{-1} en NH_4Cl .

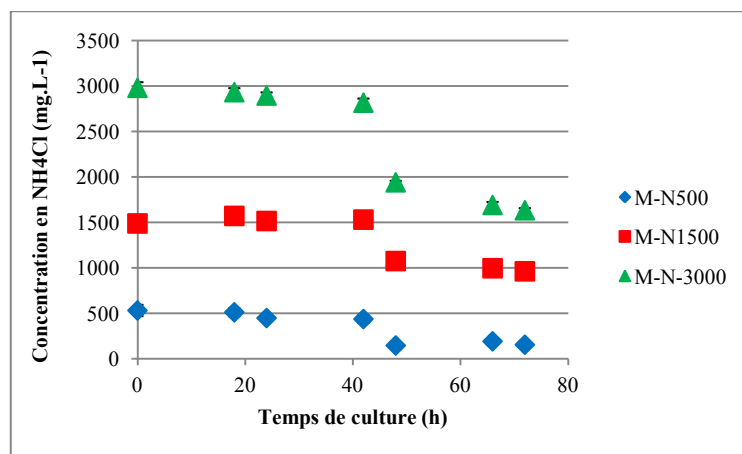


Figure 52. Cinétique de consommation de NH_4Cl par *Z. rouxii* sur milieux 250 g.L^{-1} ; additionnés de 500 (M-N500), 1500 (M-N1500) et 3000 (M-N3000) mg.L^{-1} de NH_4Cl .

Généralement, lors de la fermentation alcoolique les ions ammonium sont totalement consommés au bout des 50 premières heures (Beltran et *al.*, 2004), ce qui confirme les résultats obtenues, pour les 3 milieux utilisés ou la consommation de NH_4Cl s'arrête après 50 heures de fermentation.

L'évolution du substrat azotée des milieux de culture au cours de la fermentation dépend de sa concentration. Selon Beltran et *al.*(2004) et Tailandier et *al.* (2007), l'ion ammonium est généralement totalement utilisé par les levures, ce qui n'est pas le cas pour les milieux M-N1500 et M-N3000.

Pour les deux milieux M-N1500 et M-N3000, la consommation de NH_4Cl s'arrête au bout de 50 heures, sans épuisement total de l'ammonium. D'après Beltran et *al.*(2004), il existe 3 transporteurs (Perméases) pour l'ion ammonium (NH_4^+) MEP1, MEP2 et MEP3. Cette activité de transport nécessite la présence d'une source de carbone énergétique pour être fonctionnelle et la répression des gènes responsables de l'expression des transporteurs de NH_4^+ , par la concentration élevée en source d'azote.

4.2.5 . Cinétique fermentaire

Le tableau 25 présente le bilan des concentrations, rendements et productivités volumiques en éthanol et glycérol obtenus à l'arrêt des cultures (72 heures). Les rendements en éthanol et glycérol produits ne sont pas statistiquement différents à un niveau de probabilité fixé à 5% pour les trois milieux enrichis avec différentes concentration en NH_4Cl .

L'augmentation de la concentration initiale en NH_4Cl , induit une augmentation de la productivité volumique en éthanol ; il y a une différence statistiquement significative entre le milieu enrichi avec 500 mg. L^{-1} et les deux autres milieux. Les milieux M-N1500 et M-N3000, présentent des productivités en glycérol qui ne sont pas statistiquement différentes.

Tableau 24. Paramètres cinétiques des fermentations alcooliques par *Z. rouxii* sur milieux 250 g. L^{-1} ; additionnés de 500 (M-N500), 1500 (M-N1500) et 3000 (M-N3000) mg. L^{-1} de NH_4Cl .

	M-N500	M-N1500	M-N3000
Equi Glu consommés (g. L^{-1})	136,21 $\pm$ 6,45 ^(a)	167,84 $\pm$ 3,84 ^(b)	169,68 $\pm$ 6,72 ^(b)
EtOH (g. L^{-1})	61,22 $\pm$ 0,32 ^(a)	72,17 $\pm$ 0,81 ^(b)	72,32 $\pm$ 0,37 ^(b)
Glycérol (g. L^{-1})	7,57 $\pm$ 0,06 ^(a)	8,35 $\pm$ 0,08 ^(b)	8,35 $\pm$ 0,02 ^(b)
Y_{EtOH} (g.g ⁻¹)	0,44 $\pm$ 0,03 ^(a)	0,42 $\pm$ 0,01 ^(a)	0,42 $\pm$ 0,02 ^(a)
Y_{Gly} (g.g ⁻¹)	0,05 $\pm$ 0,00 ^(a)	0,05 $\pm$ 0,00 ^(a)	0,05 $\pm$ 0,00 ^(a)
Q_{EtOH} (g. L^{-1} .h ⁻¹)	0,84 $\pm$ 0,01 ^(a)	0,99 $\pm$ 0,01 ^(b)	1,00 $\pm$ 0,01 ^(b)
Q_{Gly} (g. L^{-1} .h ⁻¹)	0,10 $\pm$ 0,00 ^(a)	0,11 $\pm$ 0,01 ^(a)	0,11 $\pm$ 0,01 ^(a)

Les moyennes portant les mêmes lettres dans la même ligne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

4.2.6 . Conclusion

L'ion ammonium NH_4^+ , aussi appelé sel d'ammonium ou azote ammoniacal ; il est de synthèse chimique et peu coûteux. Ce type d'apport est assimilé rapidement par la levure et il favorise leur multiplication rapide et importante. Dans notre cas, il est

intéressant d'augmenter la quantité de NH_4Cl de 500 mg.L^{-1} à 1500 mg.L^{-1} , mais pas à 3000 mg.L^{-1} . L'analyse statistique a montré que les résultats des milieux M-N1500 et M-N3000 sont statistiquement identiques. L'augmentation de la concentration initiale en NH_4Cl , nous a permis d'augmentation de la concentration finale en éthanol (72 g. L^{-1}) et la productivité Q_{EtOH} ($0,99 \text{ g. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

5 . Fermentation « VHG » par des microorganismes isolés de sous produits de dattes

La levure est capable de détecter un changement de la pression osmotique du milieu extérieur et y répond par l'accumulation dans la cellule d'un osmoprotecteur qui est le glycérol. L'environnement hyper-osmotique des milieux de cultures à base de sirop de dattes, a causé un dysfonctionnement de métabolisme des deux levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida pelliculosa*.

Zygosaccharomyces rouxii a été très remarquable grâce à ces propriétés résistantes au stress osmotique ; cette souche est restée viable en raison de sa tolérance à des concentrations en sucres élevés allant jusqu'à 500 g.L^{-1} , des conditions qui sont inhibitrices pour les autres levures. La fermentation VHG a montré que *Z. rouxii* est une souche fructophile, mais incapable de dégrader le saccharose. Afin de pallier cet inconvénient nous avons testé un microorganisme isolé des sous produits de dattes ; un microorganisme endogène, adapté au substrat, au milieu extrême, robuste et local.

En ce sens, un microorganisme a été gracieusement fourni par Mademoiselle Monia JEMNI, chercheur au Centre Régional de Recherche en Agriculture Oasienne de Degueche à Tozeur en Tunisie qui a isolé cette souche à partir de sous-produits des dattes (les écarts de triage).

5.1 . La souche isolée

5.1.1 . Identification

L'identification et la caractérisation ont été réalisées au Centre de Ressources en Qualité et Sécurité dans l'Agriculture et les industries Agro-alimentaire à Plouzané. Nous reprenons ci-dessous le rapport édité par l'AQUASA sous la direction de Mme Amélie WEILL.

L'analyse microscopique a montré que la souche isolée était une bactérie. Pour identifier et caractériser l'espèce bactérienne ou la communauté de microorganismes à laquelle elle appartient, une analyse des séquences d'ARNr16s a été effectuée. C'est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'identification des espèces bactériennes.

D'après Drancourt et *al.*, (2004) qui ont découvert 11 nouvelles espèces parmi 1404 isolats analysés par PCR 16S, des pourcentages de similarité supérieurs à 99% avaient été choisis pour assimiler une souche à une espèce déjà décrite ; de 97 à 99% pour l'assimiler au niveau du genre ; et inférieur à 97% pour décrire une nouvelle espèce. La PCR 16S est donc un outil majeur d'exploitation de la diversité bactérienne (Drancourt et *al.*, 2004 ; Janda and Abbot, 2007).

L'ADNr 16S et une partie du gène codant la gyrase (*gyrB*), ont été amplifiés. Les résultats de séquençage ont été traités par le logiciel « BioNumerics » et comparées aux bases de données NCBI (Tableau 26).

Tableau 25. Résultats des brins forwards des séquençages 16S de la souche S.

Souche	Séquences
S832 pb	>S_16S CTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACA AACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTC ACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTC GAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGAACAGATTTGTGGGATTGGCTT AACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAG CCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCG GTTTGTACACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTA AGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGA CGTCTTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTCTGGCGGCG TGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAT GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACT GGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCG CATGGTTCAGACATAAAAGGTCTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT ACGGGAGGGATCAGTATGGAATCTTCCGCA.

La qualité du séquençage, n'a permis d'exploiter qu'une seule des deux séquences obtenues.

Tableau 26. Résultats des Blast (NCBI) de la réponse 16S forward de la souche S.

Identification	E value	Coverage	Identity
<i>Bacillus methylotrophicus</i> strain WZ-4	0.0	98%	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain S-14	0.0	100%	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain P-329	0.0	100%	99%
<i>Bacillus subtilis</i> strain S-111	0.0	100%	99%
<i>Bacillus subtilis</i> strain VIT-SPS2	0.0	100%	99%

La séquence de l'ADNr 16s obtenue pour la souche isolée a été comparée avec celles de plusieurs bases de données internationales. La bactérie appartient au genre *Bacillus* et aux espèces *B. subtilis* ou *B. amyloliquefaciens* (Tableau 27).

Cependant, la région étudiée ne permet pas de différencier l'espèce. D'après Larsen et *al.*, (2014), une portion du gène codant une partie de la gyrase semble plus spécifique pour différencier ces deux espèces (Tableau 28).

Tableau 27. Résultats des séquençages d'une partie de la région Gyrase de la souche S.

Souche	Séquences
S378 pb	>S_GryR TCTTCTCCGATTCTGTTCCGAGGGCCGTGATCATTGATCTGACCTCATTG TTTGAGAGAATCTTATCAAGTCTGGCTTTCTCAACGTTTCAGAATCTTACC GCGCAGCGGCAGAATGGCTTGGAATGACGGTCCCGTCCCTGTTTCGCTG ATCCGCCCGCAGAGTCACCCTCTACGATATACAAGCTCGGAAATGCTCG GATCTTTAGAAGAACAGTCCGCCAAGTTTGCCCGGCTAGATTGGAAATCT CAAGCGCACTTTTGCGCCGGGTCAATTCGCGGGCTTTTTTCGCCGCCA/AC CTGTGGCCGATCTTGAAGTGATCGGCGAAACTGATAAGACCGGAACGAT TACGCACTTCGTTCCGGACCCGGAAATTT.

La qualité du séquençage, n'a permis d'exploiter qu'une seule des deux séquences obtenues, qui a été comparée aux séquences de la base de données NCBI (Tableau 29).

Tableau 28. Résultats des Blast (NCBI) de la séquence *GyrB* reverse de la souche S.

Identification	E value	Coverage	Identity
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LFB112, complete genome	3 e-147	100%	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>Plantarum</i> strain 15536	3 e-147	78%	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>Plantarum</i> strain 15528	3 e-147	78%	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain Y41a	3 e-147	100%	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain CH92	3 e-147	100%	99%

Afin d'affiner l'identification de la souche un arbre phylogénétique, basé sur l'analyse d'une portion du gène *gyrB*, avec des souches de *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* a été construit à l'aide du logiciel *Figtree* (Figure 53).

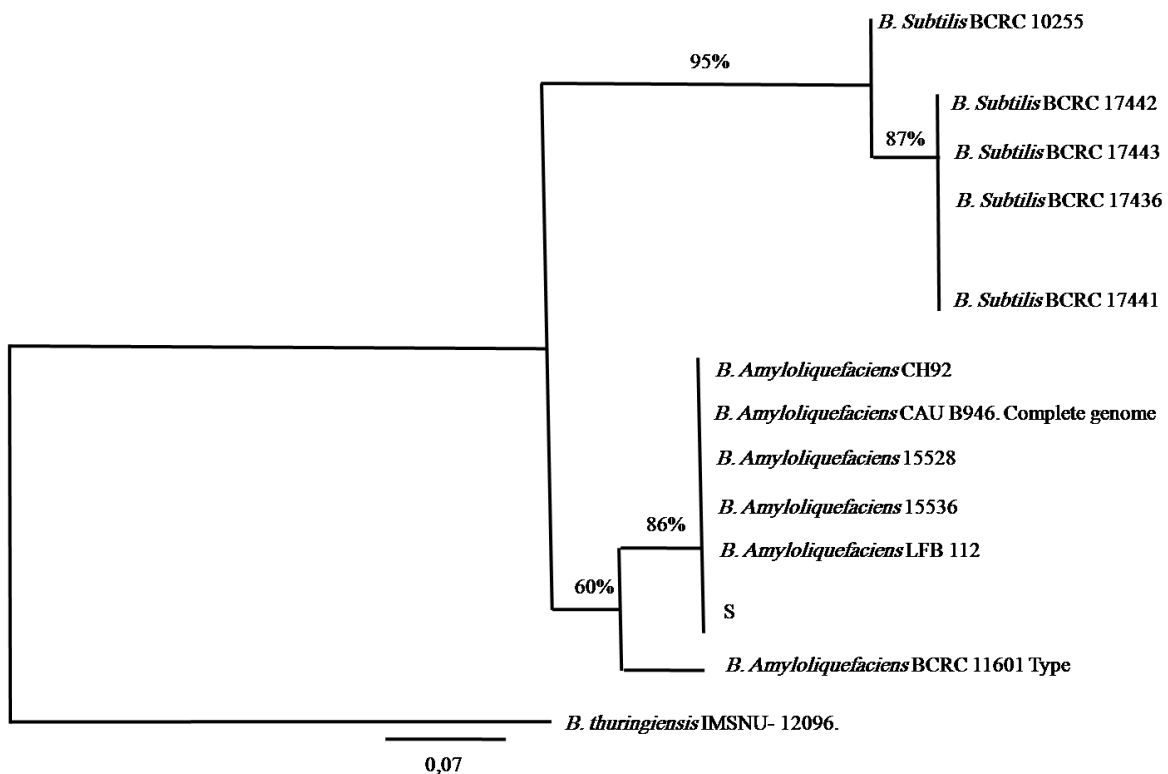


Figure 53. Reconstruction phylogénétique par maximum de vraisemblance basée sur l'analyse d'une portion du gène *GyrB* incluant 6 séquences issues de souches de *B. subtilis* subsp. *Subtilis* dont la souche type et 6 séquences issues de souches de *B. amyloliquefaciens* dont la souche type de *B. amyloliquefaciens* subsp. *Amyloliquefaciens*, 5 souches de *B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* ainsi que la souche testée.

Les analyses des résultats des séquençages suggèrent que la souche appartient à l'espèce *Bacillus amyloliquefaciens*, possiblement la sous-espèce *plantarum*. Ce résultat a été confirmé par l'utilisation d'un test phénotypique : API50CHB (Biomérieux). Les pourcentages d'identification étaient supérieurs à 98%.

Le genre *Bacillus* comprend au moins 36 espèces. Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*.

- Règne : Bactérie.
- Embranchement : *Firmicutes*.
- Classe : *Basilli*.
- Ordre : *Bacillales*.
- Famille : *Bacillaceae*.
- Genre : *Bacillus*.

Il est difficile de distinguer la souche *B. subtilis* des espèces étroitement apparentées *Bacillus*, en particulier l'espèce *B. amyloliquefaciens* (Ash et al., 1991 ;

Logan et De Vos, 2009), toutefois, L'espèce *B. amyloliquefaciens* affiche des différences des distinctes dans la séquence génétique de l'ARN ribosomique 16S : L'absence de deux sites de restriction *RsaI* dans la région V3 qui la différencie de l'espèce *B. subtilis* (Jeyaram et al., 2001).

5.1.2 . Conditions de croissance

Les plages de températures de croissance et de pH varient entre les souches (Tableau 4) (Logem et De Vos, 2009 ; Rooney et al., 2009).

Tableau 29. Condition de croissance de *Bacillus*

Espèces	Plage de température de croissance (°C)	Température de croissance optimale (°C)	Plage de pH ^a
<i>B. amyloliquefaciens</i>	15-50	30-40	5,5-8,5 ^b
<i>B. atrophacus</i>	5-55	28-30	5,3-5,7 ^c
<i>B. licheniformus</i>	15-55	30-40	5,7-6,8 ^b
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>subtilis</i>	5-55	28-30	5,5-8,5 ^b
<i>B. subtilis</i> sous-espèce <i>inaquosorum</i>	15-55 ^d	28-30 ^d	5,5-5,7 ^d

^a pH dans un bouillon Voges-Proskauer.

^b (Logan et De Vos, 2009)

^c (Nakamura, 1989)

^d (Rooney et al., 2009)

Les espèces *B. licheniformis* et *B. subtilis* sous-espèce *inaquosorum* sont anaérobies facultatives et certaines souche de *B. subtilis* ont une croissance restreinte dans des conditions anaérobies (Logan et De Vos, 2009).

- *B. amyloliquefaciens*

C'est un microorganisme produisant des enzymes (amylase, isopène, protéase, ribonucléase et phylase), biosurfactants, antibiotiques et détergents destinés à des applications industrielles et commerciales (Madslien et *al.*, 2012) y compris des applications de nettoyage, de dégraissage et antibactériennes (Madslien et *al.*, 2012 ; Moons et *al.* ; 2009 ; Perez-Garcia et *al.*, 2011 ; Rendueles et Ghigo, 2012, Rivardo et *al.*, 2009).

- ***B. subtilis***

C'est un microorganisme produisant des lipopeptides (biosurfactants), des enzymes (amylase, protease) ainsi que des composés antibiotiques (aterrimin) (Moons et *al.*, 2009 ; Rendueles et Ohigo, 2012 ; Rivardo et *al.*, 2009).

B. subtilis est également utilisé dans le traitement de l'eau et des eaux usées pour réduire les efflorescences algales, les odeurs, l'accumulation de boue, les fosses septiques et les fosses de déchets agricoles (Roe Tech, 2014), ou encore pour la fermentation d'aliments traditionnels (Inatus et *al.*, 2006).

Les *Bacillus* sont fréquemment retrouvées dans le sol et dans les denrées alimentaires ; Diorisio et Keiko, (2009) et Daayf et *al.*, (2003) ont isolé *Bacillus amyloliquefaciens*, respectivement de la surface de fruits de banane et de pomme de terre qui sont très riches en sucres. La souche identifiée dans ce travail de recherche a été isolée de sous-produits de dattes, un substrat très riche également en sucres.

5.1.3 . Conclusion

La souche « S » a été identifiée comme étant *Bacillus amyloliquefaciens* d'après les analyses génotypiques et phénotypiques effectuées. Cette bactérie est décrite dans la littérature (Saha et *al.*, 2014 ; Deb et *al.*, 2013 ; Singh et *al.*, 2013) comme productrice de l' α -amylase, un enzyme nécessaire à l'hydrolyse de l'amidon et de cellulose en sucres simples. Mais il est nécessaire de vérifier si cette souche allochtone, cultivée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, produit de l'éthanol.

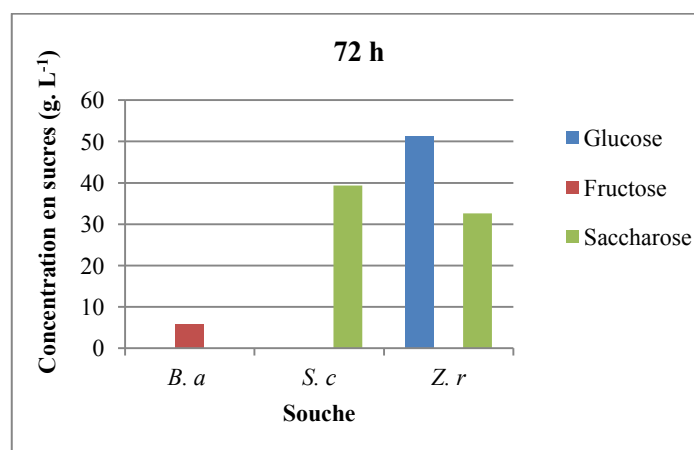
6 . Fermentation « VHG » par la souche identifiée

Deux series de fermentation « VHG » ont été réalisées en mode « Batch » suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes ». La première série sur sirop de dattes contenant une concentration initiale en sucres d'environ 175 g.L⁻¹. Les flacons ont étéensemencés par la même quantité d'inoculum. Trois souches ont été utilisées : la bactérie identifiée *Bacillus amyloliquefaciens* et les souches de références *Zygosaccharomyces rouxii* et *Saccharomyces cerevisiae*. La deuxième serie de fermentation VHG a été réalisée pour tester l'adaptation de la souche identifiée à un environnement hyperosmotique, c'est à dire des cultures à 28°C durant 160 heures sur M-S175 et M-S350,ensemencés par *B. amyloliquefaciens*.

6.1 . Production d'éthanol par *B. amyloliquefaciens*, *Z. rouxii* et *S. cerevisiae*

6.1.1 . Dégradation des sucres par les souches utilisées

Les histogrammes de la figure 54, présentent les quantités des sucres résiduels dans les milieux de culturesensemencés par différentes souches à 72 heures et 160 heures de fermentation.



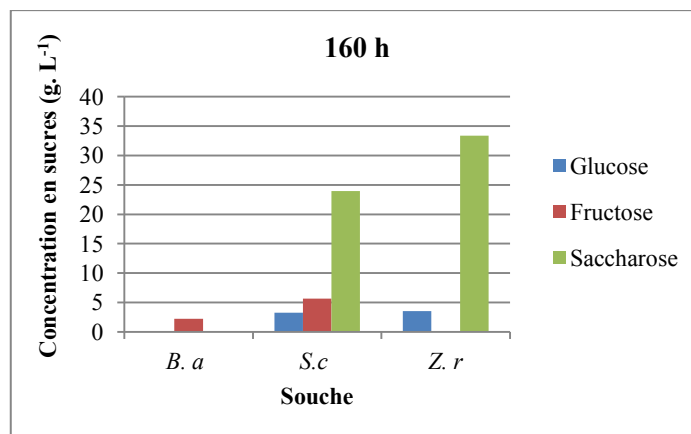


Figure 54. Concentration en sucres dans les milieux M-S175 fermentés par *S. cerevisiae* (*S.c*), *Z. rouxii* (*Z.r*) et *B. amyloliquefaciens* (*B. a*) ; milieux additionnés de 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

La souche indigène *Bacillus amyloliquefaciens* présente l'avantage de dégrader tous les sucres présent dans le sirop de datte, ce qui est particulièrement intéressant pour le saccharose, qui n'est pas assimilé par *Z. rouxii*. Ainsi l'intégralité des sucres présents dans la biomasse seraient convertie en produit à haute valeur ajoutée.

6.1.2 . Paramètres cinétiques

Le tableau 30 présente un bilan des concentrations, rendements et productivités volumiques en éthanol et en glycérol.

Pour la même concentration en substrat (175 g.L⁻¹), *B. amyloliquefaciens* produit environ 77 g.L⁻¹ d'éthanol après 72 heures de fermentation et 87 g.L⁻¹ en fin de culture (160 heures). *B. amyloliquefaciens* a la capacité de fermenter un milieu qui a une concentration de 175 g.L⁻¹ en substrat.

Pour s'adapter au son environnement hyperosmotique, *B. amyloliquefaciens* comme les levures, produit du glycérol, près de 8,4 g.L⁻¹ pour les deux milieux.

Tableau 30. Paramètres cinétiques de la fermentation alcoolique de M-S175 fermentés par *S. cerevisiae* (S.c), *Z. rouxii* (Z.r) et *B. amyloliquefaciens* (B. a) ; milieux additionnés de 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

<i>7</i>	Temps (h)	Equi Glu consommés (g.L ⁻¹)	EtOH (g.L ⁻¹)	Gly (g.L ⁻¹)	Y _{EtOH} (g.g ⁻¹)	Y _{Gly} (g.g ⁻¹)	Q _{EtOH} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Q _{Gly} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
<i>B. a</i>	72	100% ^a	77,46±2,2 ^a	8,41 ±0,47 ^a	0,41±0,01 ^a	0,046± 0,004 ^a	1,07±0,001 ^a	0,117±0,001 ^a
	160	100% ^a	87,11±2,26 ^b	8,40 ±0,21 ^a	0,46 ±0,01 ^a	0,045 ±0,0008 ^a	0,54±0,001 ^{bc}	0,053±0,001 ^b
<i>S. c</i>	72	85% ^b	69,60±2,15 ^{de}	7,42±0,01 ^c	0,46±0,02 ^a	0,050±0,001 ^a	0,96 ±0,02 ^e	0,103±0,006 ^d
	160	89,2 ^b	73,62±0,1 ^{ad}	7,33±0,13 ^c	0,47±0,0006 ^a	0,047±0,0008 ^a	0,46±0,002 ^{cf}	0,046±0,0001 ^{be}
<i>Z. r</i>	72	57,1% ^c	44,52±4,5 ^f	5,69±0,7 ^d	0,44±0,07 ^a	0,057±0,0007 ^c	0,61±0,006 ^b	0,079±0,0001 ^f
	160	84,1% ^b	64,65 ±0,08 ^e	6,26±0,05 ^d	0,44±0,01 ^a	0,043±0,002 ^a	0,40±0,001 ^f	0,039±0,002 ^e

Les moyennes portant les mêmes lettres dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (p<0,05).

Les rendements en éthanol pour les souches *B. amyloliquefaciens*, *S. cerevisiae* et *Z. rouxii* varient de 41% à 47% pour 72 h et 160 h de fermentation. Les rendements sont statistiquement non affectés ni par la durée de fermentation, ni par la souche utilisée. Le rendement en éthanol obtenu par *Bacillus amyloliquefaciens*, n'est pas significativement différent ($p < 0,05$) de ceux obtenus avec *Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces rouxii*.

Toutefois, nous souhaitons étudier le comportement de *Bacillus amyloliquefaciens* face à la composition du milieu de culture en sucres.

7.1 . Effet de la concentration en substrat sur la capacité fermentaire de *Bacillus amyloliquefaciens*

7.1.1 . Evolution de la biomasse

L'évolution de la biomasse au cours des fermentations est représentée sur la figure 55. On observe une phase de latence de près de 50 h. la phase stationnaire est atteinte au bout de 72 h pour M-S175. Pour le milieu M-S350, la phase de latence est de près de 72 heures et la croissance n'est pas terminée au bout de 160 h.

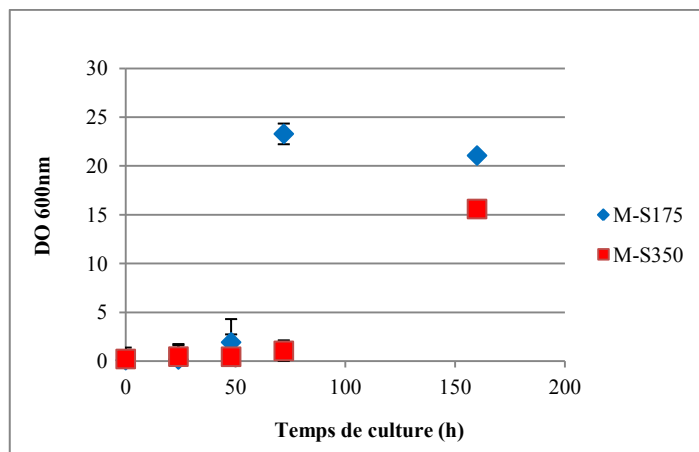


Figure 55. Evolution de la biomasse au cours de la fermentation par *B. amyloliquefaciens* sur M-S175 et M-S350; additionnés de 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

7.1.2 . Cinétique de dégradation des sucres

La figure 56 montre la cinétique de dégradation des sucres.

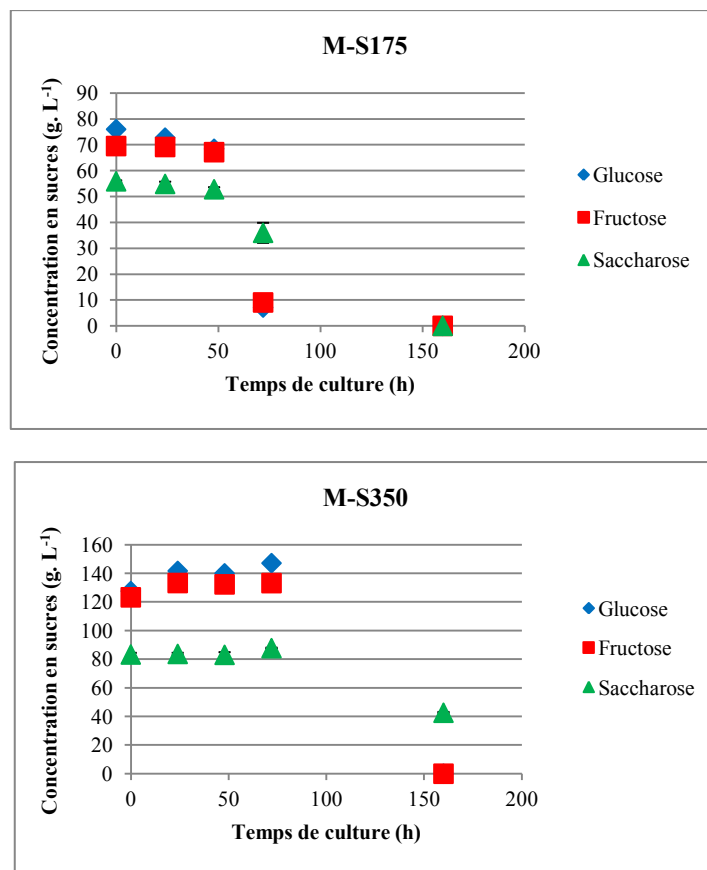


Figure 56. Evolution de la concentration des sucres au cours de la fermentation par *B. amyloliquefaciens* sur M-S175 et M-S350; additionnés de 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

D'après Deutsher et *al.* (2002), les sucres mono et di saccharides sont transportés et catalysés à l'intérieur de la cellule. Les sucres simples (glucose et fructose) représentent des sources de carbone privilégiées de *Bacillus amyloliquefaciens* (Steinmetz, 1993)

7.1.3 . Produits de la fermentation

La production d'éthanol est de 89,8 g.L⁻¹ après 160 heures de fermentation pour les deux milieux de culture (Figure 57).

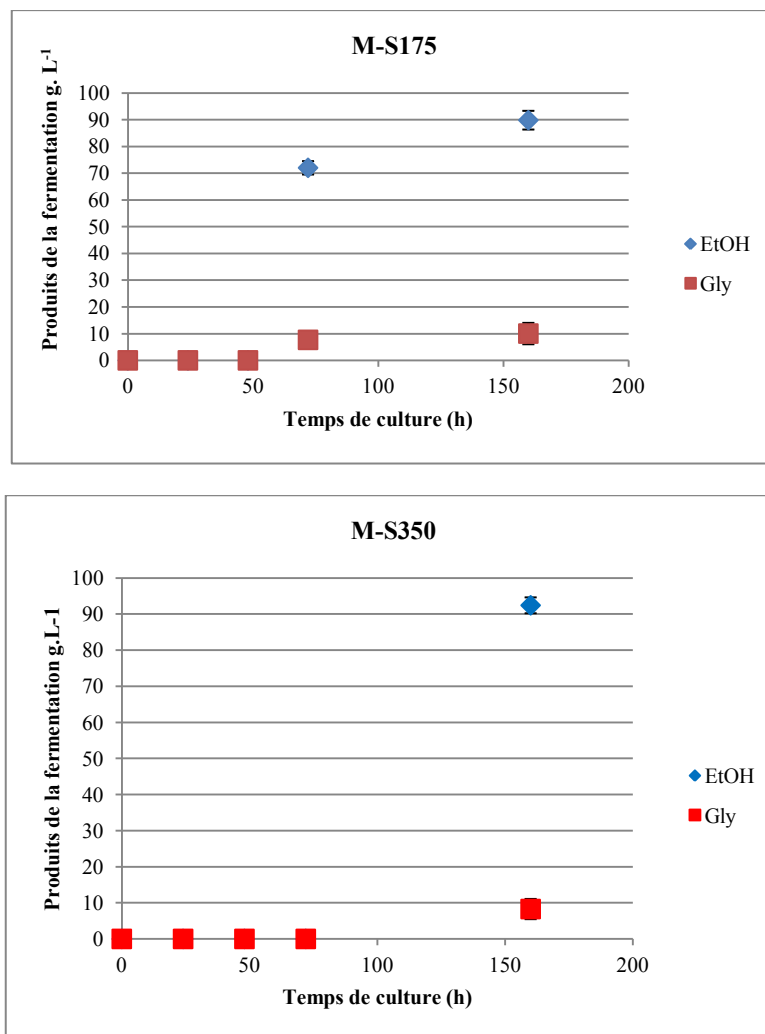


Figure 57. Evolution de la concentration en éthanol et en glycérol au cours de la fermentation par *B. amyloliquefaciens* sur M-S175 et M-S350; additionnés de 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

La quantité d'éthanol trouvée après 160 heures de fermentation « VHG » d'un milieu de culture à base de sirop de dattes (M-S175 et M-S350), par la bactérie *Bacillus amyloliquefaciens* dépasse 90 g.L⁻¹; c'est largement supérieur aux résultats obtenus pour la levure *Z. rouxii* ; 64 g.L⁻¹ pour M-S175 et 82 g.L⁻¹ pour M-S350 après 160 heures de fermentation. La figure 56, montre que quelle que soit la concentration en sucres, *B. amyloliquefaciens* a été capable de consommer la totalité des sucres. En observant les temps de consommation, on constate que systématiquement le fructose est épuisé en même temps que le glucose, traduisant ainsi la préférence de cette bactérie pour le glucose et le fructose ; quant au saccharose, il a été consommé en totalité pour M-S175 et à 50% pour M-S350. Comparés à ceux obtenus sur *Z. rouxii*, ces résultats sont très intéressants. En effet, *Z. rouxii*, qui est une souche fructophile, ne consomme le glucose qu'après épuisement de fructose de milieu ; de plus, elle ne peut pas dégrader le saccharose quelle que soit la concentration de milieu en substrat.

L'augmentation de la concentration en sucres à 350 g.L⁻¹ se traduit par un allongement du temps d'osmoadaptation de *B. amyloliquefaciens* (Figure 57), avec un rendement plus faible en éthanol (31%) et en glycérol (3%) (Tableau 31).

Tableau 31. Paramètres cinétiques des fermentations VHG fermentation par *B. amyloliquefaciens* sur M-S175 et M-S350; additionnés de 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl.

	M-S175	M-S350
Equi Glu initial	204.	338,5
Equi Glu consommés (g.L ⁻¹)	100% ^(a)	86,8% ^(b)
EtOH (g.L ⁻¹)	89,8	92,4
Gly (g.L ⁻¹)	10	8,3
Y _{EtOH} (g.g ⁻¹)	0,45±0,04 ^(a)	0,31±0,07 ^(b)
Y _{Gly} (g.g ⁻¹)	0,05±0,003 ^(a)	0,03±0,001 ^(b)
Q _{EtOH} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	0,56±0,008 ^(a)	0,57±0,007 ^(a)
Q _{Gly} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	0,06±0,001 ^(a)	0,05±0,001 ^(b)

Le rendement théorique en éthanol, appelé rendement de Gay-Lussac, établit que 51,5 kg d'éthanol peuvent être fabriqués à partir de 100 kg de glucose. (Balleini, 2011). En pratique, les réactions de maintenance, les réactions de synthèse des infrastructures cellulaires et des coproduits (glycérol, ...) limitent le rendement de conversion à 80-90% de sa valeur théorique (0,511 g.g⁻¹).

Le rendement Y_{EtOH} pour le milieu M-S350 est de 0,31 g.g⁻¹, 60% du rendement théorique limite (0,511 g.g⁻¹), bien inférieur à celui de M-S175 0,45 g.g⁻¹ qui représente 88% de rendement théorique. Ceci est peut être expliqué par le stress osmotique subit par les cellules et induit par les fortes teneurs en sucre. La réponse au choc osmotique se traduit au niveau de métabolisme de *B. amyloliquefaciens* par modification des flux de

carbone et d'énergie ; une partie du carbone a été détournée vers l'osmoadaptation des cellules.

Cette série d'expérience a montré que, comme *Z. rouxii*, la souche isolée de sous-produits de dattes est tolérante aux fortes concentrations en substrat et elle fermente l'ensemble des 3 sucres, contrairement à *Z. rouxii* qui est une souche fructophile.

7.2 . Conclusions

La souche isolée des sous-produits des dattes et identifiée comme étant un *Bacillus amyloliquefaciens* a été capable de convertir les trois types de sucres présents dans le milieu hyper-osmotique (glucose, fructose et saccharose) en éthanol, contrairement à *Z. rouxii* qui est une souche fructophile et qui ne consomme pas le saccharose et le glucose qu'après épuisement du milieu en Fructose. Le rendement Y_{EtOH} de *B. amyloliquefaciens* pour le milieu M-S175 est de $0,45 \text{ g.g}^{-1}$, bien supérieure à ceux de *S. cerevisiae*, *C. palliculosa* et *Z. rouxii* qui donnent respectivement $0,38$, $0,29$ et $0,34 \text{ g.g}^{-1}$. Pour le milieu M-S350 ; le rendement en éthanol de *B. amyloliquefaciens* est $0,31 \text{ g.g}^{-1}$, inférieur à celui de *Z. rouxii* ($0,38 \text{ g.g}^{-1}$), la seule levure qui a pu fermenter le milieu M-S350.

Cette souche allochtone est capable de se développer dans un environnement hyper-osmotique. La fermentation *VHG* pour produire de l'éthanol avec cette souche nous semble prometteuse pour valoriser un substrat très riche en sucres fermentescibles.

8 . Procédé industriel de production d'éthanol

Notre objectif est atteint à l'échelle laboratoire, mais il faut transformer l'essai au niveau de la production industrielle qui reste une condition indispensable à la réussite de chaque projet de recherche. Dans ce cadre je propose à la fin de notre travail de recherche, un procédé industriel de transformation de sous-produits de dattes (Figure 58) qui comprend un procédé principal de production d'éthanol.

Il est composé d'une succession d'opérations unitaires :

- Lavage et dénoyautage des dattes ;
- Extraction des sucres par de l'eau géothermale ;
- Concentration de jus obtenue à 72°Brix ;
- Fermentation par des microorganismes osmotolérants ;

- Séparation d'éthanol par distillation.

Les co-produits de la production d'éthanol comme les noyaux et les pulpes obtenues après l'opération d'extraction sont destinés à l'alimentation de bétail (séchage et broyage).

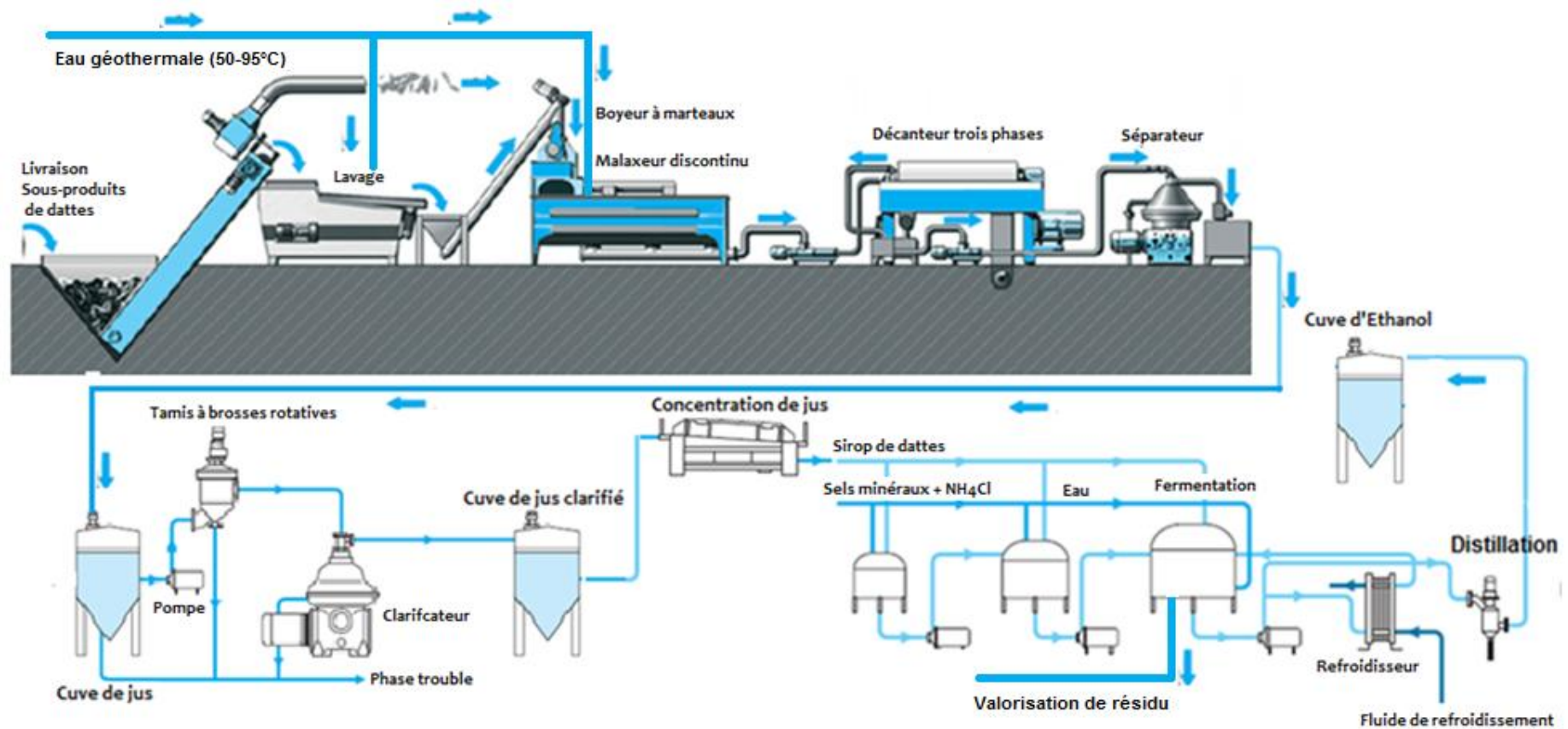


Figure 58. Procédé industriel de valorisation de sous-produits de dattes.

CONCLUSION GENERALE

Le présent travail a montré que la valorisation des sous-produits de dattes de la variété « *Deglet-Nour* », la plus commercialisée en Tunisie, en vue de leur éventuelle transformation en bioéthanol est possible. Ce substrat est très riche en sucres fermentescibles, dont la transformation par voie fermentaire semble prometteuse.

Dans un premier temps, afin de pouvoir bien exploiter le déchet des dattes, nous avons optimisé l'extraction des sucres de dattes en utilisant un plan d'expérience. Il est possible de définir les conditions permettant d'extraire un jus très riches en sucres qui sont (80°C, 90 min, 1 :2 ratio pulpe /eau). Le jus obtenus est concentré en sirop à 720 g.L⁻¹ de sucres fermentescibles (Glucose, Fructose et Saccharose).

La seconde étape de ces travaux a été la production d'éthanol par *S. cerevisiae*. Les fermentations « batch », nous ont permis de produire 60 g.L⁻¹ d'éthanol et 5 g.L⁻¹ de glycérol à partir d'un milieu à 175 g.L⁻¹ en sucres enrichi avec 500 mg.L⁻¹ de NH₄Cl. Mais à une concentration élevée en sucres (350 g.L⁻¹), l'environnement hyper-osmotique a limité la capacité fermentaire de *S. cerevisiae*, qui est une levure sensible à la pression osmotique.

Le mécanisme de résistance des levures aux fortes concentrations en sucres se traduit par la production et l'excrétion partielle dans le milieu de culture de glycérol (Djelal et al., 2005 ; Djelal et al., 2012a). C'est le cas de *Z. rouxii*, la seule souche qui a résistée au stress osmotique causée par la concentration élevée en sucres (350 g.L⁻¹), et qui a totalement inhibé *S. cerevisiae* et *C. pelliculosa*.

Des fermentations « *VHG* » sur des milieux à base de sirop de dattes, avec des concentrations en sucres allant jusqu'à 500 g.L⁻¹ ont montré que *Z. rouxii* était capable de croître même à cette teneur en sucres. *Z. rouxii* est une souche fructophile ; elle consomme rapidement le fructose, et une consommation du glucose n'est observée qu'après disparition du fructose de milieu de culture. Elle peut métaboliser 60% de glucose après 136 heures de fermentation dans le milieu M-S350. Par contre elle ne métabolise pas le saccharose.

L'ion ammonium NH_4^+ , aussi appelé sel d'ammonium et azote ammoniacal ; de synthèse chimique et peu coûteux, ce type d'apport est assimilé rapidement par *Z. rouxii* et il favorise en effet leur multiplication rapide et importante. Dans notre cas, il est intéressant d'augmenté la quantité de NH_4Cl de 500 mg.L^{-1} à 1500 mg.L^{-1} . L'augmentation de la concentration initiale en NH_4Cl , a permis l'augmentation de la concentration finale en éthanol (72 g. L^{-1}) et la productivité Q_{EtOH} ($0,99 \text{ g. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

La souche isolée des sous-produits des dattes et identifiée comme étant un *Bacillus amyloliquefaciens* a été capable de convertir les trois types de sucres présents dans le milieu hyper-osmotique (glucose, fructose et saccharose) en éthanol, contrairement à *Z. rouxii* qui est une souche fructophile et qui ne consomme le glucose qu'après épuisement de milieu en Fructose . Le rendement Y_{EtOH} de *B. amyloliquefaciens* pour le milieu M-S175 est $0,45 \text{ g.g}^{-1}$, bien supérieure à ceux de *S. cerevisiae*, *C. palliculosa* et *Z. rouxii* qui représentent respectivement $0,38$, $0,29$ et $0,34 \text{ g.g}^{-1}$. Pour le milieu M-S350, le rendement en éthanol de *B. amyloliquefaciens* est $0,31 \text{ g.g}^{-1}$, inférieure à celui de *Z. rouxii* ($0,38 \text{ g.g}^{-1}$), la seule levure qui a pu fermenter le milieu M-S350. Cette souche allochtone est capable de se développer dans un environnement hyper-osmotique. La fermentation *VHG* pour produire d'éthanol avec cette souche nous semble prometteuse pour valoriser un substrat très riche en sucres fermentescibles.

La question suivante se pose : est-il préférable de travailler avec une souche connue pour sa production en éthanol, *S. cerevisiae* et une concentration en sucres totaux de 200 g.L^{-1} ou alors avec une souche allochtone, *B. amyloliquefaciens* et une concentration en sucre totaux de 350 g.L^{-1} . Dans le premier cas la souche impliquée est exogène, les quantités produites en éthanol plus faible mais la quantité d'énergie apportée sera plus faible. Il faut aussi se pose la question des quantités d'eau nécessaire au procédé d'extraction ainsi que du devenir du résidu de la fermentation après extraction de l'éthanol par distillation. Ce résidu pourrait-il être utilisé comme amendement pour la culture dans les palmeraies ? Quel est l'impact d'un tel procédé sur l'environnement, est ce que des impacts peuvent être évités ? Une analyse cycle de vie (ACV) serait intéressante pour évaluer le procédé dans sa globalité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd-Alla, M.H., Morsy, F.M., El-Enany, A.W.E. 2011.** Hydrogen production from rotten dates by sequential three stages fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36,13518–13527.
- Abd-Alla, M.H., El-Enany, A.W.E. 2012.** Production of acetone–butanol–ethanol from spoilage date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*. *Biomass and Bioenergy*, 42, 172–178.
- Al-Bahry, S.N., Al-Wahaibi, Y.M., Elshafie, A.E., Al-Bemani, A.S., Joshi, S.J., Al-Makhmari, H.S., Al-Sulaimani, H.S. 2013.** Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 81, 141-146.
- Abe, H., Fujita, H., Takaoka, Y., Kurita, E., Yano, S., Tanaka, N., Nakayama, K.I. 2009.** Ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated under selective conditions by over-expression of a proofreading-deficient DNA polymerase delta. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(3), 199-204.
- About-Zeid, A.A., Baeshin, N.A., Baghlaf, A.O. 1991.** The formation of oxytetracycline in a date-coat medium. *Bioresource Technology*, 37, 179-84.
- Acourene, S., Ammouche, A. 2012.** Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 759–766.
- Aguilera, F., Peinado, R.A., Millan, C., Ortega, J.M., Mauricio, J.C. 2006.** Relationship Between Ethanol Tolerance, H⁺-Atpase Activity and the Lipid Composition of the Plasma Membrane in Different Wine Yeast Strains. *International Journal of Food Microbiology*, 110(1), 34-42.
- 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, 311-316.

- Ahmed, I.A., Ahmed, A.K., Robinson, R.K. 1995.** Chemical composition of date varieties as influenced by the stage of ripening. *Food Chemistry*, 54, 305–309
- Aldiguier, S.A., 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, 217-222.
- Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C. 1994.** Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters*. 124, 17-21
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Al-Abid, M., Al-Shoaily, K., Al-Amry, M., Al-Rawahy, F. 2007.** Compositional and functional characteristics of dates, syrups and their by-products. *Food Chemistry*, 104(3), 943-947.
- Alfenore, S., Bideaux, C., 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 prediction tool. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 2134-2140.
- Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J. L., Goma, G., Molina- Jouve, C., Guillouet, S. E. 2004.** Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63 (5), 537-425.
- Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S.E., 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, 67-72.
- Ansanay- Galeote, V., Blondin, B., Dequin, S., Sablayrolles, J.M. 2001.** Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae* . *Biotechnology Letters*, 23, 677-681.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D. 1991.** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 13, 202-206.

Assiery, E.A.R. 2015. Nutritional composition of fruit of 10 dates palm (*Phoenix dactylifera L.*) cultivars grown in Saudi Arabia. *Journal of Taibah University for science*, 9(1), 75-79.

Atkinson, B., Matrituna, F. 1983. Biochemical engineering and biotechnology. Handbook New York. The nature Press.

Attfield, P.V. 1997. Stress tolerance: the Key to Effective Strains of Industrial Baker's Yeast. *Nature Biotechnology*, 15(13), 1351 – 1357.

Bafrcnova, P., Smogrovicova, D., Slavikova, I., Patkova, J., Domeny, Z. 1999.

Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 21, 337-341.

Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, 89-105.

Bai, F.W., Chen, L.J., Zhang, Z., Anderson, W.A., Moo-Young, M. 2004. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *Journal of Biotechnology*, 110, 287-293.

Ballerini, D. 2011. Les biocarburants: Répondre au défis énergétiques et environnementaux des transports. IFP Energies nouvelles. Editions Technip, Paris, France.

Bari, M.R., Alizadeh, M., Farbeh, F. 2010. Optimizing endopectinase production from date pomace by *Aspergillus niger* PC5 using response surface methodology. *Food Bioproducts Processing*, 88, 67–72.

Bely, M., sablayrolles, J.M., barre, P .1990. Automatic control of assimilable nitrogen addition during alcohol fermentation in enological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70, 1-6.

Ben Chaabane, F., Aldiguier, A.S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Blanc, P., Bideaux., Guillouet, S.E., Roux, G. 2006. Very high ethanol productivity in an innovative continuous two-stage bioreactor with cell recycle. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29(1), 49-57.

Beney, L., Martinez, I., Pierre-André, M., Gervais, P. 2000. Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 275-279.

Beney, L., Martinez, I., Marechal, P., Moundaga, S., Gervais, P. 2001 (a). Osmotic destruction of *Saccharomyces cerevisiae* is not related to a high water flow rate across the membrane. *Biochemical Engineering Journal*, 9, 205-210.

Beney, L., Marechal, P., Gervais, P. 2001 (b). Coupling effects of osmotic pressure and temperature on the viability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 513-516.

Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamon, J.M. 2004. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, 4, 625-632.

Besbes, S., Cheikh Rouhou, S., Blecker, C., Lognay, G., Drira, N.E. 2006. Voies de valorisation de sous produits de dates: valorisation de la pulpe. *Microbiologie Hygiène Alimentaire*, 8, 3 - 7.

Besbes, S., Drira, L., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. 2009. Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera* L.): compositional, functional and sensory characteristics of date jam. *Food Chemistry*, 112(2), 406 - 411.

Blomberg, A. 2000. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and model. *FEMS microbiology letters*, 182, 1-8.

Blumberg, S., Frank, O., Hofmann, T. 2008. Quantitative Studies on the Influence of the Bean Roasting Parameters and Hot Water Percolation on the Concentrations of Bitter Compounds in Coffee Brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3720-3728.

Birch, R., Walker, G. 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 678 – 687.

Brandberg, T., Lena, G., Frazén, C. J. 2007. The impact of severe nitrogen limitation and microaerobic conditions on extended continuous cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* with cell recirculation. *Enzyme Microbial Technology*, 40, 585-593.

Bruinenberg, P.M., VanDijken, J.P., Alexander-Scheers, W. 1983. An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *Journal of General Microbiology*, 129, 965-971

Bouabidi, H., Reynes, M., Rouissi, M. 1996. Critères de caractérisation de quelques cultivars des palmiers dattiers (*Phoenix dactylifera* L.) du sud tunisien. *Annale De l'INRAT*, 69, 73-87.

Bvochora, J.M., Read, J.S., Zvauya, R. 2000. Application of very high gravity technology to the cofermentation of sweet stem sorghum juice and sorghum grain. *Industrial Crops Products*, 11, 11-17.

Boufis, N., Khelifi-Slaoui, M., Djillali, Z, Zaoui, D., Morsli, A., Bernards, M.A., Makhzum., Khelifi. L. 2014. Effects of growth regulators and types of culture media on somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida). *Scientia Horticulturae*, 172, 135-142.

Bubrová, M., Zemanci, K.J, Sychrová, H. 2014. Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses. *Yeast*, 31(8), 309-321.

Cabal, M.M.C., Gatignol, C. 2005. La definition et les implications du concept de voiture propre. *Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques*.

Cance, S., Widdowson, M.C. 1993. Chemical composition of foods. *Food research*, 204, 144-152.

Canetta, E., Adya, A.K., Walker, G.M. 2006. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. *FEMS Microbiology Letters*, 255, 308-319.

Chae, H.J; Joo, H; In, M.J.2001. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part I: Effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource. Technology*, 76, 253-258.

- Chaira, N., Ferchichi, A., Mrabet, A., Sghairooun, M. 2007.** Characterisation of date juices extracted from the rest of sorting of Deglet-Nour Variety. *Biotechnology*, 6, 251-256.
- Chambers, C., Exaudi-Larse, K., Price, W. 1996.** Aqueous extraction of solutes from oranges : a kinetic study. *Food Chemistry*, 57 (4), 483-486.
- Chang, H.N., Yoo, I.K., Kim, B.S. 1994.** High density cell culture by membrane based cell recycle. *Biotechnology Advances*. 12, 467- 487.
- 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, 1047-1052.
- Chniti, S., Djelal, H., Hassouna, H., Amrane, A. 2014.** Residue of dates from the food industry as a new cheap feedstock for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 69, 66-70.
- Codex STAN 247. 2005.** Norme générale Codex pour les jus et les nectars de fruits.
- Coutinho, J.A.P., Belo, I., Ferreira, E.C., Coelho, M.A.Z. 2005.** Assessment of yeast viability under hyperbaric conditions through a modeling approach. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 872-877.
- Cot, M., Loret, M.O., François, M., Benbadis, L. 2007.** Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Research*, 7, 22-32.
- Csonka, L.N., Hanson, A.D. 1991.** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology*, 45, 569-606.
- Daayf, F., Adam, L., Fernando, W.G.D. 2003.** Comparative screening of bacteria for biological control of potato late blight (strain US-8), using in-vitro, detached-leaves, and whole plant testing systems. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25, 276-284.
- Dakal, T.C., Solieri, L., Guidici, 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.

Dasari, G., Worth, M.A., Connor, M.A., Pamment, N.B. 1990. Reasons for the apparent difference in the effects of produced and added ethanol on culture viability during rapid fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 109-122.

Das Neves, M.A., 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.

Davati, N., Hamidi, E.Z., Shoja A.S. 2007. A study on producing possibility of amino acids from date palm wastes by two mutant *Corynebacterium glutamicum* cect690 & cect77. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 4, 55–64.

Deardorff, D.L. 1980. Osmotic strength, osmolality and osmolarity. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 37, 504-509.

Deb, P., Talukadar, S.A., Mohsina, K., Sarker, P.K., Sayem SM.A. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P001. *Springerplus*, 2(154), 1-12.

Debnam, E.S. 2005. Osmolarity and portioning of fluids. *Basic Science. Surgery*, 23(6), 190-194.

Debs-Louka, E., Louka, N., Abraham, G., Chabot, V. Allaf, K. 1999. Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability. *Applied and. Environmental. Microbiology*, 65(2), 626-631.

Demirbas, A. 2007. Progress and recent trends in biofuels. *Progress in energy and combustion science*, 33, 1-18

Deutscher, J., Galinier, A., Martin Verstraete, I. 2002. Carbohydrate uptake and metabolism. In *Bacillus subtilis and its closest relatives: from Genes to cell*, 129-150. Edited by Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. Washinton, DC: American Society for Microbiology Press.

Dhaliwal, S.S., Oberoi, H.S., Sandhu, S.K., Nanda, D., Kumar, D., Uppal, S.K. 2011. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly

isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. *Bioresource Technology*, 102(10), 5968–5975.

Diorisio, G.A., Keiko, T.N. 2009. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. *Crop production*, 28, 236-242.

Djelal, H., Larher, F., Martin, G., Amrane, A. 2012a. Continuous Culture for the Bioproduction of Glycerol and Ethanol by *Hansenula anomala* Growing Under Salt Stress Conditions, *Annals of Microbiology*, 62(1), 49 - 54.

Djelal, H., Larher, F., Martin, G., Amrane, A. 2012b. Impact of an osmotic stress on the intracellular volume of *Hansenula anomala*. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1345-1351.

Djelal H, Amrane A, Larher F, Martin G. 2006. Effect of dissolved oxygen on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing under salt conditions. *Journal of Biotechnology*, 125(1), 95-103.

Djelal, H., Amrane, A., Larher, 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.

Djerbi M. 1994. Précis de la phoeniciculture.:FAO, Rome, Italie, 191 p.

Dombek, K.M., Ingram, L.O. 1986. Determination of the intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(1), 197- 200.

Dowson et Aten, 1963. Composition et maturation, récolte et conditionnement des dattes, collection F.A.O. Rome, 397 p.

Dragone, G., Silva, D.P., Almeida e Silva J.B. 2004. Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing. *LWT Food science and Technology*, 37(7), 797-802.

Drancourt, M., Berger, P., Raoult, D. 2004. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 2197-2202.

Dromigny, T. 2008. Monographie de microbiologie: *Bacillus subtilis*. Edition Lavoisier. Paris.

Dürre, P. 2007. Biobutanol: An attractive biofuel. *Biotechnology Journal*, 2, 1525-1534.

Eiadpum, A., Limtong, S., Phisalaphong, M. 2012. High-temperature ethanol fermentation by immobilized coculture of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(3), 325–329.

Elarem, A.G., Flamini, G., Emna, B.S., Issaoui, M., Zeyene, N., Ferchichi, A., Hammami, M., Helal Ahmed, N., Achour, L. 2011. Chemical and aroma volatile compositions of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits at three maturation stages. *Food Chemistry*, 127, 1744-1754.

Elleuch, M., Besbes, S., Roiseaux, O., Blecker, C., Deroanne, C., Drira, N., and Attia, H. 2008. Date flesh : Chemical composition and characteristics of the dietary fibre. *Food Chemistry*, 111, 676-682.

Elsanhoty, R.M., Al-Turki, I.A., Ramadan, M.F. 2012. Screening of medium components by Plackett–Burman design for carotenoid production using date (*Phoenix dactylifera*) wastes. *Industrial Crops and Products*, 36, 313–320.

El-Sharnouby, G.A., Al-Eid, S.M., Al-Otaibi, M.M. 2009. Utilisation of enzymes in the production of liquid sugar dates. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(3), 41-47.

Escobar, J.M., Rane, K.D., Cheryan, M. 2001. Ethanol production in a membrane bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91, 283- 295.

Espiard, E. 2002. Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc Lavoisier, 147-155.

Estanove, P. 1990. Note technique :Valorisation de la datte. Option Méditerranéennes. Série A, N°11. Les systèmes Agricoles Oasiens. Ed IRFA-CIRAD, France.

Fadel, M., Keera, A.A., Mouafi, F.E., Kahil, T. 2013. High level ethanol from sugar cane Molasses by a new thermotolérant *Saccharomyces* strain in industrial scale. *Biotechnology Research International*, 2013, 1-6.

FAOSTAT. 2014. Disponible sur le site : <http://www.faostat.fao.org/>.

- Ferreira, B.S., Cecilia, R.C., van Keulen, F., Cabral, M.S. 2004.** Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain triggers acetate production to fuel biosynthetic pathways. *Journal of biotechnology*, 109, 159-167.
- Fröhlich, K.U., Madeo, F. 2001.** Apoptosis in yeast: a new model for aging research. *Experimental Gerontology*, 37, 27-31.
- Ferreira, M.M., Loureiro-Dias, M.C., Loureiro, V. 1997.** Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 36(3), 145-53.
- Fullerton, G.D., Kanal, K.M., Cameron, I.L. 2006.** On the osmotically unresponsive water compartement in celles. *Cell biology International*, 30, 74-77.
- Furukawa, K., Gitano, H., Mizoguchi, H., Hara, S. 2004.** Effect of cellular inositol content on etanol tolerante of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. *Journal of bioscience and bioengineering*, 98(2), 107-113.
- Fullerton, G.D., Kanaln K.M., Cameron, I.L. 2006.** On the osmotically unresponsive water compartment in cells. *Cell Biology International*, 30, 74-77.
- Gancedo, J.M. 1998.** Yeast Carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(2), 334-361.
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., van Impe, J.F., Devlieghere, F. 2007.** High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 1-28.
- Geertman, A.J., Van Maris, J.A., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T. 2006.** ‘Physiological and Genetic Engineering of Cytosolic Redox Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Glycerol Production. *Metabolic Engineering*, 8(6), 532 - 542.
- Gervais, P., Beney, L. 2001.** Osmotic mass transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and Molecular Biological*, 47, 831-839.

Giannattasio, S., Guaragnella, N., Corte-Real, M., Passarella, S., Marra, E. 2005. Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acedic acid- induced programmed cell death. *Gene*, 354, 93-98.

Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P.R., C.D. Powell, C.D., Smart, K.A. 2007. Yeast Responses to Stresses Associated with Industrial Brewery Handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(5), 535 - 569.

GID . 2014. Groupement Interprofessionnel des dates. Résumé du vingt troisième rapport annuel .pp3.

Gourlay, C., Du, W., Ayscouhg, K.R. 2006. Apoptosis in yeast mechanisms and benefits to a unicellular organism. *Molecular Microbiology*, 62, 1515-1521.

Gupta, N., Kushwaha, H. 2011. Date palm as a source of bioethanol producing mcroorganisms. In: Shri Mohan Jain, Al-Khayri, Jameel M., Johnson Dennis V., editors. Date Palm Biotechnology. Springer; Netherlands, 711–727.

Granik, V.T., Smith, B.R., Lee, S.C., Ferrari, M. 2002. Osmotic pressures for binary solutions of non-electrolytes. *Biomedical Microdevices*, 44, 309-321.

Graumlich, T.R., Stevenson, K.E. Fonseca, L.P. 1979. Respiration and viability of thermally injured *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(3), 461-465.

Gryta, M., Morawski, A., Tomaszewska, M. 2000. Ethanol production in membrane distillation bioreactor. *Catalysis today*, 38(3),159-165.

Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J.M., Blondir, B. 2007. Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Mutated HXT3 allele entrances fructose fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2432-2439.

Guillouet, S., Engasser, J.M. 1995. Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline up stock. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(2), 315-320.

Henson, M.A. 2003. Dynamic modeling and control of yeast cell populations in continuous biochemical reactors. *Computers and Chemical Engineering*, 27, 1185-1199.

Henschke, P.A., Jiranck, V. 1993. Yeast- metabolism of nitrogen compounds. In: Fleet, G.H. ed. Wine microbiology and biotechnology. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 77-164.

Hohmann, S. 2002. ‘Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 300-372.

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, 34-44.

Hou, L., Cao, X., Wang, C., Lu, M. 2009. Effect of overexpression of transcription factors on the fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains. *Letters in Applied Microbiological*, 49 (1), 14-19.

Hu, X.H., Wang, M.H., Tan, T., Li J.R., Yang, H., Leach, L., Zhang, R.M., Luo, Z.W. 2006. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics Society of America*, 175, 1479-1487.

Imai, T., Ohno, T. 1995. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3604-3608.

Inatsu, Y., Nakamura, N., Yuriko, Y., Fushimi, T., Watanasiritum, L., Kawamoto, S. 2006. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thya nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 237-242.

Jakubowski, W., Bilinski, T., Bartosz, G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(5), 659-664.

Janda, J.M., Abbott, S.L. 2007. 16s rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2761-2764.

Jeihanipour, A., Taherzadeh, M.J. 2009. Ethanol production from cotton-based waste textiles. *Bioresource Technology*, 100, 1007-1010.

Jeyaram, K., Romi, W., Singh, T.A., Adewumi, G.A., Basanti, K., Oguntinyinbo, F.A. 2011. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance. *Journal Microbiol Methods*, 87, 161-164.

Jones, R.P., Greenfield, P.F. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 3, 249-257.

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.

Jorgensen, H. 2009. Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153, 44-57.

Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A. 1990. Nitrogen requirements of yeast during wine fermentation. Proceedings of 7th Australian Wine Industry Technical Conference (Adelaide, 1989), pp 166-171. Williams, P.J., Davidson, D.M., Lee, T.H. Editors, Australian Industrial Publishers, S.A., Adelaide, Australia.

Kaidi, F., Touzi, A. 2001. Production de bioalcool à partir des déchets de dattes. **Revue des énergies renouvelables: Production et valorization- Biomasse**, 75-78.

Käpelli, O. 1986. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeast. *Advances in Microbial Physiology*, 28, 181-209.

Karasu, S., Özbas, Z. Y. 2004. Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. *Process Biochemistry*, 39, 1285-1291.

Kargupta, K., Datta, S., Sanyal, K. 1998. Analysis of the performances of a continuous membrane bioreactor with cell recycling during ethanol fermentation. *Biochemical engineering Journal*, 1, 31-37.

Kasemets, K., Kahru, A., Laht, T. M., Paalme, T. 2006. Study of the toxic effect of short- and medium- chain monocarboxylic acids on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* using the CO₂ auxo acetostat fermentation system. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 206-215.

Khan, J.A., Abulnaja, K.O., Kumosani, T.A., Abou-Zeid, A.A. 1995. Utilization of Saudi dates sugars in production of baker's yeast. *Bioresource Technology*, 53, 63–66.

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, 2935- 2942.

Knorre, D.A., Smirnova, E.A., Severin, F.F. 2005. Natural conditions inducing programmed cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 70, 323-326.

Kopell, W.N., Westhead, E.W. 1982. Osmotic pressures of solutions of ATP and Catecholamines relating to storage in Chromaffin Granules. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5707-5710.

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A. 2004.

Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21, 377-397.

Kuila, A., Singh, A., Mukhopadhyay, M., Banerjee, R. 2011. Process optimization for aqueous extraction of reducing sugar from cashew apple bagasse: A potential, low cost substrate. *LWT- Food Science and Technology*, 411, 62-66.

Kunkee, R.E., Ough, C.S. 1966. Multiplication and fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* under carbon dioxide pressure in wine. *Applied Microbiology*, 14(4), 643-648.

Lacroix, C., Yildirim, S. 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 176-183.

Lafforgue, C., Delorme, P., Goma, G. 1994. Continuous alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* recycle by tangential filtration: key points for process modelling. *Biotechnology letters*, 16(7), 741-746.

Laffrogue, C., Malinowski, J., Goma, G. 1987. High yeast concentration in continuous fermentation with cell recycle obtained by tangential microfiltration. *Biotechnology letters*, 9, 347-352.

Laluce, C., Souza, C.S., Abud, C.L., Gattas, E.A.L., Walker, G.M. 2002. Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast cell

recycling at elevated temperatures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29, 140-154.

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, 4176-4182.

Laroche, C., Simonin, H., Beney, L., Gervais, P. 2005. Phase transitions as a function of osmotic pressure in *Saccharomyces cerevisiae* whole cells, membrane extracts and phospholipid mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1669, 8-16.

Laroche, C., Gervais, P. 2003. Achievement of rapid osmotic dehydration at specific temperatures could maintain high *Saccharomyces cerevisiae* viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 743-747.

Larsen, N., Thorsen, L., Kpikpi, N.M., Stuer-Lauridsen, B., Cantor, B., Brockmann, E., Derkx, P.M., Jespersen, L. 2014. Characterization of *Bacillus* spp. Strains for use as probiotic additives in pig food. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1105-1118.

Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J., Jung, K.S. 2008. Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209-228.

Lee, C.W., Chang, H.N. 1987. Kinetics of ethanol fermentations in membrane cell recycle fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(2), 1105-1112.

Lei, J., Zhao, X., Ge, X., Bai, F. 2007. Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution. *Journal of Biotechnology*, 131, 270-275.

Lei, F., Rotboll, M., Jorgensen, S.B. 2001. A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 88, 205-221.

Li, Y., Wang, M. Y., Fan, X. S., Qi, X., Chen, Y., Zhang, H. A., Zhao, Q. C. 2009. Effect of San-ao Decoction, a traditional Chinese prescription, on IL-4 treated normal human bronchial epithelium. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 104-109.

- Liang, L., Y.-P. Zhang, Y.P., Zhang, L., Zhu, M.J., Liang, S.Z., Huang, Y.N.** 2008. Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(12), 1605-1613.
- Logan, N.A., De Vos, P.** 2009. In: Genus I. *Bacillus*; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes, De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H. and Whitman, W.B. Eds (éd.), New York: Springer, 21-127.
- Louhichi, B., Belgaib, J., Benamor, H., Hajji, N.** 2013. Production of bioethanol from three varieties of dates. *Renawable Energy*, 51, 170-174.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M., Hohmann, S.** 1995. Fsp1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *The EMBO Journal*, 14, 1360-1371.
- 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.
- Leybros, J., Fremeaux, P.** 1990. Extraction solide-liquide - Aspects théoriques. *Techniques de l'Ingénieur (traité Génie des procédés)*, J 2780.
- Leandro, M.J., Sychrovà, H., Prista, C., Loureiro-Dias, M.C.** 2011. The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasma-membrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. *Microbiology*, 157, 601-608.
- Leandro, M.J., Sychrovà, H., Prista, C., Loureiro-Dias, M.C.** 2013. ZrFsy1, a High-Affinity Fructose/H⁺ Symporter from Fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Plos one*, 8(7), 1-10.
- Lebeau, T., Jouenne, T., Junter, G.A.** 1998. Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida Shehatae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 309-313.

Letti, L.A.J., Karp, S.G., Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R. 2012. Ethanol production from soybean molasses by *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*, 44, 80-86.

Limtong, S., Sringiew, C., Yongmanitchai, W. 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolate *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, vol. 98, 3367- 3374.

Lina-Costa, M.E., Taveres, C., Rasposo, S., Rodrigues, B., Peinado, J.M. 2012. Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carop pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and Fed batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 789-797.

Lipke, N.P., Ovalle, R. 1998. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Journal of Bacteriology*, 180, 5, 3735.

Liu, S. 2013. Bioprocess Engineering. Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design. Elsevier. 1st Edition, Kidlington, Oxford, UK.

Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M.T., Barrientos, A., Corte-Real, M. 2002. Cytochrome c release and mitochondria involvement un programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 2598-2606.

Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M., Hohmann, S. 1995. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *The EMBO Journal*, 14, 1360-1371.

Madslie, E.H., Olsen, J.S., Granum, P.E., Blatny, J.M. 2012. Genotyping of *B.licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme. *BMC Microbiology*, 12, 230-237.

Mager, W.H., Siderius, M. 2002. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS yeast research*, 2, 251-257.

Mahjoub, A., Jraidi, Z. 1992. Elaboration d'une boisson gazeuse et d'une confiture aromatisée à partir de deux variétés de dattes. *INAT*, 7, 37-44.

- Mann, L.T. 1963.** Spectrophotometric Determination of Nitrogen in Total Micro-Kjeldhal Digests. Application of the Phenol-Hypochlorite Reaction to Microgram Amounts to Ammonia in a Total Digest of Biological Material. *Analytical Chemistry*, 35(13), 2179-2182.
- Marechal, P.A., Martinez, I., 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 and technology*, 10, 15-20.
- Marechal, P.A., Martinez, I., Molin, P., Gervais, P. 1995.** Yeast cell responses to water potential variations. *International Journal food microbiology*, 28, 277-287.
- Martin-Yken, H., Lagorce, A., François, J. 2003.** The yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: Molecular architecture regulatory pathways, remodelling mechanism in response to environmental conditions and biotechnological values. <http://prodinra.inra.fr/record/71393>.
- Mrabet, A., Ferchihi, A., Chaira, N., Ben Salah, M., Baaziz, M., Penny. 2008.** Physico-chemical characteristics and total quality of date palm varieties grown in the southern of Tunisia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(7), 1003-1008.
- Martini, S., Ricci, M., Bonechi, C., Trabalzini, L., Santucci, A., Rossi, C. 2004.** In vivo ¹³CNMR and modeling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 564, 63 – 68.
- Meligi, M.A., Sourial, G.F. 1982.** Fruit quality and general evaluation of some Iraqi date palm cultivars grown under conditions of barrage region. Ed: First symposium on the date palm, Saudi-Arabia, 23-25 March, 212-220.
- Mercier-Bonin, M., Daubert, I., Léonard, D., Maranges, C., Fonade, C., Lafforgue, C. 2001.** How unsteady filtration conditions can improve the process efficiency during cell cultures in membrane bioreactors. *Separation and Purification Technology*, 22, 601-615.
- Moons, P., Michiels, C.W., Aertsen, A. 2009.** Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35, 157-168.

- Mostafa, Y.S., Alumri, S.A. 2012.** Optimization of date syrup for enhancement of the production of citric acid using immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Saudi Journal of Biological sciences*, 19(2), 241-246.
- Munier, P. 1973.** Le palmier dattier. G-P Maisonneuve et Larose, Paris. ISBN 2-7068-0563-3, 141- 150.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. 1995.** Bacillus. In:Manual of Clinical Microbiology. ASM, 8, 349-356.
- Nakamura, L.K. 1989.** Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 295-300.
- Nasehi, S.M., Ansari, S. 2012.** Removal of dark colored compounds from date syrup using activated carbon: A Kinetic study. *Journal of food Engineering*, 111(3), 490-495.
- Nevoigt, E., Stahl, U. 1997.** Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology reviews*, 21, 231-241.
- Ni, Y., Sun, Z. 2009.** Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in china. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(3), 415-423.
- Nielsen, J., Villadsen, J. 2003.** Bioreaction engineering principles. Kluwer academic/Plenum publishers, New York.
- OCDEstat. 2013.** Organisation de cooperation et de développement économiques. <http://stats.oecd.org>.
- Olivera, R., Layes, F., Silva-Garça, M., Lucas, C. 2003.** Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*. Artifacts and re-definitions. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1613, (1-2), 57-71.
- Oliveira, S.C., Paiva, T.C.B., Visconti, A.Z.S., Giudici, R. 1999.** Continuous alcoholic fermentation process: model considering loss of cell viability, *Bioprocess Engineering*, 20, 157- 160.

- Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. 2008.** A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks, *Biotechnology Biofuels*, 1, 1-14.
- Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., Voß, I., Steinbüchel, A. 2001.** Optimization of cell growth and poly (3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters*, 23, 1119–1123.
- Omori, T., Ogawa, K., Umemoto, Y., Yuki, Y., Yhajaira, Y., Shimoda, M., Wada, H. 1996.** Enhancement of glycerol production by brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with heat-shock treatment. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 187-190.
- Paiva, T.B.C., Sato, S., Visconti, A.E.S., Castro, L.A.B. 1996.** Continuous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57(58), 535–541.
- Pampulha, M.E., Loureiro-Dias, M.C. 2000.** Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 184, 69-72.
- Pandey, A., Lee, D.J., Chisti, Y., Soccol, C.R. 2014.** Biofuels from algae. 1st Edition, San Diego, USA.
- Parrou, J. L., Teste M. A. & François M. 1997.** Effect of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*, 143, 1891-1900.
- Park, J.K., Jin, Y.B., Chang, Z.N. 1999.** Reusable biosorbents in capsules from *Zooglea ramigera* cells for cadmium removal. *Biotechnology and Bioengineering*, 63,116–121
- Patle, S., Lal, B. 2008.** Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*, 32, 596-602.
- Perez, M., Luyten, K., Michel, R., Riou, C., Blondin, B. 2005.** Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation : both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Research*, 5, 351-361.

Perez-García, A., Romero, D., de Vicente, A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 187-193.

Petelenz-Kurdziel, E., Kuehn, C., Nordlander, B., Klein, D., Hong, K.K., Jacobson, T., Dahl, P., Schaber, J., Nielsen, J., Hohmann, S., Klipp, E. 2013. Quantitative Analysis of glycerol accumulation glycolysis and growth under hyper osmotic stress. *PloS Computational Biology*, 9(6), e1003084.

Petrov, V., Okorokov, L. 1990. Increase if the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its deenergization. *Yeast*, 6, 311-318.

Petrovska, B., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S. 1999. Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(8), 695-699.

Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., Hogg, T. 2004. Ethanol tolerance of five *non-Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. *Food Microbiology*, 21, 439-447.

Plourde-Owobi, L., Durner, S., Goma, G., François, J. 2000. Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae* : phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. *International journal of food microbiology*, 55, 33-40.

Postma, E., Verduyn, W., Scheffers, A., Van Dijken, J. 1989. Enzymatic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(2), 468-477.

Prashant, M., Rajendra, P. 1989. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30, 294-298.

Pratt, P.T., Bryce, P.H., Stewart, G.G. 2003. The effect of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *Journal of Institue of Brewing*, 109 (3), 218-228.

- 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 and Biotechnology*, 38, 1133-1144.
- Qureshi, N., Ezeji, T.C. 2008.** Butanol, a superior biofuel production from agricultural residues (renewable biomass): Recent progress in technology. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 2(4), 319-330.
- Qureshi, N., Saha, B.C., Cotta, M.A.C. 2008.** Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part II- Fed-batch fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 32(2), 176-183.
- Radwan, H.H., Alanazi, F.K., Taha, E.I., Dardir, H.A., Moussa, I.M., Alsarra, I.A. 2010.** Development of a new medium containing date syrup for production of bleomycin by *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003 using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 9, 5450–5459.
- Rendueles, O., Ghigo, J. 2012.** Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 972-989.
- Reynes, M., Bouabidi, H., Piombo, G., Risterucci, A.M. 1994.** Caractérisation des principales variétés des dattes cultivées dans la région du Djerid en Tunisie. *Fruits*, 49(4), 289-298.
- Rhouma, M. 1995.** Le palmier dattier en Tunisie : Un secteur en pleine expansion. CIHEAM - Options Méditerranéennes.
- Riedacker, A., Dreyer, E., Pafadnam, C., Joly, H., Bory, G. 1991.** Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Séminaire, Paris, FRA (1990-03-02) Nancy, Paris, FRA (1990-03-20). Paris, FRA : John Libbey. <http://prodinra.inra.fr/record/100671>.
- Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H., Martinotti, M.G. 2009.** Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 541-553.

RoeTech. 2014. CASE STUDY: Treatment of Municipal Wastewater Treatment Plant for Hydrogen Sulfide Control with RoeTech 106 Bacteria Culture. RoeTech, 2014, 1.

Roehr, M. 2001. The Biotechnology of ethanol: classical and future applications. Wiley-Vch. Federal republic of Germany.

Rooney, A.P., Price, N.P.J., Ehrhardt, C., Sewzey, J.L., Bannan, J.D. 2009. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 59, 2429-2436.

Roufegari-Najad, L. 2002. The examination of colored compounds in date syrup and their elimination. Master degree thesis. Food Sciences and Technology Department , Faculty of agricultures, Tabriz, Iran.

Roukas, T. 1994. Ethanol production from nonsterilized carbon pod extract by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. *Biotechnonogy and Bioengineering*, 43(3), 189-194.

Rozes, N., Garcia-Jares, C., Larue, F., Lonvaud-Funel, A. 1992. Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *Journal of Science of Food and. Agriculture*, 59, 351-357.

Ryu, D.D., Kim, Y.J., Kim, J.H. 1984. Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentation system. *Biotechnonogy and Bioengineering*, 26(1), 12-16.

Sadae, T.M., Batista, B.J. 2003. Effect of the presence of inicial etanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 242-254.

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.

Saha, K., Maitry, S., Roy, S., Pahan, K., Pathak, R., Majumdar, S., Gupta, S. 2014. Optimization of amylase production from *B. amyloliquefaciens* (MTCC1270) using solid state fermentation. *International Journal of Microbiology*, 24, 1-7.

Sajbidor, J., Ciesarova, Z., Smogrovicova, D. 1995. Influences of ethanol on the lipid content and fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 40, 508-510.

Salah, R.B., Chaari, K., Besbes, S., Ktari, N., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. 2010. Optimisation of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera* L.) juice by-products using response surface methodology. *Food Chemistry*, 121, 627–633.

Salah, R.B., Jaouadi, B., Bouaziz, A., Chaari, K., Blecker, C., Derrouane, C., Attia, H., Besbes, S. 2011. Fermentation of date palm juice by curdlan gum production from *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466TM: purification, rheological and physico-chemical characterization. *LWT–Food Science and Technology*, 44, 1026–1034.

Samokhvalov, V., Ignatov, V., Kondrashova, M. 2004. Reserve carbohydrates maintain the viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells during chronological aging. *Mechanisms of ageing and development*, 125, 229 – 235.

Sanchez, O.J., Cardona, C.A. 2007. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Biorecourse Technology*, 99(13), 5270-5295.

Salmon, J.M. 1998. Relations levure- milieu, *In* : OEnologie - fondements scientifiques et technologiques, pp. 415-444, ed. FLANZY C., Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, France.

Sawaya, W.N., Khatchadourian, H.A., Khalil, J.K., Safi, W.M., Al-Shalhat, A. 1983. Growth and Compositional Charges During the Various Developpemental Stages of Some Saudi Arabian Date Cultivars. *Journal of Food Science*, 47, 1489-1497.

Schügerl, K. 2000. Integrated processing of biotechnology products. *Biotechnology advances*, 18, 581-599.

Shafiei, M., Karimi, K., Taherzadeh, M.J. 2010. Palm date fibers: Analysis and Enzymatic hydrolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), 4285-4296.

Shahravy, A., Tabandeh, F., Bambai, B., Zamanizadeh, H.R., Mizani, M. 2012. Optimization of probiotic *Lactobacillus casei* ATCC 334 production using date powder as carbon source. *Industrial Chemistry and Chemical Engineering*, 18, 273–282.

Smith, T.C., Kindred, D.R., Brosnan, J.M., Weightman, R.M., Shepherd, M., Sylvester-Bradley, R. 2006. Wheat as a feedstock for alcohol production. HGCA. London. 61, 49 p.

Sigler, K., Knotkova, A., Kotyk, A. 1981. Factor governing substrate induced generation and extrusion of proton in yeast. *Biochimica and Biophysica Acta*, 643, 572-582

Singh, S., Moholkar, V.S., Goyal, A. 2013. Isolation, Identification, and Characterization of cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain SS35 from Rhinoceros Dung. *ISRN Microbiology*, 10, 1-7.

Siqueira, P.F., Karp, S.G., Carvalho, J.C., Sturm, W., Rodríguez-León, J. A., Tholozan J.-L. Singhania, R.R., Pandey, A., Soccol, C.R. 2008. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource and Technology*, 99, 8156–8163.

Sonnleitner, B. 1998. Dynamic adaptation of microbes. *Journal of Biotechnology*, 65, 47-60.

Sousa-Dias, S., Gonçalves, T., Leyva, J. S., Peinado, J. M. & Loureiro-Dias, M. C. 1996. Kinetics and regulation of fructose and glucose transport systems are responsible for fructophily in *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, 142, 1733–1738.

Steinmetz, M. 1993. Carbohydrate Catabolism: Pathways, Enzymes, Genetic regulation and Evolution, 157-170. In, Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (ed). *Bacillus subtilis and other Gram-Positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Suarit, R., Gopal, P.K., Sherped, M.G. 1988. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, 134, 2359-2368.

Sun, Y.S., Wang, J.H., Gu, S.B., Liu, Z.B., Zhang, Y.J., Zhang, X.X. 2010.

Simultaneous Determination of Flavonoids in Different Parts of Citrus reticulata 'Chachi' Fruit by High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection. *Molecules*, 15(8), 5378-5388.

Sun, Z., Lu, G., Li, S., Xie, Y., Yu, W., Ma, X. 2007. Probing the role of microenvironment for microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Journal of Biotechnology*, 128, 150-161.

Stewart, L., Lambert, D.M. 2011. Spatial heterogeneity of factors determining ethanol production site selection in the U.S., 2000-2007. *Biomass and Bioenergy*, 35(3): 1273-1285.

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. *Journal of Microbiology*, 45, 472-479.

Tamas, M, J., Luyten, K., Sutherland, F.C.W., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B.A., Kilian, S.G., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, J.M., Hohmann, S. 1999. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Molecular Microbiology*, 31(4):1087-1104

Tagaki, H., Takaoka, M., Kawaguchi, A., Kubo, Y. 2005. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*, 71 (22), 8656-8662.

Taherzadeh, M.J., Adler, L., Liden, G. 2002. ‘Strategies for Enhancing Fermentative Production of Glycerol. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1), 53-66.

Takaya, M., Matsumoto, N., Yanase, H. 2002. Characterization of membrane bioreactor for Dry Wine production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(2), 240-244.

Tamás, M.J., Karlgren, S., Bill, R.M., Hedfalk, K., Allegri, L., Ferreira, M., Thevelein, J.M., Rydstrom, J., Mullins, J.G., Hohmann, S. 2003. A short regulatory domain restricts glycerol transport through yeast Fps1o. *J Biol Chem*, 278, 6337-6345.

Tavakkoli, M., Hamidi-Esfahani, Z., Azizi, M.H. 2012. Optimization of *Corynebacterium glutamicum* glutamic acid production by response surface methodology. *Food Bioprocess Technology*, 5, 92–99.

Taillandier, P., Ramon-Portugal, F., Fuster, A., Strehaiano, P. 2007. Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology*, 24(1), 95-100.

- Thomas, G.C., Krioukov, V.G., Vielmo, H.A. 2005.** Simulation of vegetable oil extraction in counter-current crossed flows using the artificial neural network. *Chemical Engineering and Processing*, 44, 581-592.
- Thomas, K.C., Inglewed, W.M. 1992.** Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHC) wheat mash. *Journal of Microbiology*, 10, 61-68.
- Toriga, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillarron, J.M. 2003.** Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation : study of their buffering capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 916-922.
- Toutain G. 1977.** Eléments d'Agronomie saharienne : de la recherche au développement. Imprimerie Jouve, Paris, France, 276 pp
- Van Dijken, J.P., Weusthuis, R.A., Pronk, J.T. 1993.** Kinetics of growth and sugar consumption in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63, 343-352.
- Van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., Konings, W.N. 1995.** The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiological Reviews*, 59(2), 304-322.
- Vasconcelos, J.N., Lopes, C., França, F.P. 2004.** Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(3), 357-365.
- Voit, E.O. 2003.** Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 223, 55-78.
- Vinet, B. 2003.** Contribution des alcools à l'écart osmotique du serum. *Annales de Biologie Clinique de Québec*, 40(3), 21-23.
- Wang, D.I., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A., Lilly, M. 1979.** Fermentation and enzyme technology. Wiley interscience publication, New York.
- 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, 233-236.

- Wang, H.Y., Qian, H., Yao, W.R. 2001.** Melanoidins produced by the Maillard reaction structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128(3), 573-584.
- Wang, M., Zhao, J., Yang, Z., Du, Z., Yang, Z. 2007.** Electrochemical insights into the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*, 71, 107-112.
- Wang, Z.X., Zhuge, J., Fang, H., Prior, B.A. 2001.** Glycerol production by microbial fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 19, 201-223.
- Ward, O.P. 1989.** Fermentation biotechnology, principles, processes and products. Prentice Hal, New Jersey, USA.
- Warren, R.K., Hill, G.A., MacDonald, D.G., 1994.** Continuous cell recycle fermentation to produce ethanol. *Food and bioproducts processing*, 72(3), 149 – 157.
- Watanabe, M., Tamura, K., Magbanua, J.P., Takano, K., Kitamoto, K., Kitagaki, H., Akao, T., Shimoi, H. 2007.** Elevated expression of genes under the control of stress response element (STRE) ad Msn2p in an Ethanol- tolerance sake yeast kyokai No. 11. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(3), 163-170.
- Watson, K., Rose, A.H. 1980.** Fatty-acyl composition of the lipids of *Saccharomyces cerevisiae* grow aerobically or anaerobically in media containing different fatty acids. *Journal of General Microbiology*, 117, 225-233.
- Wei, P., Li, Z., lin, Y., He, P., Jiang, N. 2007.** Improvement of the multiple-stress tolerance of an ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* strain by freeze-thaw. treatment. *Biotechnology Letters*, 29(10), 1501-1508.
- Weil, J.H. 2001.** Biochimie générale. Ed. Dunod, n°9, Paris : 197 – 199.
- Wendhausen, R., Fregonesi, A., Moran, P.J., Joekes, I., Rodriques, J.A., Tonella, E., Althoff, K. 2001.** Continuous fermentation of sugar cane syrup using immobilized yeast cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1), 48–52.
- Wicherham, L.J. 1951.** Taxonomy of Yeasts, Technical Bulletin N°1029, United States, Department of Agriculture, Washington D.C.

Winter, J.F., Loret, M.O., Uribe Larrea, J.L. 1989. Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Microbiology*, 18, 247-252.

Wojda, I., Alonso-Monge, R., Bebelman, J.P., Mager, W.H., Siderius, M. 2003. Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways. *Microbiology*, 149, 1193-1204.

Won, J.I., Yang, Y.L., Kim, B.G., Choi, C.Y. 1993. Adaptive control of specific growth rate based on proton production in anaerobic fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 15 (5), 511-516

Wongkittipong, R., Prat, L., Damronglerd, S., Gourdon, C. 2004. Solidliquid extraction of andrographolide from plants experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology*, 4, 147-154.

Wood, J.M. 1999. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 230–262.

Wümpelmann, M., Kjaergaard, L., Joergensen, B.B. 1984. Ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae* under aerobic conditions at different potassium concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(4), 301-307.

Yokozeki, A. 2006. Osmotic pressures studied using a simple equation-of-state and its applications. *Applied Energy*, 83, 15-41.

ANNEXES

LISTE DES TRAVAUX ET PUBLICATIONS

Articles soumis dans un journal scientifique international :

- 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.
- CHNITI, S., DJELAL, H., BENTAHAR, I., HASSOUNA, M., AMRANE, A. 2014. Optimisation de l'extraction des jus de sous-produits de dates (*Phoenix dactylifera* L.) et valorisation par production de bioéthanol. *Revue des Energies Renouvelables*, 17(4), 529-540.

Article en cours de rédaction pour soumission dans un journal scientifique international :

- CHNITI S., CHAABENE H., LELIEVRE Y., AMRANE A., HASSOUNA M., DJELAL H., Effect of nitrogen source on bioethanol production from Syrup dates by using *Saccharomyces cerevisiae*.

Articles soumis dans un Congrès scientifique international :

- CHNITI S., DJELAL H., HASSOUNA M., AMRANE A., Production de bioéthanol et valorisation de déchets de dattes par des levures. *Récents Progrès en Génie des Procédés, Numéro 104 - 2013 ISSN: 1775-335X ; ISBN: 978-2-910239-78-7, Ed. SFGP, Paris, France*

COMMUNICATION ORALE AVEC ACTE DANS UN CONGRES INTERNATIONAL

- CHNITI, S., DJELAL, H., BENTAHAR, I., HASSOUNA, M., AMRANE, A. 2014. Optimisation de l'extraction des jus de sous-produits de dates (*Phoenix dactylifera* L.) et valorisation par production de bioéthanol, *conférence Internationale des Energies Renouvelables, CIER'13*, Sousse, Tunisie.
- CHNITI S., AMRANE A., LELIEVRE Y., CHAABANE H., HASSOUNA M., DJELAL H. 2012. Valorisation de déchets de dattes tunisiennes : production de bioéthanol, *2^{ème} Colloque International sur la Maitrise de l'Energie et les Applications des Energies Renouvelables, CIE'2012*, Tozeur, Tunisie.
- CHNITI S., BENREJEB Z., CHABAANE H., HASSOUNA M., AMRANE A., CHAABANE H., DJELAL H., 2012, Production de bioéthanol à partir des sirops de

dattes Tunisiennes par des levures., 5^{ème} Colloque International sur L'Innovation au service de l'Environnement, CITET', Tunis, Tunisie.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHAGE AVEC ACTE DANS UN CONGRES INTERNATIONAL

- CHNITI, S., AMRANE, A., HASSOUNA, M., DJELAL, H. 2013. Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by using *Zygosaccharomyces rouxii* on syrup of dates. *International Chemical Engineering Congress*, Djerba, Tunisie.
- CHNITI, S., AMRANE, A., HASSOUNA, M., DJELAL, H., 2013, Osmoadaptation de la levure xérotolérante *Zygosaccharomyces rouxii* cultivée sur un milieu naturel à base de sirop de dattes, *Journée des Doctorants, Ecole Doctorale Sciences De La Matière* », Rennes, France.
- CHNITI, S., BENREJEB, Z., CHAABENE, H., HASSOUNA, M., AMRANE, A., DJELAL, H., 2012, Influence de la source d'azote sur la production de bioéthanol à partir de déchets de dattes par *Saccharomyces cerevisiae*, 2^{ème} Colloque International sur la Maitrise de l'Energie et les Applications des Energies Renouvelables, CIE'2012, Tozeur, Tunisie.
- CHNITI, S., AMRANE, A., HASSOUNA, M., DJELAL, H., 2012, Ethanol production from date by-products by using yeasts, *Journée des Doctorants, URI, UMR 6226*, Rennes, France.

Résumé

Les unités de conditionnement des dattes génèrent des quantités importantes de déchets issues des écarts de triage. Cette biomasse, considérée jusqu'alors comme un déchet avec un impact sur l'environnement peut être transformée en produit à haute valeur ajoutée. La valorisation des sous-produits de l'industrie des dattes en biocarburant s'inscrit dans une démarche économique et environnementale. Mais les fortes teneurs en sucres dans les sirops de dattes induisent une forte pression osmotique qui limite la capacité fermentaire des micro-organismes tel que *Saccharomyces cerevisiae*. Ceci nous a conduit à utiliser des souches osmotolérantes comme *Zygosaccharomyces rouxii* et *Candida Pelliculosa*. Différents essais ont été menés dans des milieux de culture à base de sirop de dattes, à différentes teneurs en sucres, en milieu discontinu et parfaitement agité. Les essais menés dans un milieu de culture à base de jus de dattes à 17,4 °Brix, conduisent à la production d'éthanol aux concentrations de 63 g L⁻¹, 41 g L⁻¹ et 33 g L⁻¹ respectivement pour les levures *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida Pelliculosa* et *Zygosaccharomyces rouxii*. Les essais menés dans le milieu à 35,8 °Brix (milieu de culture se rapprochant le plus des sirops de dattes brutes) montrent que la croissance des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida Pelliculosa* est inhibée par la pression osmotique élevée causée par la haute concentration en sucres. Seule la levure xérotolérante *Zygosaccharomyces rouxii* s'est adaptée au milieu en produisant 55 g L⁻¹ de bioéthanol.

La souche isolée des sous-produits de des dattes comme étant un *Bacillus amyloliquifaciens* est une souche allochtone capable de se développer dans un milieu hyper-osmotique et convertir les trois sucres (glucose, fructose et saccharose) en éthanol, contrairement à *Z. rouxii* qui est une souche fructophile. Le rendement en éthanol de *B. amyloliquifaciens* pour le milieu M-S175 est de 0,45 g.g⁻¹, bien supérieur à ceux de *S. cerevisiae*, *C. pelliculosa* et *Z. rouxii* qui donnent respectivement 0,38, 0,29 et 0,34 g.g⁻¹. En produisant 90 g.L⁻¹ d'éthanol pour le milieu M-S350, *B. amyloliquifaciens* nous semble prometteuse pour valoriser un substrat très riche en sucres fermentescible.

Mots-clés : Bioéthanol; Valorisation biomasse; Fermentation; Levures; Souches osmotolérantes.

Abstract

Conditioning unit's dates generate large amounts of wastage after sorting. This biomass, previously regarded as waste product with a high impact on the environment can be transformed into a highly valued product. The use of by-products of date fruit into biofuel industry is a part of an environmentally friendly economic process. But high levels of sugars in the syrups of dates induce high osmotic pressure which limits the ability of fermentative microorganisms such as *Saccharomyces cerevisiae*. This led us to use osmotolerant strains, *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida pelliculosa*. Various tests were conducted in culture media containing date juice at different levels in sugars, and perfectly stirred in batch conditions. The tests performed in a culture medium based on date juice at 17.4 ° Brix, led to the production of 63 g L⁻¹, 41 g L⁻¹ and 33.1 g L⁻¹ of ethanol for the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa* and *Zygosaccharomyces rouxii*, respectively. Tests conducted at 35.8 °Brix (culture medium close to syrup raw dates) show that the growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida pelliculosa* is inhibited by high osmotic pressure caused by the high concentration of sugars. Only the xerotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* is adapted to the environment and produced 55 g L⁻¹ of bioethanol.

The strain isolated from by-products of dates, identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, is able to develop in a hyper-osmotic environment and convert the three sugars (glucose, fructose and sucrose) into ethanol, unlike *Z. rouxii* which is a fructophilic strain. The yield of ethanol for the M-S175 is 0.45 g.g⁻¹, higher than those of *S. cerevisiae*, *C. pelliculosa* and *Z. rouxii* which give respectively 0.38, 0.28 and 0.34 g.g⁻¹. By producing 90 g.L⁻¹ of ethanol for M-S350, *B. amyloliquefaciens* seems promising to valorize a very rich substrate in fermentable sugars.

Keywords: Bioethanol; Biomass valorization; Fermentation; Yeasts; Osmotolerant strains.