

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITÉ de BLIDA 1**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie des Procédés**



# **Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER EN GENIE DES PROCEDES**

**Spécialité :** Procédés de Traitement des Effluents et Protection de  
l'Environnement (P.T.E.P.E)

Intitulé du mémoire

***Optimisation des conditions de production  
d'un bioéthanol à partir du marc de raisin  
par la levure *Saccharomyces cerevisiae****

**Présenté par :**

***Messaoui Hanane***

***Promotrice : Dr Laribi Hassiba***

***Co-promoteur : Pr ELhadi Djamel***

***Année Universitaire : 2016/2017***

## Remerciements

*Au premier lieu, je tiens à remercier le bon dieu de m'avoir donné le courage et la volonté de terminer ce travail. Je remercie ma mère est un trésor précieux pour moi. Je suis le fruit de ton amour malgré les épreuves que nous avons connues ensemble, tu es restée forte et réconfortante. Tu as toujours été une « mère » poule qui protège ses poussins des risques et dangers de l'existence.*

*Je commence par exprimer mon admiration à M<sup>me</sup> HABCHI LARJBI HASSIBA, ma promotrice. Je suis reconnaissante de vous avoir croisé dans ma vie. Ce fut lors d'un cours à la fac, pendant lequel je ne pouvais pas arrêter de vous écouter parler avec tant de passion de la Microbiologie. Merci pour m'avoir donné l'occasion de continuer. Merci parce que j'ai senti dans chaque regard un encouragement et une grande confiance.*

*Vous étiez toujours présente pour m'écouter, pour réfléchir avec moi, et pour m'assurer toute aide possible. Mais la thèse n'a pas été seulement ce que vous m'avez partagé. Je n'oublierai jamais votre soutien pendant les moments difficiles, qui ne manquaient jamais.*

*Je tiens à remercier mon Co-promoteur Monsieur ELHADI.*

*Je remercie tous les membres du jury pour avoir bien voulu donner de leur temps pour lire ce travail et faire partie des examinateurs. Certains ont dû prendre en compte de se déplacer de leur endroit de travail. Qu'ils en soient particulièrement remerciés.*

*Je remercie aussi l'ensemble des enseignants de département de chimie industrielle qui ont contribué à notre formation.*

*Je remercie également toutes l'ingénieures de laboratoires : Nawel, Nesrine ,Zahira, Fatiha, Karima, Nafissa , Rachida et Tahar , Mourad, Zoubir, rachid.*

*Merci à ma partenaire, ma famille et à mes amis encore présents ou disparus, proches ou parfois trop éloignés, merci pour tout. Cela serait beaucoup trop long à détailler je me contenterais donc d'un grand merci à tous.*

*Seghour Abderraouf Ce message fait de mille mercis est une preuve d'amitié. Te dire merci est une manière simple et directe de te dire ma reconnaissance. Merci pour ton humanité, ton altruisme et ton souci de l'autre Que tes belles actions te soient rendues au centuple.*

## Dédicaces

*Je dédie ce travail :*

*A ma mère, qui m'a encouragé à aller de l'avant et qui m'a donné tout son amour pour reprendre mes études.*

*A mon ange mon frère Ismail qui je le remercie de m'avoir soutenu dans les moments difficiles je te remercie de tout mon cœur.*

*A mon grand père et ma grand mère.*

*A mes cousins et cousines « Riad , Ali , Anis , Nawel, Narimene ,Mohamed , Wassim , Said , Mehdi , Younes , Islem , le petit Anis , Arwa , Lina , Firas »*

*A tous les membres de ma famille pour leurs sacrifices, leurs encouragements, et pour leur soutien matériel et moral tout au long de ma formation.*

*A mes amis qui n'ont cessé de m'aider et de me conseiller pour accomplir ma mémoire de fin d'étude.*

*A mes adorables : Mimi, Amina, Sabrina, Manel, Nadjet, Meriem, Karima, Souad, Fatma zohra. Habiba.*

*A tous ceux qui m'ont aidé de prêt ou de loin.*

## RESUME

L'éthanol est un composé à usages très variés allant de la chimie à l'agroalimentaire.

Cependant, la croissance actuelle du marché se fait essentiellement autour de l'utilisation de l'éthanol en tant que carburant. L'objectif de ce projet est d'optimiser les paramètres de production d'un bioéthanol à partir du marc de raisin.

Le moût issu de marc de raisin, de par sa richesse en sucres simples constitue un milieu favorable pour le développement des levures de l'espèce « *Saccharomyces cerevisiae* ».

La présente étude a pour but la valorisation de cette biomasse en produisant du bioéthanol de première génération.

Les pourcentages d'éthanol produits par fermentation du jus de marc de raisin avec *Saccharomyces cerevicea* sont de 45%, 40% et 50% à T° ambiante, à 25° et 30°C respectivement. Par contre celui de la levure isolée à partir du jus de marc de raisin est de 47.5 % à 30°C.

L'identification du bioéthanol par CPG a montré une pureté considérable à travers son étalon une valeur de rétention ( $t_R$ ) 2,531 et 2,549.

En conclusion, ce travail a permis de mettre au point un procédé biotechnologique pour valoriser la biomasse solide, qui permet non seulement de réduire l'impact environnemental, mais aussi de diminuer les coûts et d'ajouter une valeur socio-économique à ces déchets.

**Mots clés :** éthanol, optimisation, marc de raisin, moût, *Saccharomyces cerevisiae*, pureté, valorisation.

## Abstract

Ethanol is a compound with a wide range of uses ranging from chemistry to agri-food. However, the current growth of the market is essentially around the use of ethanol as fuel. The objective of this project is to optimize the production parameters of a bioethanol from grape marc.

The grape marc wort, because of its richness in simple sugars, constitutes a favorable environment for the development of yeasts of the species "*Saccharomyces cerevisiae*".

The aim of this study is to exploit this biomass by producing first generation bioethanol.

The percentages of ethanol produced by fermentation of the grape marc juice with *Saccharomyces cerevicea* are 45%, 40% and 50% at room temperature, at 25 ° and 30 ° C., respectively. On the other hand, that of the yeast isolated from grape marc juice is 47.5% at 30 ° C.

The identification of the bioethanol by GPC showed a considerable purity through its standard a retention value (tR) 2.531 and 2.549.

In conclusion, this work has led to the development of a biotechnological process to develop solid biomass, which not only reduces the environmental impact, but also reduces costs and adds socio-economic value to the waste.

**Key words:** ethanol, optimization, grape marc, must, *Saccharomyces cerevisiae*, purity, valorization.

## ملخص

يثانول هو مركب مع مجموعة واسعة من الاستخدامات تتراوح من الكيمياء إلى الأغذية الزراعية ومع ذلك، فإن النمو الحالي للسوق هو أساسا حول استخدام الإيثانول كوقود. والهدف من هذا المشروع هو تحسين معلومات الإنتاج من الإيثانول الحيوي من مارك العنب. نبتة مارك العنب، بسبب ثراها في السكريات البسيطة، يشكل بيئة مواتية لتطوير الخمائر من الأنواع "ساشارومييسز سيريفيسياي".

والهدف من هذه الدراسة هو استغلال هذه الكتلة الحيوية من خلال إنتاج الجيل الأول من الإيثانول الحيوي إن نسبة الإيثانول الناتج عن تخمير عصير مارك العنب مع سكرومييسز سيريفيسيا هي 45% و 40% و 50% في درجة حرارة الغرفة عند 25 درجة و 30 درجة مئوية على التوالي. من ناحية أخرى، أن الخميرة معزولة عن عصير مارك العنب هو 47.5% في 30 درجة مئوية

أظهر تحديد الإيثانول الحيوي من قبل غك نقاء كبير من خلال معياره قيمة الاحتفاظ (تر) 2.531 و 2.549 وفي الختام، أدى هذا العمل إلى تطوير عملية التكنولوجيا الحيوية لتعزيز الكتلة الحيوية الصلبة، التي لا تقلل فقط من الأثر البيئي، ولكن أيضا يقلل من التكاليف ويضيف القيمة الاجتماعية والاقتصادية لهذه النفايات الكلمات الرئيسية: الإيثانول، الأمثل، مارك العنب، يجب، ساشارومييسز سيريفيسياي، نقاء، تثمين

## INTRODUCTION GENERALE

Les biocarburants sont bien placés pour répondre aux soucis énergétiques, ces derniers sont issus des sources de biomasses très diversifiées, les biocarburants produits à partir des plantes saccharifères et amylacées comme la betterave ,les céréales et marc de raisin sont appelés de premières générations, et ceux produits à partir de la lignocellulose sont de seconde génération[1].

La biomasse est définie comme étant la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus d'origine végétale provenant particulièrement de l'agriculture, de l'aquaculture, de l'industrie forestière et des industries connexes. Toutes ces matières organiques peuvent devenir source d'énergie : par combustion, après méthanisation (biogaz) ou après de nouvelles transformations chimiques (biocarburants). La biomasse végétale constitue, à ce titre, une alternative d'intérêt aux ressources fossiles pour la production d'énergie, dans une logique de développement durable [2].

Le raisin est l'un des fruits les plus cultivés au monde avec une production annuelle mondiale de 58 millions de tonnes en 2012 [3]. Environ 80 % des récoltes sont utilisées pour la fabrication du vin La vinification engendre des résidus solides de pressurage : les marcs de raisin, encore riches en alcool. Conformément à la réglementation européenne (Règlement CE n° 555/2008 de la Commission du 27 juin 2008), ces « sous-produits » doivent être éliminés dans le respect de l'environnement.

La production annuelle de marc de raisin en France est actuellement d'environ 700 000 tonnes. Les voies de valorisation actuelles des marcs (alimentation animale et fertilisant) ne sont pas satisfaisantes et posent des problèmes économiques et environnementaux.

Les marcs sont transformés en différents coproduits à plus ou moins haute valeur ajoutée (alcools, huile de pépins de raisin, engrais, tartrate de chaux, pulpes, etc.) qui



servent de matières premières dans différents secteurs d'activité (agriculture, viticulture, industries chimique, agroalimentaire & cosmétique). Cette filière de traitement permet ainsi une valorisation matière (compost, alimentation, chimie...) et/ou énergétique (bioéthanol, biogaz...) des sous-produits vinicoles.

Ainsi que l'objectif de ce travail est d'optimiser les conditions de production de bioéthanol à partir d'un déchet (marc de raisin) par la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Dans ce manuscrit, la première partie présente une étude bibliographique divisée en trois chapitres distincts. Le premier rapport des données générales sur le bioéthanol. Le deuxième portera une présentation de la matière première (marc de raisin). Le troisième présentera une généralité sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

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

La troisième partie représente et discute l'ensemble des résultats obtenus à la suite de cette étude. Nous terminons par une conclusion générale.

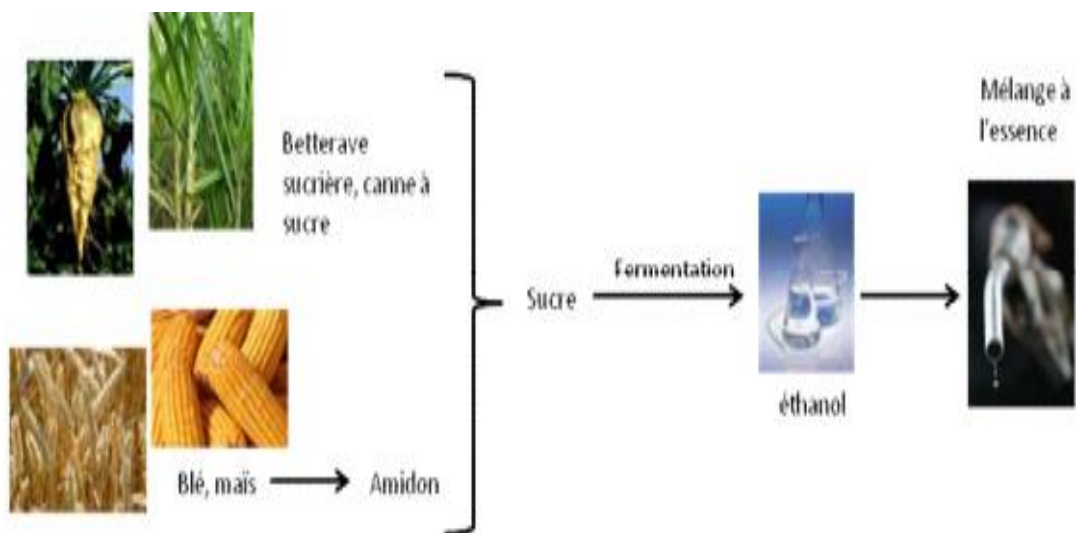
# CHAPITRE 1

## BIOETHANOL BIOCARBURANT

### 1.1. Introduction :

Le bioéthanol est aujourd'hui identifié comme le principal biocarburant en Europe qui a adoptée en 2003 la directive européenne 2003/30/CE avec une incorporation minimale des biocarburants de 2% en 2005 puis 5% en 2010 visant à promouvoir l'utilisation de biocarburant, soit sous forme pure ou à forte teneur ( ex : 85% dans le super éthanol) qui impose une adaptation du moteur , soit en mélange avec un carburant fossile ( essence ) , néanmoins, l'éthanol mélangé avec de l'essence peut être utilisé sans adaptation du moteur jusqu'à une hauteur de 10% ( v/v) ou jusqu'à 22 % (v/v) .Si avant incorporation , l'éthanol est transformé en ETBE( Ethyle-Tertio-Butyle-Éther) .

Les biocarburants, appelés aussi agro carburants, sont des carburants issus de la biomasse destinés au moteur thermique pouvant se substituer partiellement ou totalement aux carburants pétroliers.



**Figure 1.1:** Le bioéthanol de la production à l'utilisation [4]

Le tableau ci-dessous représente les propriétés physico-chimiques principales de l'éthanol.

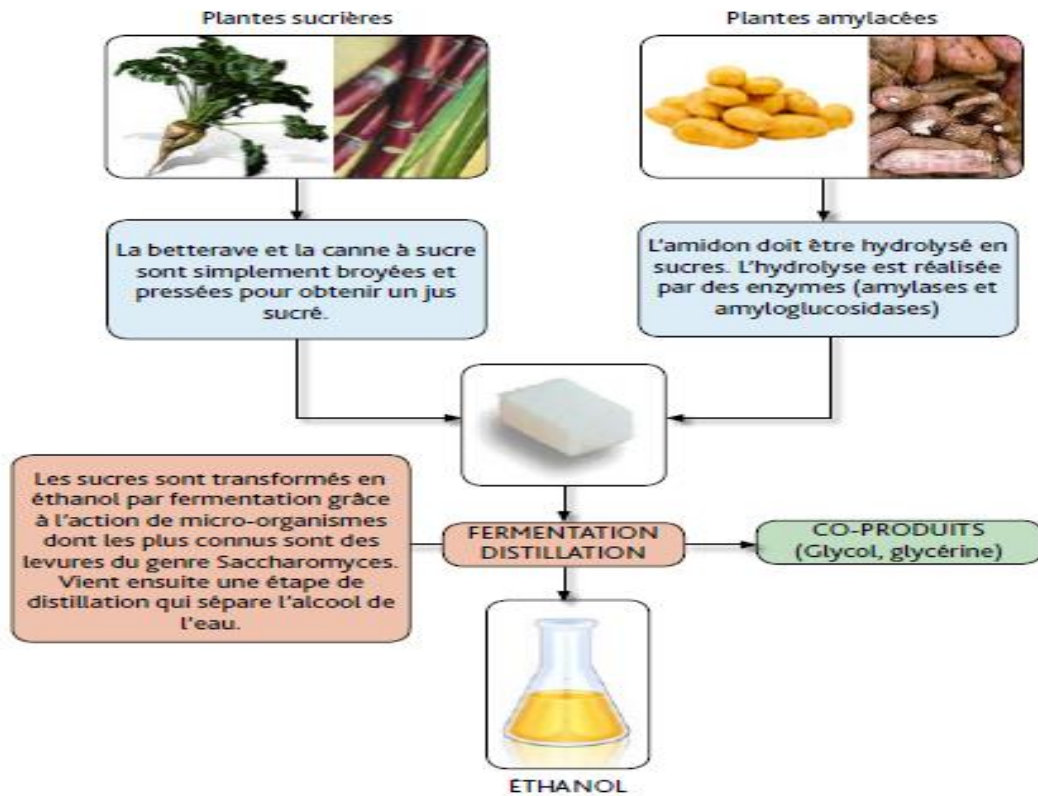
**Tableau 1.1** : Propriétés physicochimiques principales de l'éthanol [5]

<b>Propriétés physiques</b>	T° fusion	117 °C <sup>L</sup>
	T° ébullition	79 °C <sup>L</sup>
	Solubilité]	Solubilité dans l'eau : miscible, elle est complète dans les solvants polaires et apolaires (acétone, éther di éthylique).
	T° d'auto-inflammation	423 à 425 °C; 363 °C (selon les sources)
	Point d'éclair	coupelle fermée : 13 °C pur 17 °C 95 %vol. 21 °C 70 %vol. 49 °C 10 %vol. 62 °C 5 %vol
	Viscosité dynamique	1,20×10 <sup>-3</sup> Pas à 20 °C
<b>Thermochimie</b>	S <sup>0</sup> liquide, 1 bar	159,86 J·mol <sup>-1</sup> ·K
	Δ <sub>f</sub> H <sup>0</sup> gaz	-235,3 kJ·mol <sup>-1</sup>
	Δ <sub>f</sub> H <sup>0</sup> liquide	-77,0 kJ·mol <sup>-1</sup>
	C <sub>p</sub>	111 J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>
<b>Propriétés optiques</b>	Indice de réfraction	N <sub>D</sub> <sup>25</sup> 1,3594
<b>Propriétés chimiques</b>	Formule brute	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O [Isomères]
	Diamètre moléculaire	0,469 nm
	Moment dipolaire	1,66 D
	Masse molaire <sup>a</sup>	46,0684 ± 0,0023 g/mol C 52,14 %, H 13,13 %, O 34,73 %,

## 1.2. Génération de production de l'éthanol :

### 1.2.1 La première génération :

La production de l'éthanol dite de « première génération » est réalisée à partir de plantes sucrières (betterave, canne à sucre...) ou de plantes amylacées (pomme de terre, manioc...)



**Figure 1.2 :** La production de l'éthanol « première génération » [6]

**a. A partir de plantes saccharifères :**

En 2010, l'éthanol de canne à sucre représentait un tiers de la production d'éthanol au niveau mondial [7]. Mais elle ne pousse qu'en milieu tropical. La production d'éthanol consiste en première étape, la coupe, suivie du broyage des cannes puis enfin leur pressage.

Les jus d'extraction appelés jus verts peuvent être utilisés directement pour la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* durant la campagne sucrière. Cette levure a la capacité d'hydrolyser le saccharose et ainsi de libérer les deux sucres simples dont il est composé, qui sont le glucose et le fructose. Ces sucres simples sont fermentescibles.

Une autre caractéristique de ce micro-organisme est sa faculté de croître en aérobiose comme en anaérobiose. Il s'agira ensuite de distiller le vin obtenu pour récupérer l'éthanol.

## **b. A partir de plantes amylacées :**

Le maïs est la plante la plus utilisée pour la production d'éthanol aux Etats-Unis d'Amérique [8]. Cette plante est une grande consommatrice d'eau et elle est bien moins adaptée aux saisons d'étés sec de l'Europe. Néanmoins d'autres plantes sont utilisables comme le blé et l'orge (moins gourmande en eau en été), la pomme de terre ou encore le manioc, ce dernier étant particulièrement bien adapté au climat tropical.

Les réserves d'amidon dans les céréales s'effectuent dans leurs graines. Celles-ci étant pauvres en eau, elles peuvent être stockées et utilisées ultérieurement. Ce n'est pas le cas pour la pomme de terre ou le manioc qui sont riches en eau et doivent donc être transformés rapidement après récolte. En effet, l'amidon contenu dans les plantes n'est ni fermentescible ni accessible directement, il doit donc être transformé en glucose.

- ❖ L'éthanol issu du processus de production de première génération ne remplacera jamais les besoins pétroliers. En effet, les volumes potentiels de production et la concurrence directe de cette production avec les filières alimentaires restent problématiques.

### **1.2.2 La deuxième génération :**

Un deuxième procédé appelé de « deuxième génération » est déjà utilisé, mais reste encore dans une phase de développement. À l'avenir, les biocarburants seront produits à partir de la biomasse cellulosique, c'est-à-dire de cellulose, d'hémicellulose et de lignine, provenant essentiellement :

- ✓ de cultures dédiées (peupliers, eucalyptus),
- ✓ de résidus agricoles (pailles de céréales, tiges de maïs)
- ✓ ou de déchets organiques comme les boues des stations d'épuration.

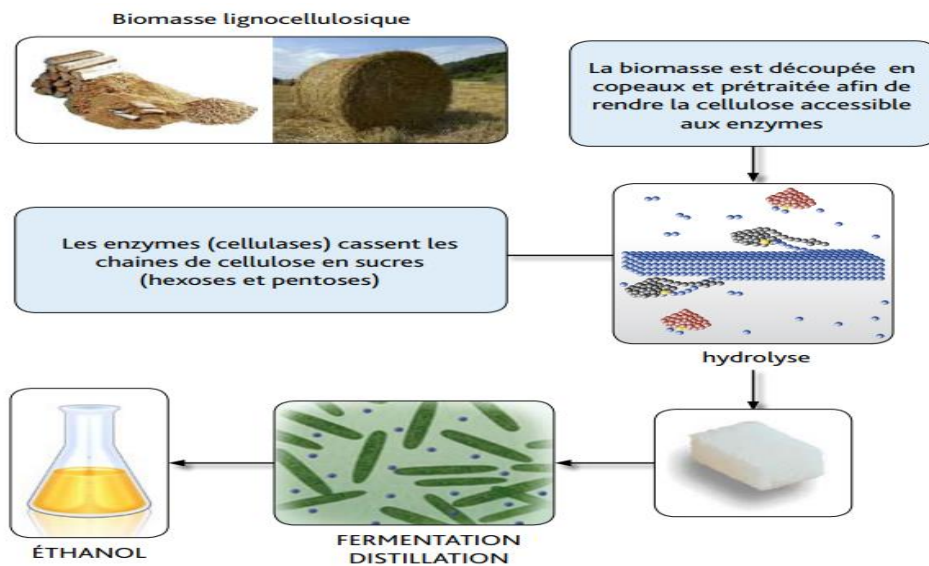
La production de biocarburants de deuxième génération à partir de cette biomasse cellulosique s'effectue :

- ✓ soit par la voie thermochimique pour la production de carburant diesel de synthèse,
- ✓ soit par la voie biochimique pour la production d'éthanol.

**a. Le bioéthanol issue de la biomasse lignocellulosique :**

Le terme de « biomasse » regroupe tous les types de matière organique provenant d'un processus biologique. Dans ce sens, la formation de biomasse végétale est due au processus de photosynthèse qui forme des structures de haut contenu énergétique.

Un des problèmes inhérents à l'utilisation de biomasse lignocellulosique est sa structure complexe. Le matériel lignocellulosique est composé essentiellement de trois composants : les polysaccharides, la lignine, et les extractibles.



**Figure 1.3:** La production d'éthanol par la voie biochimique [6]

Les matières lignocellulosiques doivent subir un prétraitement pour être transformé en sucres fermentescibles avant de pouvoir être fermentées par les levures. Il existe essentiellement deux types de prétraitements :

- ✚ Prétraitement chimique par hydrolyse à l'acide dilué ou concentré : l'hydrolyse acide utilise l'acide sulfurique. Les conditions acides et les températures élevées conduisent généralement à la dégradation des sucres et la formation de nombreux composés inhibiteurs.

Les points forts de ce procédé sont : l'obtention de rendement d'hydrolyse de 100% pour la fraction cellulosique, l'obtention d'hydrolysats concentrés en sucres, la possibilité de travailler à basse pression et température modérée.

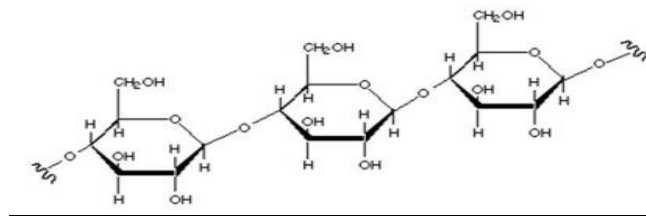
- ✚ Prétraitement biologique par hydrolyse enzymatique : repose de l'hydrolyse de la cellulose et l'hémicellulose en sucre simple soit par des enzymes et/ou par des champignons. Son but d'optimiser la production d'enzymes et leur efficacité et aussi d'améliorer les étapes de prétraitement.

**b. Les polysaccharides :**

Les polysaccharides comportent des structures de haut poids moléculaire et représentent environ de 60 à 80% du matériel lignocellulosique. Les polysaccharides sont composés de la cellulose et de l'hémicellulose [9].

**c. La cellulose :**

La cellulose est la substance naturelle la plus importante produite par des organismes vivants. Ce polymère est composé exclusivement d'unités de glucose anhydre.



**Figure 1.4:** La structure de la cellulose [9]

**d. Les hémicelluloses**

Les hémicelluloses sont composées de petites chaînes de polysaccharides dont la fonction principale est d'assurer l'union entre la lignine et la cellulose. A l'état naturel, les hémicelluloses se rencontrent sous forme amorphe. La composition des hémicelluloses varie en fonction de son origine. En plus du glucose, les monomères de l'hémicellulose peuvent être de la xylose, du mannose, du galactose, du rhamnose, ou de l'arabinose [9].

**e. la lignine :**

La lignine est un des principaux composants de la matière végétale. Sa majorité se trouve dans la lamelle moyenne, mélangée avec les hémicelluloses et formant une matrice assurant la liaison des microfibrilles de cellulose. Elle offre protection et résistance aux plantes, en évitant à la cellulose et aux hémicelluloses une exposition à l'hydrolyse enzymatique microbienne [10].

En raison de ses caractéristiques structurales, la lignine présente une bonne résistance à la biodégradation. Ses types de liaisons covalentes et son hétérogénéité font que la lignine ne peut pas être dégradée par des mécanismes classiques d'hydrolyse.

En effet, quelle que soit l'enzyme ou le groupe d'enzyme souhaitant s'attaquer à la lignine, elle doit être extracellulaire, non hydrolytique et suffisamment non spécifique [11].

#### **f. Les extractibles :**

Les extractibles ne font pas partie de la structure de la paroi végétale et sont en général solubles dans des solvants neutres. Ils contiennent une très grande variété de composés organiques : cires, graisses, alcaloïdes, protéines, phénols simples et complexes, sucres simples, pectines, résines, gommes, terpènes, etc. Ils agissent comme intermédiaires métaboliques, réserves d'énergie, ou entrent en jeu dans les mécanismes de défense contre les attaques biologiques. Les extractibles sont également connus pour donner au bois son odeur, sa couleur, et une partie de sa résistance [12].

#### **1.3. Les procédés de production de bioéthanol :**

Il existe alors deux types de procédés :

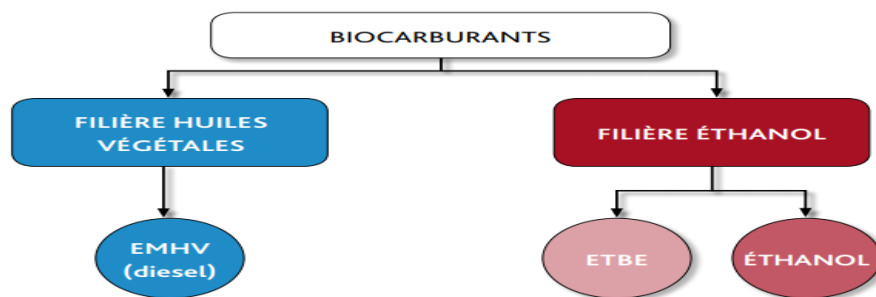
- ❖ Le premier est la voie sèche qui permet l'obtention d'un jus à la composition très proche de celle du grain de blé, à la différence que l'amidon est transformé en glucose. Ce procédé consiste en un prétraitement enzymatique permettant de dégrader l'amidon pour produire du glucose qui lui pourra être fermenté par la levure.
- ❖ Le second est la voie humide qui provoque des réactions secondaires dues à l'action de l'acide utilisé durant l'étape de trempage [13]. De plus, durant ce procédé des composés de la plante sont extraits. La composition des jus sucrés utilisant la voie humide est donc très variable.



#### 1.4. Filières de production du bioéthanol :

Aujourd'hui il existe deux grandes filières de production des biocarburants :

- ❖ La filière biodiesel, à partir d'huiles végétales (colza, palme, tournesol...), de déchets (huiles alimentaires usagées, graisses animales), comprenant à la fois les esters méthyliques (filière majoritaire) et huiles hydrogénées.
- ❖ La filière éthanol à partir de la fermentation de sucres de betterave ou de canne, de l'amidon de blé ou de maïs ou encore à partir de végétaux complets. [14]



**Figure 1. 5 :** Filières d'utilisation du bioéthanol [6]

#### 1.5. Avantages et inconvénients de l'utilisation du bioéthanol :

**Tableau 1.2 :** Les avantages et les inconvénients de l'utilisation du bioéthanol [4]

Avantages	Inconvénients
Diminution des émissions de CO <sub>2</sub> et meilleur rendement énergétique des moteurs à explosion	Les véhicules utilisant l'E85 produisent des émissions plus élevées d'oxyde d'azote, d'éthylène et d'acétaldéhyde que les véhicules à essence
Biodégradable	La combustion de l'éthanol pur produit une flamme invisible qui peut provoquer des problèmes de sécurité et corrosion des pièces
Pas de teneur en soufre	Problème de stabilité de phase dans le mélange d'essence en cas de présence d'eau
Moins toxique que le méthanol ou le bio méthanol	Prix encore élevé
Stimulation du milieu rural	Concurrence entre alimentation et énergie

## **1.6 Impact de l'utilisation du bioéthanol comme carburant sur l'environnement :**

### **1.6.1 Bilan énergétique :**

Le bilan énergétique est le gain énergétique d'un carburant par rapport à la quantité d'énergie fossile nécessaire à sa production. Afin de calculer ce bilan, il est nécessaire de prendre en compte l'énergie contenue dans le produit final, l'énergie utilisée pour produire l'éthanol ou l'essence et l'énergie consommée indirectement (transport des matières premières, distribution, etc....).

Les critères étudiés, pour le calcul de ce bilan, font qu'un résultat n'est applicable qu'à un moment précis pour une unité de production donnée.

### **1.6.2 Pollution de l'air :**

La combustion de l'éthanol produit plus d'émission de NOx que l'essence. Pour l'E10 l'augmentation est de 5% de NOx émis par rapport à l'essence [15].

L'utilisation de l'éthanol comme carburant permet de diminuer les émissions de composés carbonés cancérigènes produits pendant la combustion de l'essence. L'utilisation de l'E10, par rapport à l'essence, permet la diminution de 5% des émissions d'hydrocarbures, de 13% celles de monoxyde de carbone, de 12% celles de benzène, de 6% celles de 1-3 butadiène, l'éthanol est aussi moins réactif dans l'atmosphère que l'essence [16].

### **1.6.3 Emission de gaz à effet de serre :**

Les émissions de gaz à effet de serre sont calculées en prenant en compte toutes les émissions de GES dès le début jusqu'à la fin d'un produit.

Dans le cas des biocarburants, le calcul est réalisé de la production des matières premières jusqu'à la combustion en passant par la transformation et le transport. Les GES, comme CH<sub>4</sub> ou N<sub>2</sub>O, sont exprimés en équivalent-CO<sub>2</sub>, en utilisant comme coefficients de pondération leur Potentiel de Réchauffement Global.

#### **1.6.4 Besoin en terres agricoles :**

L'impact de la production de bioéthanol, sur les besoins de terres agricoles, dépend des politiques menées. En 2006, l'utilisation de la totalité du maïs produit aux Etats-Unis d'Amérique ne permettait de couvrir que 12% de leur consommation en essence [17]. Il est donc impossible de remplacer toute l'essence consommée actuellement par de l'éthanol.

Cependant, plusieurs solutions existent telles que :

- Les économies d'énergie sur la consommation de carburants.
- L'intensification des cultures.
- La création de nouvelles terres agricoles.

## CHAPITRE 2

### PRESENTATION DE LA MATIERE PREMIERE « MARC DE RAISIN »

#### 2.1 Introduction :

- Le marc de raisin, c'est l'ensemble que forment les pellicules, les pépins obtenus du pressurage du raisin après les avoir séparés du moût. Le marc représente la partie solide du raisin alors que le moût est la partie liquide.
- C'est aussi le principal sous-produit de la vigne lors de la vinification. Ses caractéristiques peuvent varier selon son origine, les proportions des différents constituants et les transformations qu'il a subies pour permettre sa valorisation.
- Le décret n° 2014-903 du 18 août 2014 relatif à la distillation des sous-produits de la vinification donne désormais le choix aux viticulteurs de s'orienter vers la distillation, la méthanisation, le compostage, ou l'épandage direct sur terres agricoles [18].



**Figure 2.1 :** Marc de raisin originale

Utilisation du marc :

- La distillation
- Le compostage
- la production d'un bioéthanol

## **2.2 Composition, conservation et digestibilité de marc de raisin :**

### **2.2.1 Composition :**

À l'état frais ou ensilé, ce produit contient de 32 à 46% de MS dont la composition est la suivante : (12 à 14%) de MAT ; (20 à 30%) de CB ; (8 à 10%) de MM et (5%) de MG, selon les proportions de pulpes, peaux, rafles et pépins.

Chez les ruminants qui consomment ce sous-produit, les tanins sont libérés dans le rumen où ils diminuent l'activité des micro-organismes [19].

**Tableau 2.1 : composition chimique de différents types de marc [20]**

<b>Nature du sous-produit</b>	<b>MS (%)</b>	<b>MAT (%MS)</b>	<b>MG (%MS)</b>	<b>CB (%MS)</b>	<b>MM (%MS)</b>
<b>Marc entier</b>	37,1	11,8	5,4	26,8	8,4
<b>Marc entier ensile</b>	31,4	12,9	7,6	32,1	6,9
<b>Marc éraflés</b>	39,5	13,7	6,8	23,6	12,81
<b>Marc entier déshydraté</b>	89,3	15,4	4,1	26,5	12
<b>Marc diffusion ensile</b>	32,7	11,9	-	29	5,6
<b>Marc vapeur ensile</b>	32,8	13,1	8,3	24,2	6,8
<b>Marc vapeur déshydraté</b>	87,2	12,0	4,7	20,4	5,6
<b>Marc épépiné</b>	67	17,2	9,7	40,3	11,2

### **2.2.2 Conservation :**

La teneur élevée en eau (environ 65%) ne permet pas la conservation en l'état. La déshydratation s'avère coûteuse alors que le produit se conserve correctement par ensilage et les pertes sont faibles. Le mode de conservation n'influe pratiquement pas sur la composition chimique du marc [21].

### 2.2.3 Digestibilité :

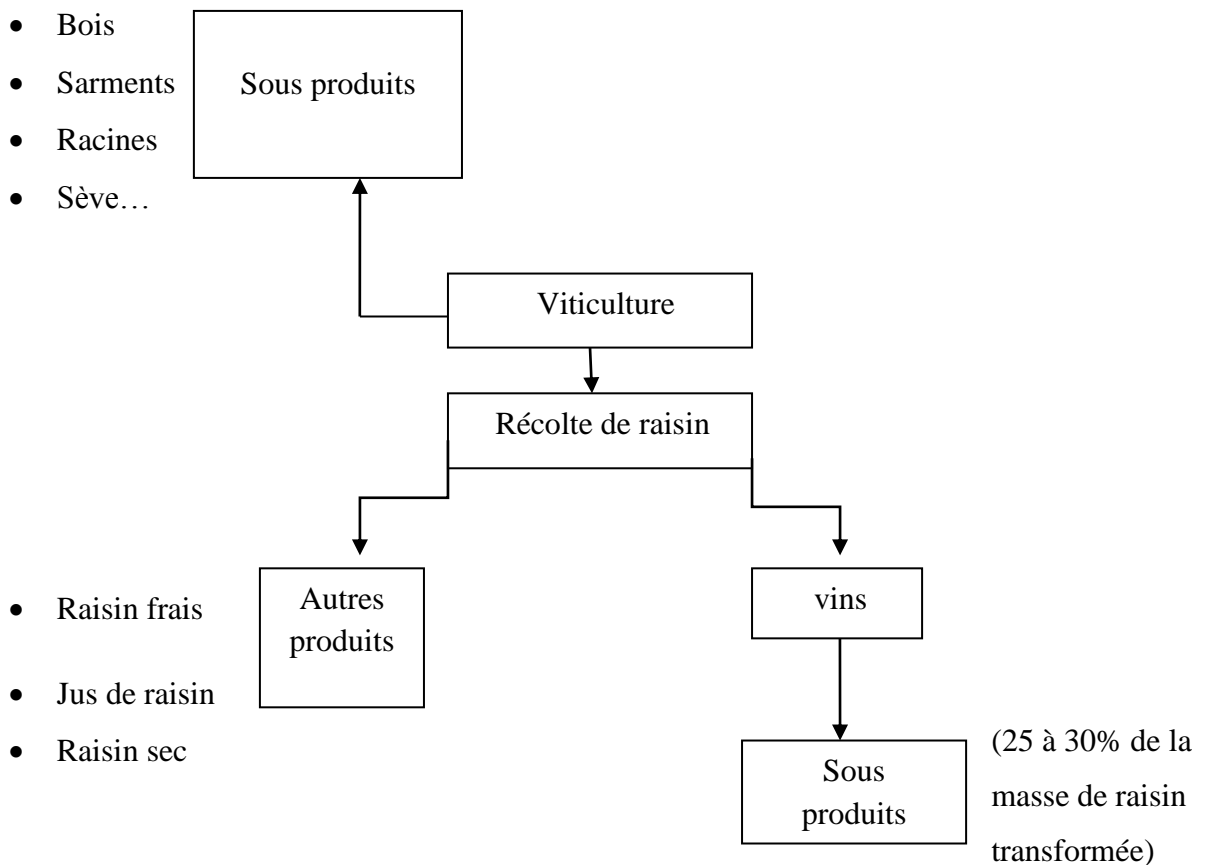
Pour les ruminants, la digestibilité du marc de raisin est faible (en moyenne 32 % pour la matière organique) particulièrement en ce qui concerne la MAT et la CB. La digestibilité des marcs est liée à leur nature et au procédé de conservation. Ainsi, les marcs vapeur sont en moyenne plus digestibles que les marcs ensilés [22].

Un apport d'azote et d'énergie améliore de façon importante (+30 à 40%) la digestibilité de tous les principes nutritifs de la ration [23].

Pour des moutons consommant de l'ensilage de marc de raisin épuisé, l'apport de 300 g par jour d'un mélange de tourteau de colza et de maïs est recommandé [24].

## 2.3 Valorisation de raisin et de marc de raisin :

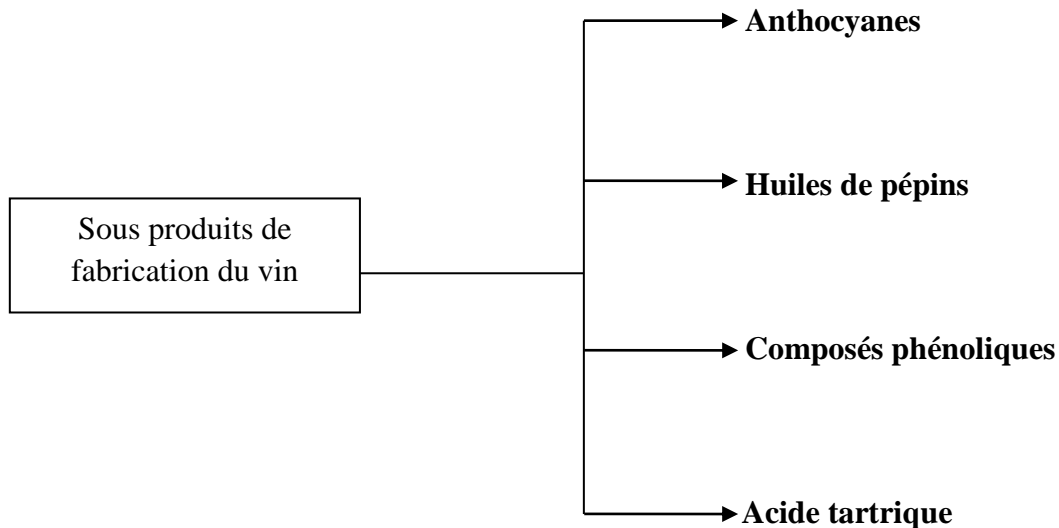
### 2.3.1 Le raisin :



**Figure 2.2 :** Schéma de valorisation de raisin [25]

### **2.3.2 Le marc de raisin :**

Les marcs de raisins sont ensilés à l'arrivée en distillerie. Ils sont ensuite traités par distillation dans des désalcoolisateurs ou bandes de diffusion. Les distilleries peuvent assurer également des activités complémentaires comme :



**Figure2.3 :** Schéma de valorisation de marc de raisin [25]

### **2.4. Les principes généraux de fabrication de coproduits issus de la distillation des marcs de raisin et des lies de vin :**

- Les marcs de raisins sont ensilés à l'arrivée en distillerie. Ils sont ensuite traités par distillation dans des désalcoolisateurs ou bandes de diffusion.
- Il ressort de cette opération une partie solide : des marcs de raisins distillés « dits épuisés » d'une part et une partie liquide : de la « piquette de marc » d'autre part.
- Les marcs de raisins épuisés sont le plus souvent déshydratés en continu afin de produire :
  - Des rafles réutilisées ensuite dans le compostage.
  - Des pépins de raisins (séparés par épépinage) utilisés pour produire de l'huile de pépins de raisins. Après extraction de l'huile, le tourteau de pépins de raisins peut servir de

combustible, notamment dans les distilleries utilisant des chaudières biomasse.

- Des pulpes de raisins déshydratées qui peuvent être valorisées en biomasse, en engrais organique ou encore en alimentation animale.

- Les distilleries peuvent assurer également des activités complémentaires comme :
  - ✓ L'extraction de polyphénols : anthocyanes (ou colorants) et tanins,
  - ✓ La production d'amendements et d'engrais organiques normés,
  - ✓ Le traitement d'effluents vinicoles.

## **2.5 Les coproduits de la distillation :**

Les quantités de coproduits issus de la distillation des marcs de raisins et des lies de vin (récupérables au niveau de la filière) sont les suivantes :

- il s'agit d'une moyenne nationale, les quantités peuvent varier en fonction des terroirs, des récoltes, des modes de vinification [26].

Ces valorisations illustrent le rôle de bio raffinerie des distilleries vinicoles. Pour les marcs de raisins, c'est environ 40 % de la matière valorisée (alcool, tartrates, pépins, pulpes) ; les 60% restants sont également des liquides à dépolluer.

### **2.5.1 Types et usage des coproduits de la distillation :**

- Pulpes déshydratées : Engrais organiques pour viticulture
- Alcool brut : Bio-carburation, industries chimiques
- Alcool de bouche : Eau-de-vie et distillats de bouche
- Pépins usage huile : Huilerie
- Anthocyanes : Cosmétique, alimentation humaine
- Huile essentielle de lies : Cosmétique
- Pulpes déshydratées : Alimentation animale
- Pulpes déshydratées : Chaudière biomasse
- Pépins usage énergie : Chaudière biomasse
- Biogaz : Energie



## CHAPITRE 3

### LA FERMENTATION ALCOLIQUE DE BIOETHANOL PAR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

#### 3.1 Introduction :

- La fermentation alcoolique est une étape clé dans l'élaboration du vin. Au cours de ce processus, les sucres sont essentiellement convertis en éthanol et dioxyde de carbone. Le micro-organisme le plus utilisé dans l'industrie en particulier dans la fabrication d'éthanol est aujourd'hui *Saccharomyces cerevisiae*.
- Cette levure possède un métabolisme très particulier. En effet, généralement les levures ont en présence d'oxygène un métabolisme oxydatif et en absence d'oxygène un métabolisme fermentaire. Cependant, cette levure cultivée avec des concentrations élevées en glucose possède un métabolisme oxydo-réductif et ce quelque soit la quantité d'oxygène dans le milieu.



**Figure 3.1:** La fermentation alcoolique

➤ La classification de la levure *Saccharomyces Cerevisiae* est comme suit: [27]

Les levures *Saccharomyces* appartiennent au :

Règne .....	<i>Fungi</i>
Division (embranchement).....	<i>Ascomycota (Ascomycètes)</i>
Sous-division.....	<i>Saccharomycotina</i>
Classe.....	<i>Saccharomycètes.</i>
Sous classe.....	<i>Saccharomycetidae</i>
Ordre.....	<i>Saccharomycetales.</i>
Famille.....	<i>Saccharomycetaceae.</i>
Genre.....	<i>Saccharomyces</i>
Espèce .....	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

### 3.2. Plan descriptif de *Saccharomyces cerevisiae* :

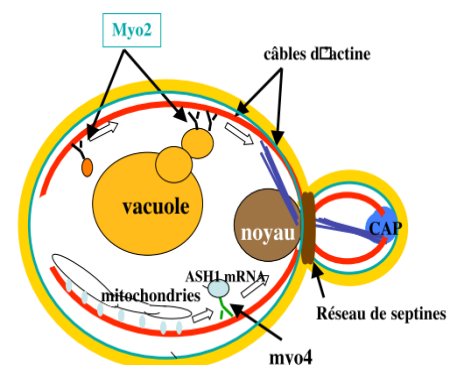
#### 3.2.1 Plan micro-cellulaire :

*Saccharomyces cerevisiae* se divise par bourgeonnement. Taille 4-7µm, ce bourgeonnement résulte dans la formation de deux cellules de taille inégale :

- a)-cellule haploïdes (bourgeonnement axial).
- b)-cellules diploïdes (bourgeonnement bipolaire).

➤ Les cellules ont une structure de type eucaryote avec:

- ✚ Une paroi de glucan, mannan protéines.
- ✚ Un espace péri-plasmique.
- ✚ Une membrane en bicouche lipidique.
- ✚ Un noyau avec un nucléole.
- ✚ Des vacuoles.
- ✚ Un appareil de sécrétion (RE, golgi, vésicules de sécrétion).

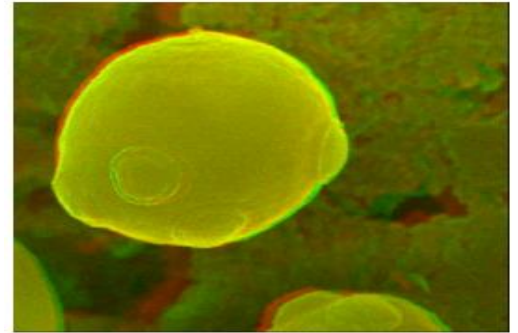


**Figure 3.2:** le bourgeonnement de *saccharomyces cerevisiae*[28]

✚ Des mitochondries.

### 3.2.2 Plan génétique de *S.cerevisiae* :

- Le génome de *S.cerevisiae* contient 16 chromosomes + de l'ADN mitochondrial et un plasmide (2μ).
- Les chromosomes contiennent des centromères et des télomères, plus simple que ceux des eucaryotes supérieurs.



**Figure 3.3:** Le génome de *Saccharomyces* [28]

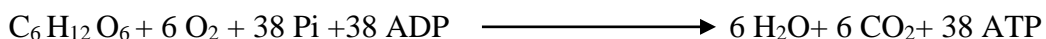
- Le génome de *S.cerevisiae* a été le premier génome eucaryote séquencé dans sa totalité.
- Le génome de *S.cerevisiae* contient environ 6572 gènes. [29]

### 3.3. Métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae* :

#### 3.3.1 Métabolisme oxydatif :

Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux levures une importante multiplication. En plus des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes [27].

Le bilan de l'oxydation totale du glucose est :



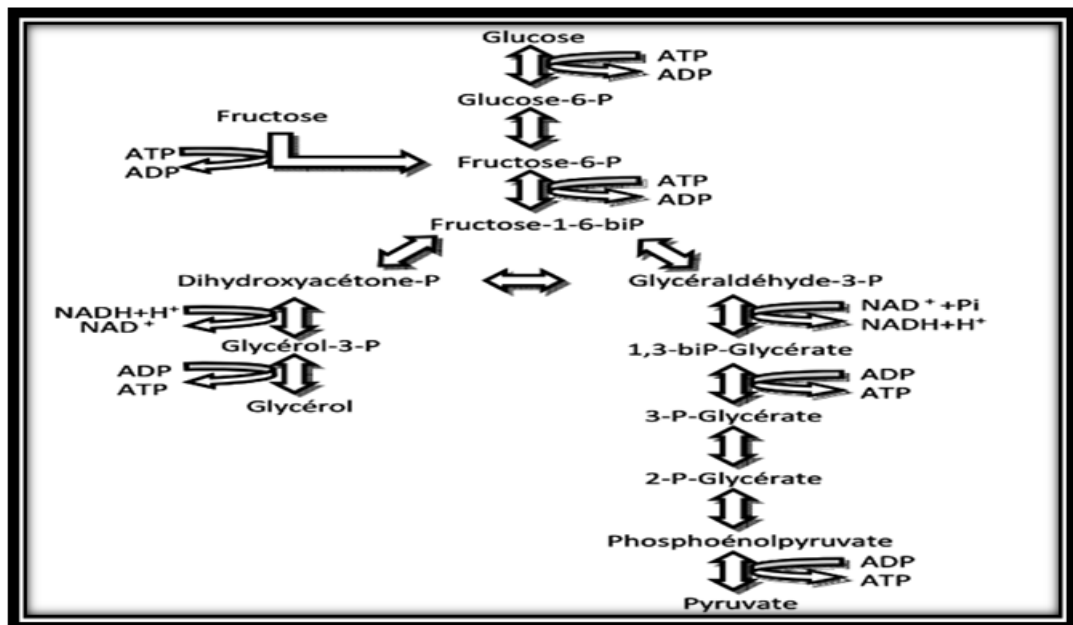
Glucose + oxygène + phosphate inorganique + adénosine di-phosphate → Eau + dioxyde de carbone + énergie.

#### a. La glycolyse :

C'est la première phase de la dégradation du substrat chez la levure *saccharomyces cerevisiae*, appelé aussi voie d'Emden-Meyerhof. Sachant que l'hydrolyse de l'amidon

aboutit à la formation du glucose, et l'hydrolyse du saccharose engendre la formation du glucose et de fructose.

La première étape est le transport du glucose du milieu extérieur à travers la membrane au milieu intérieur. Après la transformation du glucose ou du fructose par la glycolyse, cela produit 2 pyruvates et a un bilan net de 2 ATP (adénosine triphosphate) et de 2  $\text{NADH}^+\text{H}^+$  (Nicotinamide adénine di-nucléotide), en tenant compte que le fructose rejoint la glycolyse après avoir été phosphorylé en fructose 6 phosphate, d'après la figure de la glycolyse suivante (LEI F et *all* 2001) : [30]

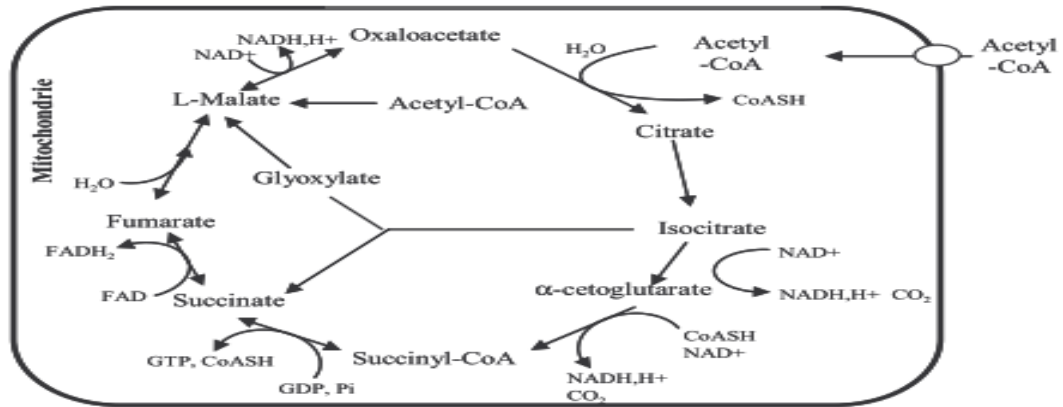


**Figure 3.4 : La glycolyse [30]**

A la fin, les  $\text{NADH}^+\text{H}^+$  seront ré-oxydées au niveau de la chaîne de transport d'électrons ce qui permettra à la cellule la production d'énergie sous forme de gradient membranaire de protons pouvant être utilisés pour le transport membranaire ou la production d'ATP, notant que la réduction de pyruvate en éthanol ce fait dans le métabolisme fermentaire en anaérobiose.

**b. Le cycle de Krebs :**

Appelé aussi le cycle de l'acide citrique, consiste en une succession de réactions d'oxydations et de décarboxylations qui sont effectuées chez les eucaryotes comme les levures par les mitochondries selon la **figure 3.5** :



**Figure 3.5** : Le cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique)

Cela permet la réduction de FAD (Flavine Adénine Di-nucléotide) en FADH<sup>2</sup> et de NAD<sup>+</sup> en NADH<sup>+</sup>H<sup>+</sup> ainsi que la production d'un GTP (Guano sine Triphosphate) qui sera convertie en ATP qui est une molécule utilisée chez tous les organismes vivants pour fournir de l'énergie aux réactions chimiques. Le FAD et le NAD<sup>+</sup> sont des coenzymes d'oxydoréductions. Ceux-ci peuvent être soit utilisés par la cellule pour accomplir des réactions redox ou peuvent, sous leurs formes réduites, donner leurs électrons à des protéines membranaires. Chaque cycle produit un FADH<sub>2</sub> et trois NADH<sup>+</sup>H<sup>+</sup>, une fois ré-oxydés grâce à la chaîne de transporteur d'électrons ils peuvent produire jusqu'à 11ATP.

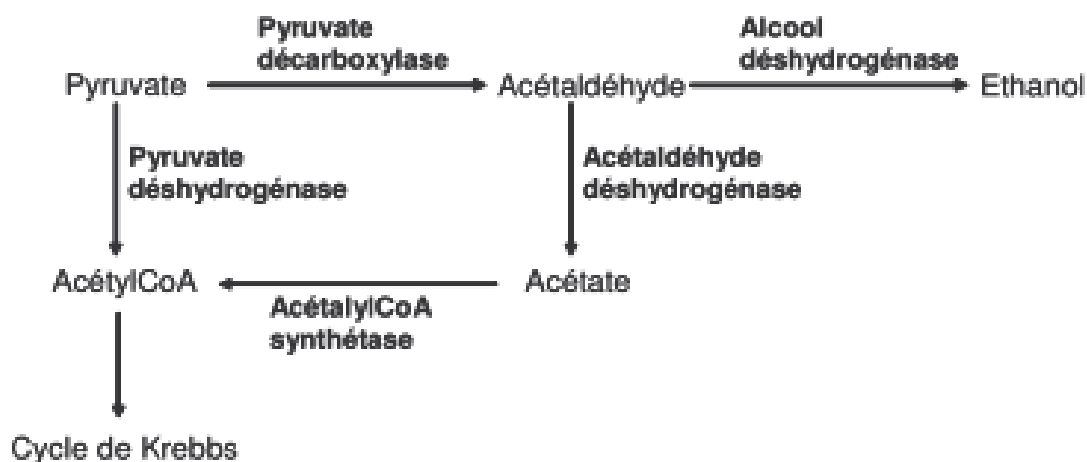
### c. La phosphorylation oxydative :

La phosphorylation oxydative désigne le processus par lequel l'ATP est formé lorsque des électrons sont transférés du NADH<sup>+</sup>H<sup>+</sup> ou du FADH<sub>2</sub> à l'oxygène qui est pour *Saccharomyces cerevisiae* l'accepteur final d'électron par une série de transporteur d'électrons.

### 3.3.2 Métabolisme fermentaire en anaérobiose :

- En anaérobiose, *Saccharomyces cerevisiae* est privée de son accepteur final d'électron qui est l'oxygène. En plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO<sub>2</sub>. En plus de ces composés majoritaires, des

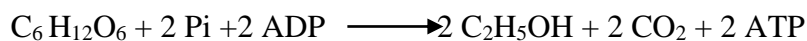
alcools, des aldéhydes, des esters, des acides sont formés en plus petites quantités. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif [27].



**Figure 3.6:** Nœud métabolique du pyruvate et l'acétaldéhyde [14]

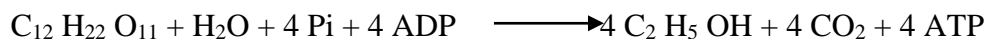
L'équation bilan des réactions de fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* est :

- Pour le glucose :



Glucose + Phosphate inorganique + Adénosine di-phosphate  $\longrightarrow$  Ethanol + Dioxyde de carbone + énergie

- Pour le saccharose :



Saccharose + Eau + Phosphate inorganique + Adénosine di-phosphate  $\longrightarrow$  Ethanol + Dioxyde de carbone + énergie

### 3.3.3 Métabolisme Oxydo-Réductif :

Ce métabolisme qui correspond à la production d'éthanol en présence d'oxygène peut avoir plusieurs explications :

- L'effet Crabtree décrit les phénomènes par lesquels un micro-organisme produit de l'éthanol en aérobiose lorsque le milieu présente une forte concentration en substrat.

Ce shift métabolique pourrait être dû aux caractéristiques du pyruvate décarboxylase (PDC) et du pyruvate déshydrogénase (PDH). En effet, la PDH a une affinité plus forte que la PDC pour le pyruvate, néanmoins la vitesse spécifique de la PDH est inférieure à celle de la PDC. Quand le flux glycolytique dépasse une valeur critique, la PDC est saturée et l'acétaldéhyde est formé. [31]

- Il pourrait y avoir répression de la respiration par la fermentation en présence de concentrations en oxygène non-limitantes. Cette répression se fait à des concentrations en substrat différentes selon le micro-organisme, par exemple 0,1 à 1 g/L de glucose suffit à *Saccharomyces Cerevisiae* pour que la répression de la respiration apparaisse et ainsi qu'il y ait production d'éthanol [32]. Au niveau du nœud métabolique du pyruvate, le flux de pyruvate issu de la glycolyse est donc orienté vers la production d'acétaldéhyde et d'éthanol et non plus vers le cycle de Krebs.
- Enfin, le passage du métabolisme respiratoire au métabolisme fermentaire pourrait être dû à la limitation des capacités respiratoires des cellules. Pour *Saccharomyces Cerevisiae*, le taux de consommation maximum en oxygène est de 5,5 mmol /g /h. Cette limitation provoquerait, dans un milieu riche en substrat carboné, une augmentation de la concentration en pyruvate qui serait alors utilisé par la voie de la PDC. [33]

### **3.4 Fermentation à haute densité :**

L'éthanol en tant que carburant alternatif peut être produit à partir de nombreuses ressources renouvelables de biomasse végétale. Afin d'augmenter la productivité et diminuer les coûts de la production d'éthanol, de nombreuses recherches ont été menées sur la fermentation à haute densité [34]. Ces fermentations sont dites à haute densité car les milieux utilisés contiennent plus de 250 g/L de sucre ce qui permet d'obtenir en fin de fermentation plus de 15% (v/v) d'éthanol contrairement aux 10 à 12 % généralement obtenus dans la plupart des distilleries à travers le monde.

### **3.4.1 Avantages et inconvénients de la fermentation à haute densité :**

Les avantages et les inconvénients de la fermentation à haute densité sont exprimés dans le tableau (3.1) :

**Tableau 3.1 :** Les avantages et les inconvénients de la fermentation à haute densité [35] [36] :

<b>Avantages : [35]</b>	<b>Inconvénients : [36]</b>
D'augmenter les capacités de production sans modification de la structure de production.	L'augmentation de la durée de fermentation
D'augmenter la concentration en éthanol dans le milieu.	La limitation des nutriments.
Diminuer les coûts énergétiques par litre d'éthanol, pour l'étape de fermentation mais aussi pour l'étape de distillation.	L'augmentation de la viscosité, donc plus d'énergie est nécessaire pour l'agitation et l'aération.
Une amélioration significative de la balance énergétique de ce biocarburant et diminuer aussi la quantité de GES émis pour sa production.	La diminution de la solubilité de l'oxygène.

### **3.4.2 Les solutions pour lutter contre les effets néfastes de la fermentation à haute densité :**

- utiliser des milieux de cultures satisfaisant au mieux les besoins de *Saccharomyces Cerevisiae* dans les conditions appliquées en termes de nutriments, de température



ou encore d'acidité. En effet, ces paramètres permettent de limiter les conséquences néfastes de la fermentation à haute densité [37].

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

### **3.5. Le déroulement de la fermentation alcoolique:**

Il existe 3 phases :

#### **3.5.1. Phase de latence :**

- la saturation progressive du milieu en gaz carbonique (environ 1,5 g/L de CO<sub>2</sub>).
- La durée de la phase de latence peut varier de quelques heures à plusieurs jours.
- la composition du milieu est très peu modifiée, à l'exception notable de la consommation de la thiamine [38].
- A la fin de cette phase, lorsque le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) commence à se dégager, la population levurienne atteint environ 10<sup>7</sup>cellules/ml, ce qui correspond à 2-3 générations dans les conditions habituelles d'ensemencement.

#### **3.5.2. Phase de croissance :**

- Le début de la phase de croissance, il y'a atteinte du maximum de la vitesse spécifique de fermentation qui rend compte de l'activité fermentaire moyenne de chaque levure, activité qui ne cesse par la suite de diminuer.
- La population atteinte est très variable suivant les moûts [39]. elle est comprise entre 50 et 250×10<sup>6</sup>cellules/ml. Dans la plupart des cas, la multiplication cellulaire prend fin suite à l'épuisement du moût en azote assimilable.
- à la fin de cette phase il y'a atteinte de la vitesse maximale de fermentation .C'est donc à cet instant que le dégagement de CO<sub>2</sub>.

#### **3.5.3. Phase stationnaire :**

- Pendant cette phase, les levures ne se multiplient plus et leur activité diminue régulièrement même si leur viabilité reste généralement supérieure à 80-90 %, excepté dans les cas d'arrêts de fermentation. Cette baisse d'activité correspond à une diminution régulière de la vitesse de transport des sucres [40].

- La taille des levures augmente et donc leur poids sec à cause de la synthèse de tréhalose et glycogène.
- ✚ Le glycogène peut être considéré comme un sucre de réserve alors que le tréhalose joue un rôle plus complexe. Il est impliqué dans les mécanismes de réponse au stress, de résistance à la pression osmotique (qui atteint plus de 2000 mOsm/kg) [41] mais aussi de régulation fine de la glycolyse.

### **3.6. Les effets des paramètres sur la fermentation alcoolique :**

#### **3.6.1 La composition du milieu :**

Les milieux utilisés pour la production de bioéthanol sont des milieux complexes. Leurs avantages sont leurs faibles coûts et leurs capacités à apporter un mélange comprenant des acides aminés, des vitamines et des sels mais en faible quantité.

Les besoins nutritifs de la levure ne se limitent pas à une source carbonée, mais comprennent aussi une source d'azote, de phosphore, de soufre, de sels minéraux, et de vitamines. Ceci permet d'assurer la synthèse des composants cellulaires, mais aussi le fonctionnement des enzymes et donc d'influencer la productivité de la levure ainsi que sa tolérance au stress dû à l'éthanol ou au substrat [42].

**Les gaz qui on obtient après la composition de milieu sont :**

#### **a) L'oxygène(O<sub>2</sub>) :**

La présence d'oxygène dans le milieu de culture des levures est à l'origine de l'effet Pasteur. Cet effet correspond à une inhibition de la fermentation, et donc de la production d'éthanol par la respiration. Cependant cet effet est presque inexistant chez *S.cerevisiae* par rapport à l'effet Crabtree qui est d'autant moins marqué que la levure est sensible à cet effet [43].

L'oxygène est aussi connu pour intervenir dans de nombreuses réactions métaboliques comme la synthèse des hèmes, les réactions réalisées par les oxydases ou encore la chaîne respiratoire. De plus, l'oxygène permet une meilleure conversion du substrat en diminuant la production de glycérol, ceci s'explique par le fait qu'il participe à la ré-oxydation du coenzyme NADH<sup>+</sup>H<sup>+</sup> qui, en cas de manque d'oxygène est ré-oxydé en produisant du glycérol durant la glycolyse. Il est donc préférable que l'O<sub>2</sub> dissous soit non-limitant.

L'oxygène permet aussi la production d'acides gras insaturés et de stérols, ce qui permet à la levure de se protéger contre la pression osmotique et l'éthanol et ainsi améliorer la viabilité cellulaire au cours de la fermentation.

**b) Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) :**

Le CO<sub>2</sub> est à la fois activateur et inhibiteur du métabolisme des levures sachant qu'il est l'un des produits majeurs de fermentation. Il se produit au cours de la fermentation alcoolique.

La viabilité cellulaire diminue à mesure que la pression de CO<sub>2</sub> dissous augmente ce qui peut entraîner une inhibition complète des levures [44]. De plus, le CO<sub>2</sub> peut dénaturer la structure de la membrane et modifier sa composition et donc fragiliser les levures vis-à-vis de l'éthanol.

Enfin le dioxyde de carbone dissous forme un acide faible ce qui peut altérer le pH et poser des problèmes de régulation à cause du pouvoir tampon des espèces H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> /HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> /CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Cependant les effets du dioxyde de carbone n'ont été relevés que pour des concentrations en CO<sub>2</sub> dissous supérieures de 15% à la saturation à pression atmosphérique [45].

**c) L'éthanol :**

L'éthanol produit au cours de la fermentation est toxique pour la levure et entraîne des fermentations languissantes ou même des arrêts de fermentation. Les effets de l'éthanol sur *Saccharomyces cerevisiae* sont très variés [46]:

- Diminution de la vitesse de croissance
- Diminution de la viabilité
- Diminution des capacités fermentaires
- Inhibition du transport du glucose et de l'azote.

**d) La température :**

- La température agit sur les vitesses de croissances et de production de métabolites, plus la température est élevée, plus la croissance sera rapide et ce jusqu'à atteindre la température optimale, au-delà de laquelle la vitesse de croissance diminuera [47].
- En effet, il y a augmentation des sucres résiduels et diminution du rendement de conversion des sucres en éthanol [48]. Cependant, des températures supérieures à 30°C peuvent avoir pour effets de diminuer la concentration finale en éthanol dans le milieu.

## **CHAPITRE 4**

### **MATERIEL ET METHODE**

Ce travail a été réalisé au niveau de l'université Saad Dahleb Blida 1. Il faut donc signaler que les conditions opératoires, les méthodes d'analyse, ainsi que le protocole général de cette étude ont été adaptés aux moyens disponibles.

L'objectif de ce procédé est l'optimisation des conditions de production d'un bioéthanol à partir du Marc de raisin par la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **4.1 Matériels :**

##### **4.1.1 Matériel végétal :**

Le matériel végétal utilisé est le marc de raisin étant échantillonné en mois de novembre au niveau d'une entreprise spécialisée dans la production et la commercialisation de vin située à Bourkika-wilaya de Tipaza.



**Figure 4.1** : Marc de raisin originale

#### **4.1.2 Matériel biologique :**

Les microorganismes utilisés dans notre étude sont les levures de *saccharomyces cerevisiae* commerciale par rapport vu sa pureté très acceptable (97%) et une autre levure isolée du jus de marc de raisin.

#### **4.1.3 Matériel du laboratoire :**

Les dispositifs utilisés au cours de la fermentation sont :

- **Autoclave** : c'est un appareil de stérilisation en utilisant la chaleur et la vapeur d'eau.
- **Agitateur avec un thermocouple** : les thermocouples sont utilisés pour la mesure de températures. Leur principal défaut est leur précision : il est relativement difficile d'obtenir des mesures avec une erreur inférieure à 0,1-0,2 °C.
- **Ballon mono-col** : Il est généralement utilisé lorsqu'il est nécessaire de chauffer le milieu réactionnel pendant une durée de plusieurs minutes. Le récipient est alors placé sur un chauffe-ballon qui en épouse la forme.
- **Au cours de la fermentation nous avons :**
  - ✚ Effectuer les prélèvements.
  - ✚ Contrôler la température de la fermentation.

✚ Vérifier le dégagement du CO<sub>2</sub>.



**Figure 4.2 :** Dispositif de la fermentation alcoolique

#### 4.1.4 Réactifs :

Les réactifs utilisés dans les différentes étapes de la production de bioéthanol sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 4.1 :** Réactifs utilisés

Réactifs	Origine
NaOH	Panreac, Espagne
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95-97%)	Sigma Aldrich, France
Extrait de levure	Biochem, France
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Biochem, France

Levure <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	United kingdom, EU
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Polabo, USA
Mg SO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	Biochem, France
<i>Tartrate de sodium et de potassium</i>	<i>Panreac, Espagne</i>
<i>Acide 3,5-dinitrosalisylique</i>	-
<i>Acide acétique</i>	<i>Sigma Aldrich, France</i>

#### 4.2. Protocole expérimental :

##### 4.2.1 Préparation du marc de raisin :

Les déchets de raisin doivent passer par un certains nombres de procédés pour obtenir un broyat de marc. Ce dernier sert de matière première pour l'ensemble des analyses à effectuer.

##### a. Séchage :

C'est un procédé de récupération de l'humidité ou d'autres liquides d'un solide par évaporation. Cette opération est endothermique et nécessite l'apport d'énergie thermique.



**Figure 4.3 :** Séchage de marc de raisin originale

**b. Broyage et hydratation :**

Le but de cette étape c'est :

- ✚ Maximiser l'extraction des sucres et de rendre le milieu plus homogène.
- ✚ Cette étape a été effectuée par un agitateur électrique qui va assurer l'homogénéisation du milieu.
- ✚ Le marc broyé est ensuite dilué en ajoutant 3 litres d'eau distillé à un kilogramme sous agitation continue pendant 45 minutes.
- ✚ Le milieu chaud assure une meilleure extraction des sucres, une pasteurisation du milieu et une bonne macération.





**Figure 4.4 :** Broyage et hydratation du marc de raisin originale

**c. Filtration et stérilisation :**

Lorsque le jus est refroidi, il est ensuite filtré à travers un papier filtre en activant l'aspiration sous vide afin de maximiser son extraction.

Pour favoriser la prolifération des levures, nous avons ajouté :

- Extrait de levure 2.5 g/l
- Potassium phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  12.5g/l
- Sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3g/l.[48]

**4.2.2 Fermentation alcoolique :**

**✚ En présence de la levure *saccharomyces cerevisiae***

La fermentation alcoolique du marc de raisin a été réalisée par la levure *Saccharomyces Cerevisiae* (1g/l) [49].

Cette étape est conduite dans un ballon mono-col de 1 litre rempli au 3/4a de sa capacité, ce dernier est plongé dans un bain-marie ou la température est maintenue à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  avec un pH ajusté à 4,5.

La fermentation se passe en anaérobiose pendant 72heure.

Au cours de la fermentation, nous avons suivi :

- Le pH

- Degré alcoolique
- La croissance bactérienne
- Le taux de glucose

La fermentation a été réalisée à différentes températures à savoir : ambiante, à 25° et à 30°C

**✚ En présence de la levure isolée du jus de marc de**

Un volume de 0,1 ml du notre jus de raisin a été ensemencé par étalement en surface sur milieu gélosé sabouraud. Les boîtes de pétries sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 à 72 h.

**Préparation de l'inoculum :**

A partir de colonies sur milieu solide, la souche isolée a été repiquée dans un tube à essai qui contient 20 ml de milieu de culture préparé avec du jus de marc de raisin. Le tube est ensuite incubé à 30°C pendant 18 heures jusqu'à ce que le milieu sera trouble.



**Figure 4.5 :** Isolement des levures



**Figure 4.6 :** Préparation de l'inoculum

**Mise en œuvre de la fermentation alcoolique**

L'inoculum est obtenu en ensemencant le jus de marc de raisin stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 mn par la souche isolée du marc de raisin. La fermentation est conduite dans le fermenteur rempli au  $\frac{3}{4}$  de sa capacité (conditions d'asphyxie).

Le pH du milieu est ajusté à 4,5. La température est maintenue à  $30 \pm 2$  °C. La fermentation est conduite en anaérobiose pendant 72 heures.

A la fin de la fermentation, nous serons en présence d'un vin de marc de raisin qu'il faut distiller pour pouvoir extraire l'éthanol. La température de distillation est de l'ordre de 78 °C. La rectification de l'alcool brut nécessite une deuxième distillation.

#### **4.3. Méthodes d'analyses :**

##### **4.3.1 Analyses physico-chimiques de marc de raisin et de mélasse :**

###### **a. Mesure de pH :**

Le principe consiste à introduire l'électrode d'un pH- mètre dans un volume bien déterminé d'échantillon de marc. Ensuite on lit directement la valeur du pH sur le cadre du pH- mètre de type « HANNA HI 2210 ».

Sa variation nous renseigne sur l'activité métabolique de la levure au cours de la transformation des sucres en alcool.

###### **Mode opératoire :**

- On prend une quantité volumique du marc de raisin dans un bécher.
- l'électrode est plongée dans la solution en prenant compte qu'elle soit complètement immergée dedans. Et le pH est mesuré par une lecture directe de la valeur indiquée sur le pH-mètre.
- Cette opération a été répétée 3 fois pour chaque variété.

###### **b. Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Miller (DNS)**

- Cette méthode établie par **Miller (1959)** est utilisée pour suivre la consommation de sucre pendant les fermentations.

- Les sucres principaux dans le jus de raisin sont le fructose (**cétose**) et le glucose (**aldose**) qui sont des sucres réducteurs. Cette méthode teste la présence de groupements carboxyles libres (**C=O**).
- L'intensité de la couleur varie selon le taux des sucres réducteurs présentés dans le milieu de réaction (de couleur jaune orange en milieu alcalin et de couleur rouge orange à chaud).
- Son absorbance est mesurée à 540 nm d'un spectrophotomètre. [50] [51] [52].
- Le **DNS** ou réactif dinitrosalicylique est préparé **dans 250 ml d'eau distillée** de la façon suivante :
  - **2.7 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique.**
  - **75 g de potassium de sodium de potassium.**
  - **4 g d'hydroxyde de sodium.**

**Mode opératoire :**

Dans les tubes à essai :

- On prend 1 ml de milieu de fermentation.
- On ajoutant 1 ml de réactifs DNS on le met dans un bain-marie pendant 5 min à 100°C.
- On le refroidit.
- On ajoute 10 ml d'eau distillée.
- Lire l'absorbance à 540 nm.

En cas où la D.O dépasse de dernier point de notre courbe il faut faire des dilutions de nos échantillons. (Annexe 1)



**Figure 4.7 :** Dosage des sucres réducteurs

**c. Teneur en lipides :**

**Principe :**

Le solvant organique utilisé est un mélange de méthanol/chloroforme (1 :2, v/v). L'échantillon à analyser et le solvant sont introduits dans un erlenmeyer à hauteur de 1 :20 (substrat solide/volume en ml).

Après 1 heure d'agitation, le produit est filtré sous vide à travers un verre fritté d'indice3.

Le filtrat est introduit dans une ampoule à décanter.

Du NaCl à 0.9% est ajouté à hauteur de 0,2 ( v/volume total).

Le mélange décante jusqu'à l'obtention d'un système biphasique. L'ampoule est dégazée plusieurs fois, puis la partie l'huileuse située dans la phase inférieure est versée dans un ballon préalablement pesé. Le contenu du ballon est distillé sous rota vapeur Puis séché sous azote [54].

- **Expression des résultats :**  $lipides \% = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1)} * 100$

Soit :

$m_0$  : poids du ballon.

$m_1$  : prise d'essai.

$m_2$  : poids du ballon contenant les lipides séché après l'extraction.

**d. Teneur en protéines :**

### **Principe :**

Plusieurs dosages colorimétriques savent à déterminer la concentration en protéines solubles, ils partagent le même principe, basé sur la formation d'un complexe avec les liaisons peptidiques, détectés sous visible [55].

#### **• Mode opératoire :**

La première étape consiste à réaliser une gamme d'étalonnage.

Dans 6 tubes à 0,5 ml avec de l'eau physiologique puis ajouter 2,5 ml de BIURET (Annexe 2).

Placer les tubes 30 minutes à l'obscurité pour développer la coloration.

Mesurer l'absorbance à 545 nm.

La deuxième étape consiste à solubiliser les, protéines.

Environ 1 g d'échantillon est pesé dans un tube le quel est ajouté 10 ml de NaOH (2M).

Les tubes est porté à 90°C pendant une heure, après refroidissement, le contenu du tube est fractionné par centrifugation à 10°C, pendant 10 minutes à 10 tours/min. la fraction des protéines solubilisée se situe dans le filtrat.

#### **e. Le degré alcoolique :**

Le degré alcoolique ( $d^\circ$ ) correspond au volume d'éthanol en ml présent dans 100 ml de jus fermenté, nous avons tout d'abord effectué d'étape de la distillation puis doser l'éthanol du distillat grâce au titrage et cela après son oxydation avec une solution de dichromate de potassium concentrée dans un milieu acide [56].

Dans un erlenmeyer :

- On introduit 10 ml de dichromate de potassium ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}, \text{K}^+$ ) à 0,5 M.
- 5 ml d'acide sulfurique concentré (afin d'accélérer réaction).
- 5 ml de distillat.
- On bouche l'erlenmeyer afin d'avoir une oxydation complète de l'alcool et agiter pendant 15 à 20 min.
- On titre l'excès de dichromate au moyen d'une solution de sulfate de fer et d'ammonium (on agite l'erlenmeyer après chaque addition) jusqu'à la coloration vert émeraude.

#### **• Expression du résultat :**

$$D^\circ = 100 \times \frac{3}{2} \times M_{(\text{CH}_3\text{COOH})} \times ([\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}] \times V_{(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})} - [\text{Fe}^{-3}] \times \frac{V_E}{6}) / \rho_{(\text{CH}_3\text{COOH})}$$

**f. La détermination de la teneur en eau :**

Elle est déterminée par dessiccation de 1g de marc de raisin dans une capsule de porcelaine, puis séchée dans une étuve à température de  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  [57].

**Mode opératoire :**

- On sèche les capsules dans l'étuve à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 15 à 20 minutes.
- On laisse ensuite les capsules se refroidir dans un dessiccateur pendant 15 à 20 minutes.
- On pèse les capsules vide ( $M_0$ ) puis les repesées avec la prise d'essai de 1g de broyat de marc ( $M_1$ ).
- On introduit les capsules avec la prise d'essai dans l'étuve pendant 3 heures.
- On retire les capsules de l'étuve et les placer dans un dessiccateur pendant 15 à 20 minutes.
- Après leur refroidissement, les capsules sont pesées ( $M_2$ ).

La teneur en eau est exprimée selon la formule suivante :

$$\mathbf{H (\%)} = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} * \mathbf{100}$$

H : humidité (%).

$M_0$  : masse de la capsule vide (g).

$M_1$  : masse de la capsule + matière fraîche avant étuvage (g).

$M_2$  : masse de l'ensemble après étuvage (g).

**g. Dosage des cendres :**

. La pulpe de marc de raisin broyée et calcinée à  $550^\circ\text{C}$  dans un four à moufle jusqu'à l'obtention d'une cendre blanchâtre de poids constant.

**Mode opératoire :**

- On sèche les capsules dans l'étuve à  $550 \pm 20^\circ\text{C}$  pendant 15 à 20 minutes.
- On laisse ensuite les capsules se refroidir dans un dessiccateur pendant 15 à 20 minutes.

- On pèse les capsules vide ( $M_0$ ) puis les repesées avec la prise d'essai de 2g de broyat de marc ( $M_1$ ).
- On introduit les capsules avec la prise d'essai dans le four pendant 5 heures jusqu'à l'obtention d'une couleur grise, claire ou blanchâtre.
- On retire les capsules de l'étuve et les placer dans un dessiccateur pendant 15 à 20 minutes.
- Après leur refroidissement, les capsules sont pesées ( $M_2$ ).



**Figure 4.8** : La cendre du marc



**Figure 4.9** : Four à moufle

Les cendres sont exprimées selon la relation suivante:

$$C (\%) MF = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} * 100$$

$M_0$  : masse de la capsule vide (g)

$M_1$  : masse de la capsule + prise d'essai (g)

$M_2$  : masse de la capsule + cendres (g)

#### 4.3.2 Analyses biochimiques :

##### a. Dosage de l'acidité :

La méthode utilisée est la titration avec une base forte comme tous les acides organiques, nous utilisons pour la titration de la soude 1N et la phénolphtaléine comme indicateur coloré [58].



Le dosage de l'acidité consiste en la neutralisation des acides contenus dans les milieux par de la soude à 0,1 mol/l . Pour chaque composition de milieu, 100 ml ont été préparés. Ces milieux ont ensuite été additionnés de soude jusqu'à atteindre le pH=7.

**Mode opératoire :**

- On pèse 25g d'échantillon du marc de raisin.
- On les place dans un erlenmeyer avec 50 ml d'eau distillé.
- On remet le tous dans un bain marie et on chauffe sur une plaque chauffante pendant 30 minutes.
- On refroidie puis on filtre.
- On prélève à la pipette 25 ml du filtrat en le mettant dans un bécher.
- On ajoute quelques gouttes de phénolphtaléine tout en agitant.
- On procède au titrage avec de la soude 0.1N jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante pendant 30 secondes.

L'acidité titrable est exprimée en gramme d'acide citrique pour 100 g de produit :

$$A\% = (250 * V1 * 100) / (V0 * M * 10) * 0.07$$

Soit :

**M** : masse en gramme du produit prélevé.

**V0** : volume en millilitres de la prise d'essai.

**V1** : volume de la solution d'hydroxyde de sodium.

**0.07** : facteur de conversion de l'acidité titrable en équivalent d'acide citrique.

**4.4 La distillation :**

c'est la dernière (et la plus énergétiquement coûteuse) étape de la fabrication d'alcool qui permet de récupérer l'éthanol provenant de la fermentation.

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



**Figure 4.10** : La distillation alcoolique

#### **4.5 Vérification de la pureté :**

La pureté a été mesurée à l'aide d'un réfractomètre. L'indice de réfraction est le rapport de la vitesse de la lumière dans le vide divisé par la vitesse de la lumière dans le milieu [56]. La courbe d'étalonnage des indices de réfractons en fonction des différentes concentrations de l'éthanol absolu à 96% afin de déterminer la pureté de notre bioéthanol à la suite de la distillation.

#### **4.6 Méthodes d'identification :**

##### **4.6.1 Par chromatographie en phase gazeuse :**

L'analyse a été réalisé à l'aide d'un chromatographe « SHIMADZU GC-17A » muni d'un lecteur « SHIMADZU C-R8A ». Cette technique nous permet d'affirmer que notre échantillon ne renferme qu'un seul constituant qui est l'éthanol. La quantité injectée de **0,02  $\mu$ L**.

- Type de la colonne : **OV17**
- Type de détecteur : **FID**

- Pression : **54mPa**
- Débit : **12 ml/min**
- Température de l'injection : **200°C**
- Température de la colonne : **85°C**
- Température de détecteur : **220°C**

#### **4.6.2 Analyse par CG-SM**

##### **a. Principe**

Le principe de spectrométrie de masse est le suivant : Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques, puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés.

##### **Appareillage :**

- Chromatographe (phase gazeuse) : QP5050 SHIMADZU
- Colonne capillaire : type (L= 30 m, DI= 0,25 mm, e= 0,25 µm)
- Ordinateur : Marque *hp* (Windows Xp 2007)

##### **b. Conditions opératoires :**

Le gaz porteur est l'hélium, utilisé à un débit de 1 ml.min<sup>-1</sup>. La température de l'injecteur a été fixée à 250 °C. Le programme du gradient de la température est comme suit : 2 min à 50 °C, puis la température augmente jusqu'à atteindre 280 °C à raison de 5 °C/min et se stabilise à cette température pendant 15 min. L'injection se fait en mode Split 1/50, le volume injecté est 1 µl.

## **Résultats et discussions**

### **5.1 Résultats et interprétation des analyses physico-chimiques du Marc de raisin :**

Les résultats d'analyses physico-chimiques de marc de raisin avant de procéder à la fermentation alcoolique sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 5.1** : Résultats physico-chimiques du Marc de raisin.

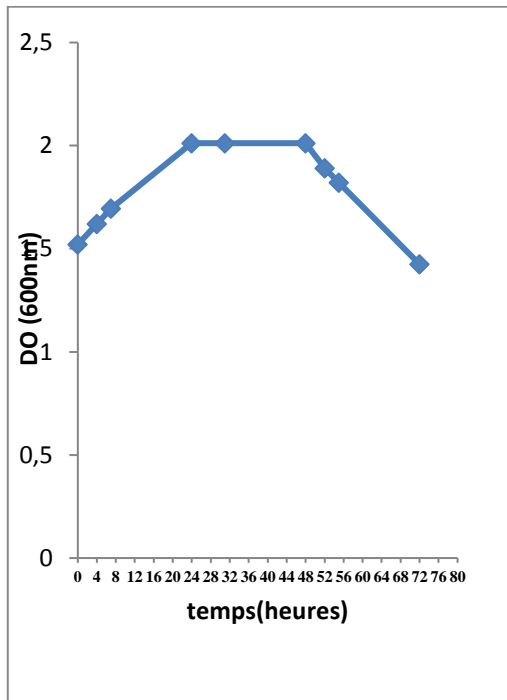
pH	4.51
Teneur en eau %	10
Teneur en cendre %	5 ,15
Teneur en lipides %	2,62
Teneur en protéine %	11 ,73
Acidité titrable %	4,7
Sucre réducteurs (g/l)	18,4

La valeur moyenne porte sur deux essais :

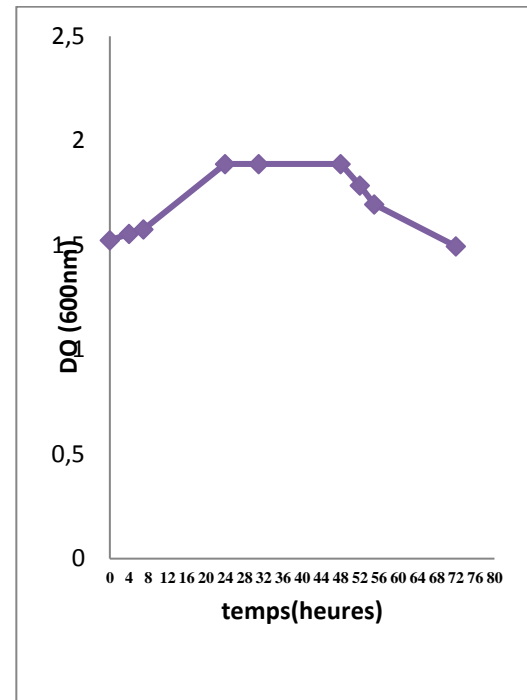
- Les résultats obtenus montrent que le pH de notre Marc de raisin est de 4.51 cette valeur permettre un bon développement de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que la levure isolée.
- Taux de cendres est faible avec une valeur de 5.15%. Les résultats de l'analyse montrent que le Marc de raisin est riche en sels minéraux.
- La teneur en eau de marc de raisin est 10 %.
- L'acidité titrable de marc de raisin est de 4.7%.cette acidité favorise la fermentation par *saccharomyces cerevisiae*. Les moûts de raisins ont un pH acide, ce caractère acide est le plus souvent lié à la présence d'acides organiques dont les principaux sont l'acide tartrique, l'acide malique et l'acide citrique.
- La teneur en protéine du moût est moyenne. Ce taux de protéine bien que moyen n'est pas négligeable comme source de matières azotées.
- Les sucres sont les constituants les plus importants de marc de raisin. Pour cette étude, la teneur en sucres obtenus relativement élevés et elle est de 18.4% on remarque que le marc de raisin est riche en sucres par rapport au jus de raisin qui entre 20 % et 30% [59].

## 5.2. Evolution de la fermentation alcoolique en fonction de la température :

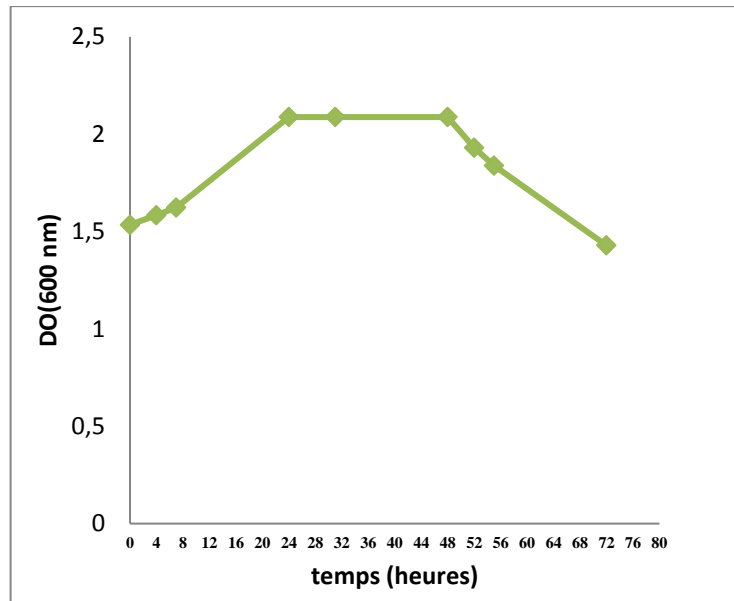
L'évolution de la croissance de notre levure en fonction du temps illustrés sur les figures (5.1, 5.2, 5.3) montre une bonne croissance bactérienne avec des différentes phases à des différentes températures (ambiante, 25°C, 30°C) :



**Figure 5.1:** Evolution de la croissance de *S. cerevisiae* en fonction du temps à T° ambiante



**Figure 5.2 :** Evolution de la croissance de *S. cerevisiae* en fonction du temps à 25°C

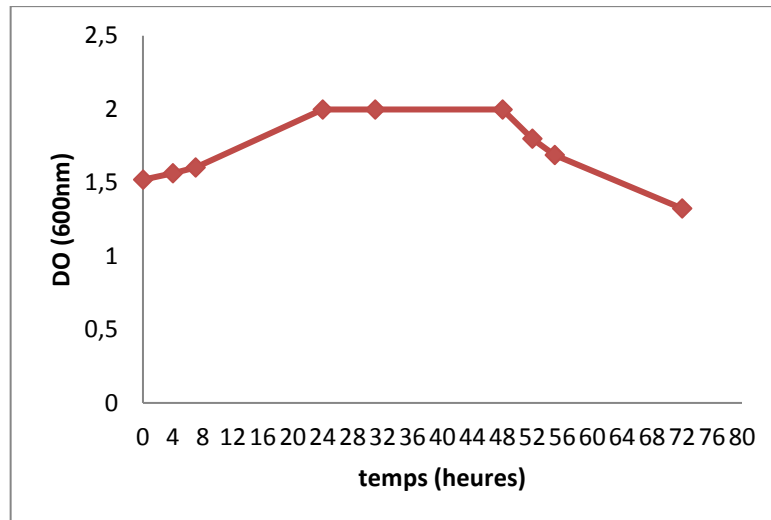


**Figure 5.3:** Evolution de la croissance de *S. cerevisiae* en fonction du temps à 30°C

La température est le facteur environnemental qui la plus grande influence sur la physiologie et l'activité des microorganismes elle agit à la fois sur le taux de croissance, la vitesse de production de l'éthanol et la production de CO<sub>2</sub>.

Il existe 4 phases de croissance :

- ✓ La première phase de latence, où rien ne semble se produire mais la levure s'adapte à son nouvel environnement et commence à se développer en taille.
- ✓ Deuxième phase exponentielle ou le métabolisme est essentiellement fermentaire.
- ✓ On note une production de l'éthanol à la suite de la consommation des sucres.
- ✓ Troisième phase c'est la phase stationnaire qui explique la consommation du sucre et au cours de laquelle, le métabolisme est orienté vers un métabolisme oxydative.
- ✓ Une quatrième phase déclin « décroissance », la levure *saccharomyces cerevisiae* ne fonctionne plus et ne se développe pas à cause du manque de nutriments.



**Figure 5.4 :** Evolution de la croissance de la levure isolée en fonction du temps à 30°C

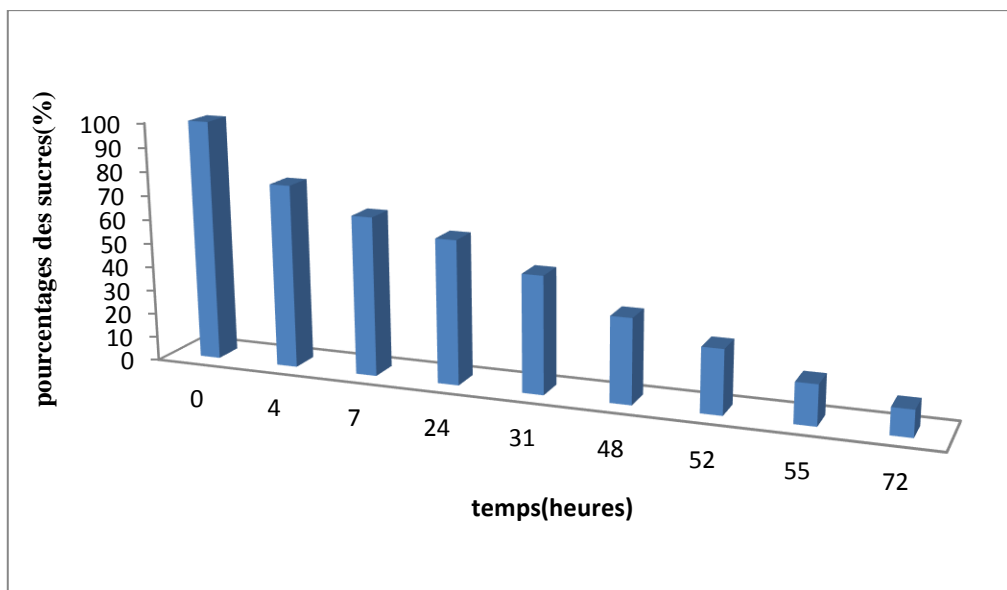
D'après nos résultats, nous remarquons après 72 h de fermentation pour les deux levures testées, une dégradation significative des sucres. Cette bioconversion était surtout active les premières 24 heures.

### **5.3. Evolution de la teneur en sucres réducteurs durant la fermentation alcoolique :**

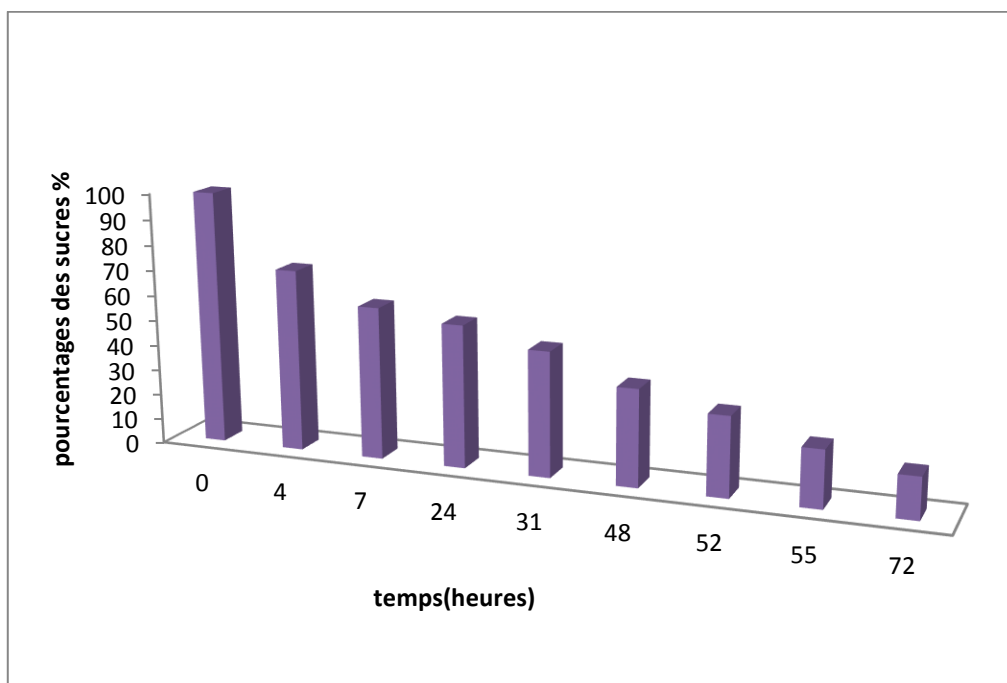
Les sucres sont les constituants les plus importants dans le marc de raisin. Ils sont également responsables de la douceur de l'aliment

Dosage des sucres établis par la méthode de DNS est utilisé pour suivre la consommation de sucre pendant les fermentations.

#### **5.3.1 En présence de la levure *Saccharomyces cerevisiae* :**

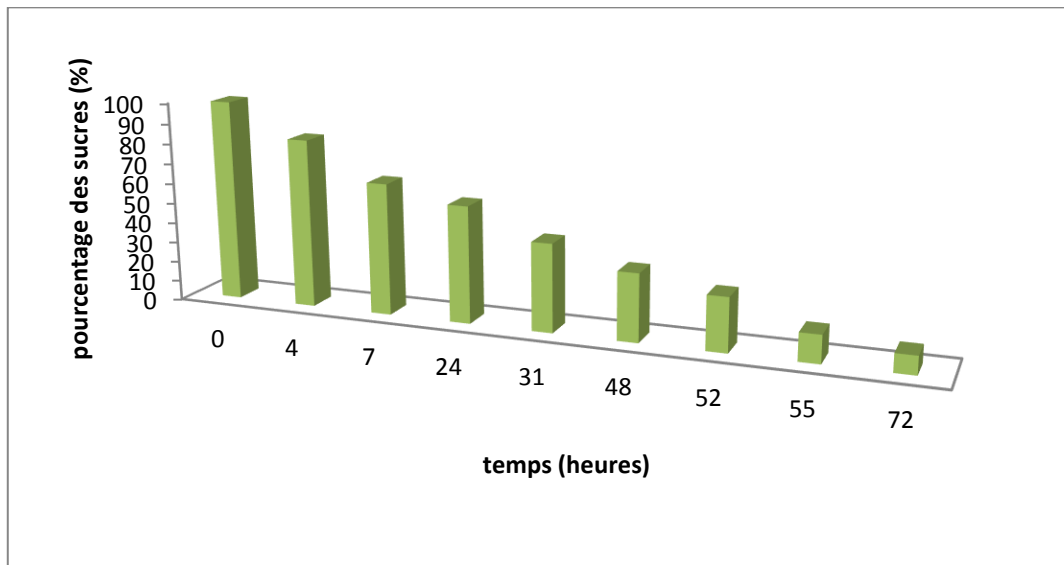


**Figure 5.5** : Evolution des sucres réducteurs du marc de raisin à température ambiante

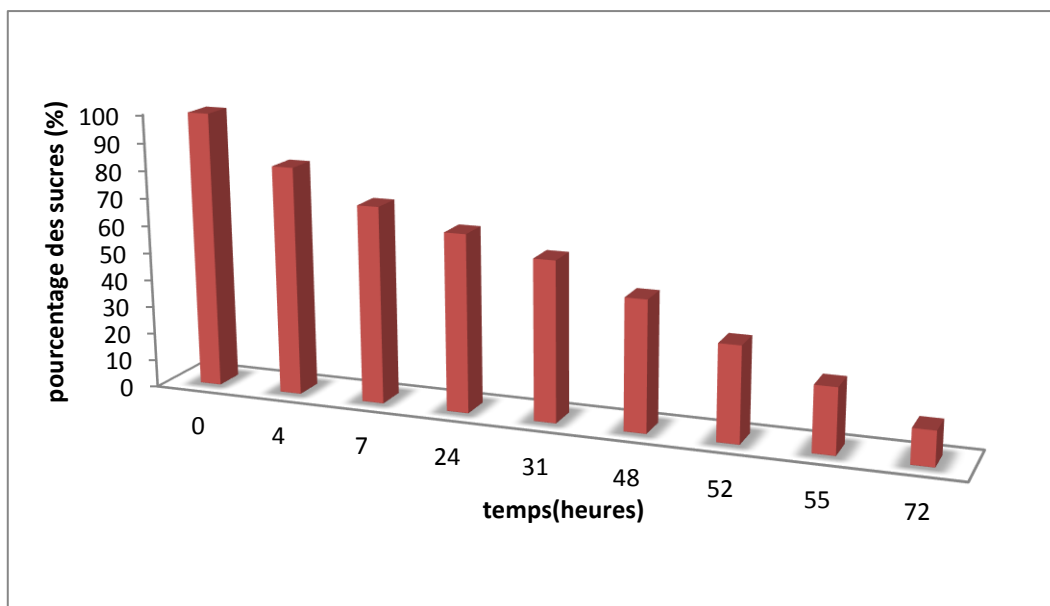


**Figure 5.6** : Evolution des sucres réducteurs durant la fermentation avec *S. cerevisiae* à 25°C





**Figure 5.7 :** Evolution des sucres réducteurs durant la fermentation avec *S. cervicea* à 30°C



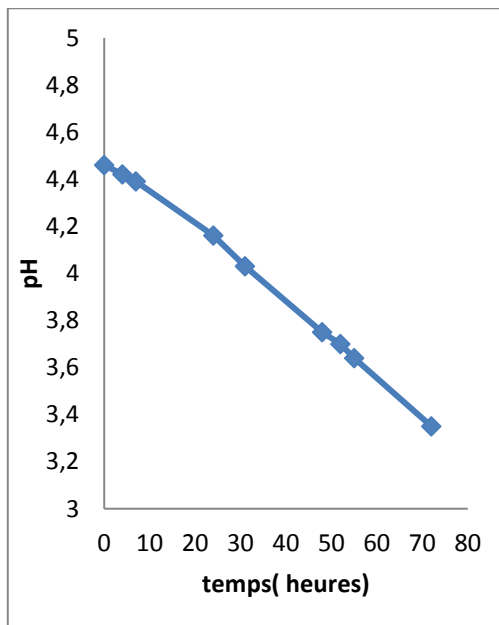
**Figure 5.8 :** Evolution des sucres réducteurs durant la fermentation avec la levure isolée à 30°C.

D'après les figures, nous remarquons que les teneurs en sucres réducteurs résiduels de la fermentation avec la levure *S. cerivisiae* varient entre 2,03 g/l à une température ambiante, 3,02 g/l à une température de 25°C, 1.68 g/l à une température de 30°C. La concentration des sucres réducteurs résiduelle de la fermentation avec la levure isolée est égale 2,32 g/l.

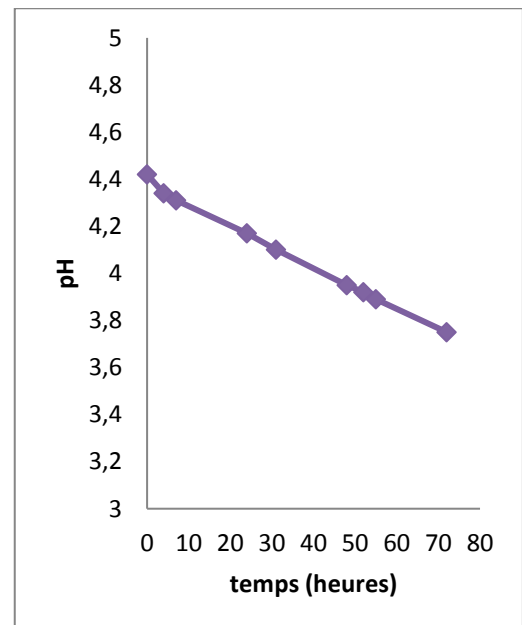
D'après ces observations, on peut dire que la dégradation des sucres réducteurs au cours de la fermentation est presque totale pour tous les essais, cela signifie que les sucres réducteurs ont été consommés complètement par les deux levures testées pour produire le bioéthanol.

#### 5.4. Evolution du pH durant la fermentation alcoolique :

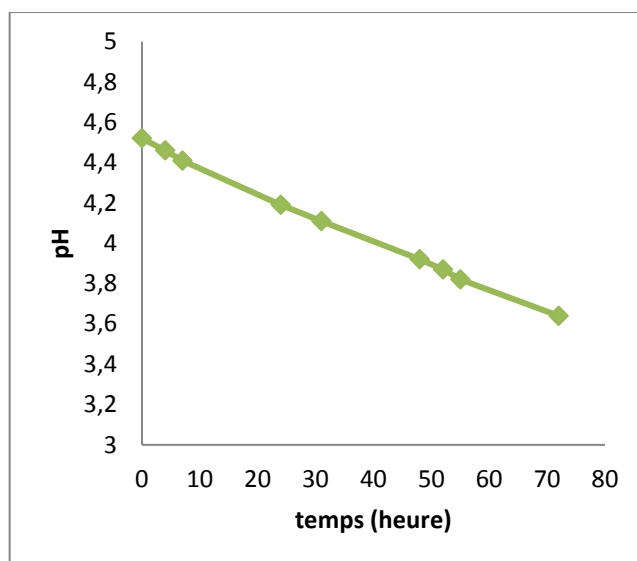
Au cours de la fermentation alcoolique on détermine le pH en fonction du temps :  
 Au cours de la fermentation alcoolique, le métabolisme de la levure induit un changement perpétuel du milieu. Ainsi, la consommation des substrats carbonés et azotés s'accompagne de la production de métabolites acides ou alcools. Parallèlement, on observe une évolution du pH comme représenté sur les figures ci-dessous



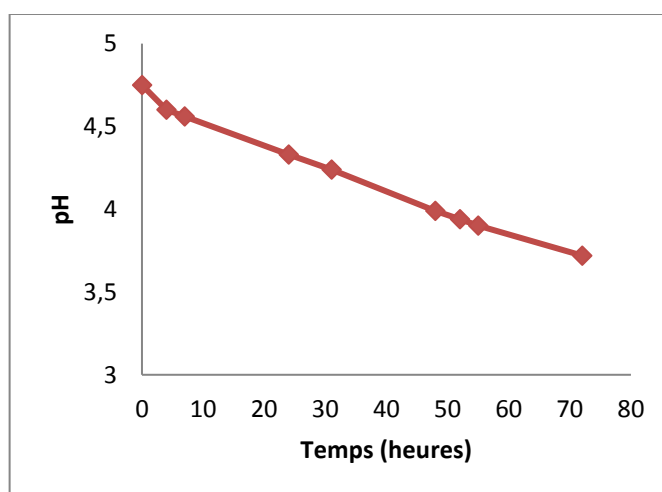
**Figure 5.9 :** Evolution du pH de la fermentation de *S. cerivicea* à T ambiante



**Figure 5.10:** Evolution du pH de la fermentation de *S. cerivicea* à 25°C



**Figure 5.11:** évolution du pH de la fermentation de *S. cervicea* à 30°C



**Figure 5.12:** Evolution du pH de la fermentation de la levure isolée à 30°C

La détermination du pH est essentielle pour le contrôle du marc, avant et au cours de la fermentation produit par la levure *saccharomyces cereviciae* et celle isolée nous renseigne sur l'activité métabolique des levures au cours de la transformation des sucres en alcool.

L'équation globale de la réaction de la levure *saccharomyces cerevisiae* s'écrit :



Nous remarquons que durant la fermentation alcoolique, l'évolution classique du pH présente une diminution du pH jusqu'à l'arrêt de la fermentation. Les moûts de raisin ont un pH acide. Ce caractère acide est le plus souvent lié à la présence d'acides organiques dont les principaux sont l'acide tartrique, l'acide malique et l'acide citrique. Au cours de la fermentation alcoolique, certains composés subissent très peu ou pas de changement. C'est le cas de l'acide tartrique, de l'acide malique et de l'acide citrique. D'autres composés comprenant des acides organiques et des alcools sont produits par la levure qui on a isolée.

### 5.5. Evolution de degré alcoolique durant la fermentation alcoolique :

Le degré alcoolique correspond à la proportion d'alcool contenue dans le moût de marc de raisin. Ce terme est donc employé après la fermentation alcoolique au cours du temps.

Les résultats de l'évolution de degré alcoolique sont déterminés dans la figure (5.13) :

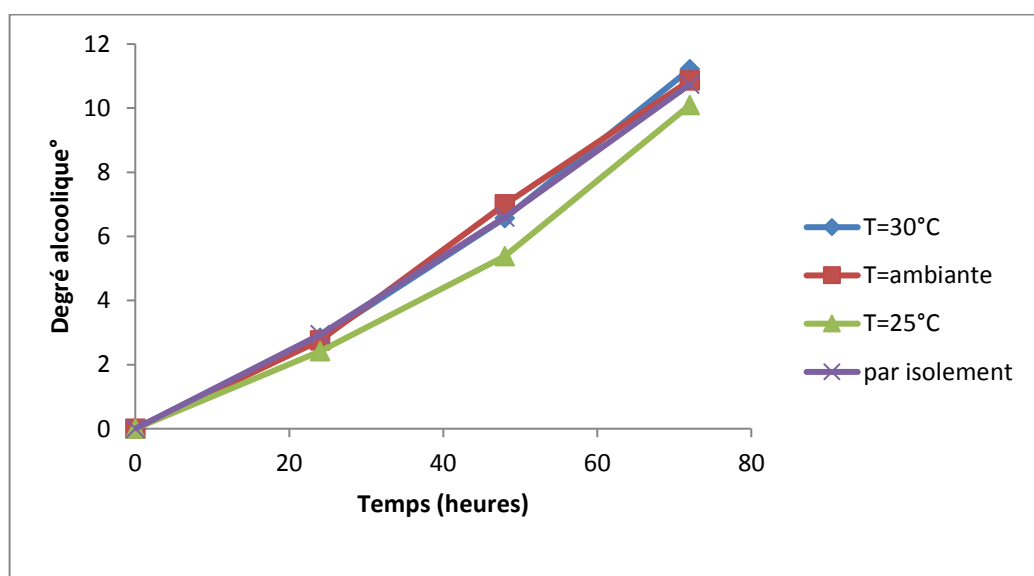


Figure 5.13: L'évolution du degré alcoolique des 4 essais

L'évolution du degré alcoolique illustré sur la figure (5.13) qui montre que l'alcool augmente en fonction du temps avec un degré élevé à 30°C par rapport aux autres cas.

### 5.6. Rendement de l'éthanol

Le rendement d'alcool est considéré comme un déterminant de la qualité d'un vin.

A la fin de la fermentation alcoolique, l'éthanol produit par *Saccharomyces cerevisiae* a été distillé deux fois. Les résultats étaient comme suit :

**Tableau 5.2. :** Le rendement alcoolique du marc de raisin

Quantité du jus fermenté	Quantité d'alcool hydraté
1000 ml du jus de marc de raisin à 30°C	32 ml
1000 ml du jus de marc de raisin à température ambiante « laboratoire »	28 ml
1000 ml du jus de marc de raisin à 25°C	19 ml
1000 ml du jus de marc de raisin par isolement « T=30°C »	25 ml

### 5.7. Indice de réfraction « Vérification de la pureté »

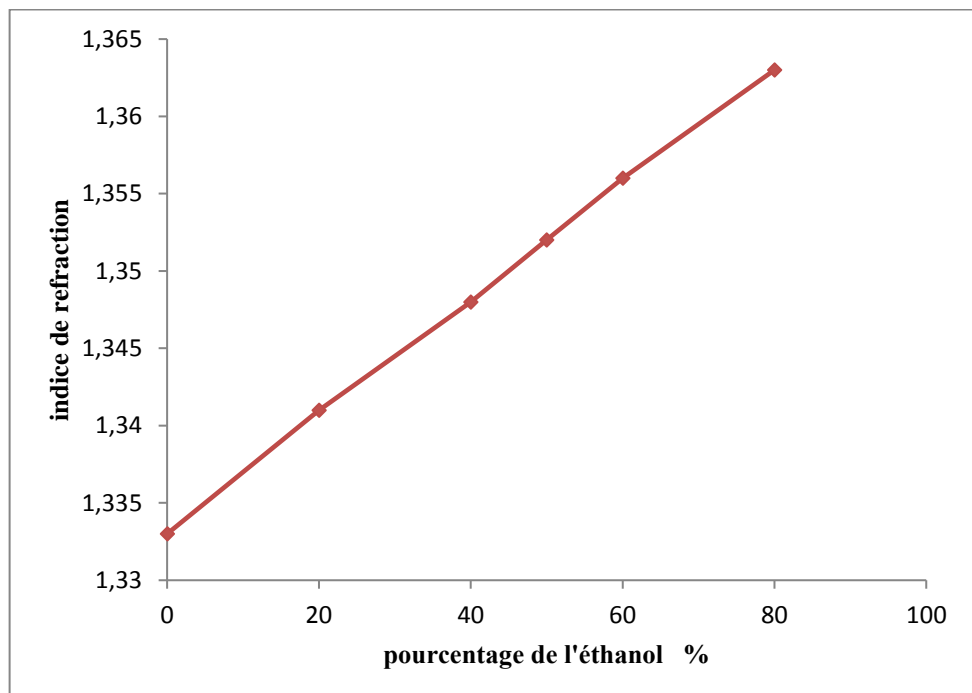
La mesure de l'indice de réfraction permet de vérifier la pureté de l'éthanol et déterminer la concentration d'éthanol recueilli.

Les résultats de l'indice de réfraction et le pourcentage de l'éthanol sont présentés dans le tableau (5.3) suivant :

**Tableau 5.3 :** L'analyse de l'indice de réfraction

N° de distillation	Indice de réfraction	Pourcentage d'éthanol
Marc de raisin à 30°C	1.352	50%
Marc de raisin à T° ambiante	1.350	45%
Marc de raisin à 25°C	1.348	40%
Marc de raisin par l'isolement	1.351	47.5%

La courbe d'étalonnage (5.14) nous a permis de déduire le pourcentage d'éthanol de la solution de distillation obtenue à partir de marc de raisin.

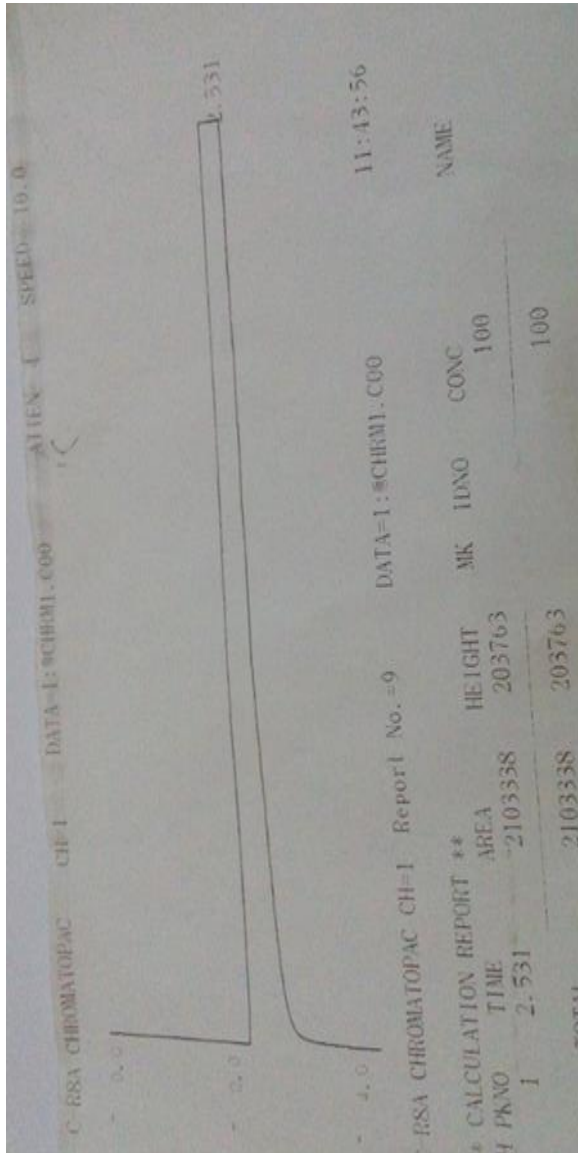


**Figure 5.14:** La courbe d'étalonnage de l'indice de réfraction

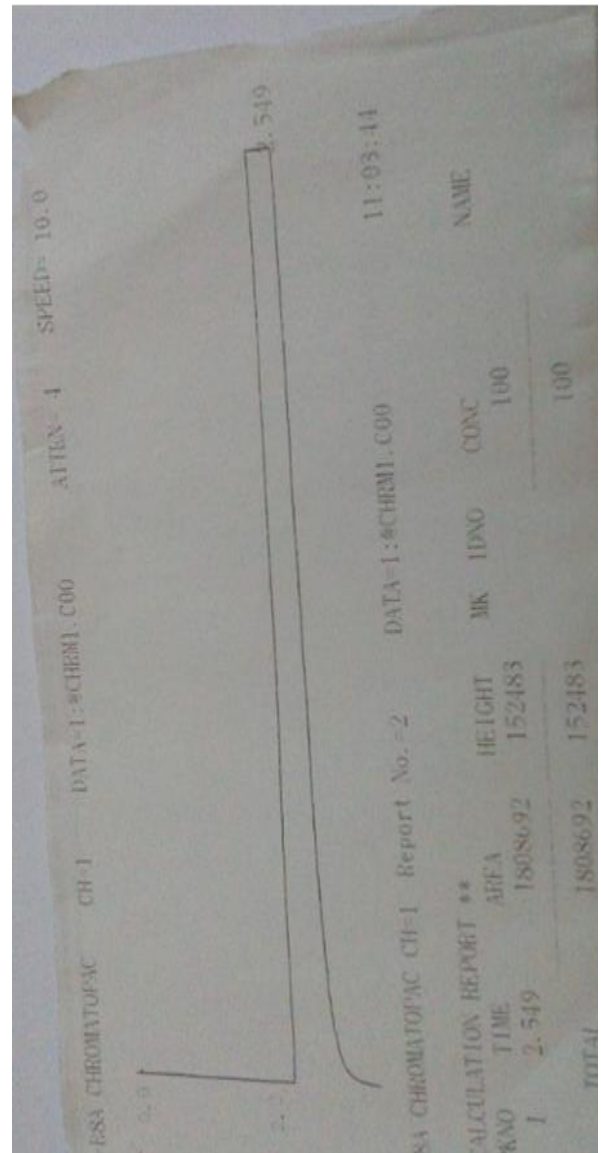
### 5.8. Identification du bioéthanol par chromatographie en phase gazeuse :

Les résultats de l'analyse chromatographique CPG de l'éthanol à 99,8 % (étalon) et du marc de raisin sont montrés dans les figures suivantes :

Afin de vérifier la pureté d'éthanol produit par la levure *saccharomyces cerevisiae*



**Figure 5.15:** Chromatogramme de l'éthanol absolu (étalon)



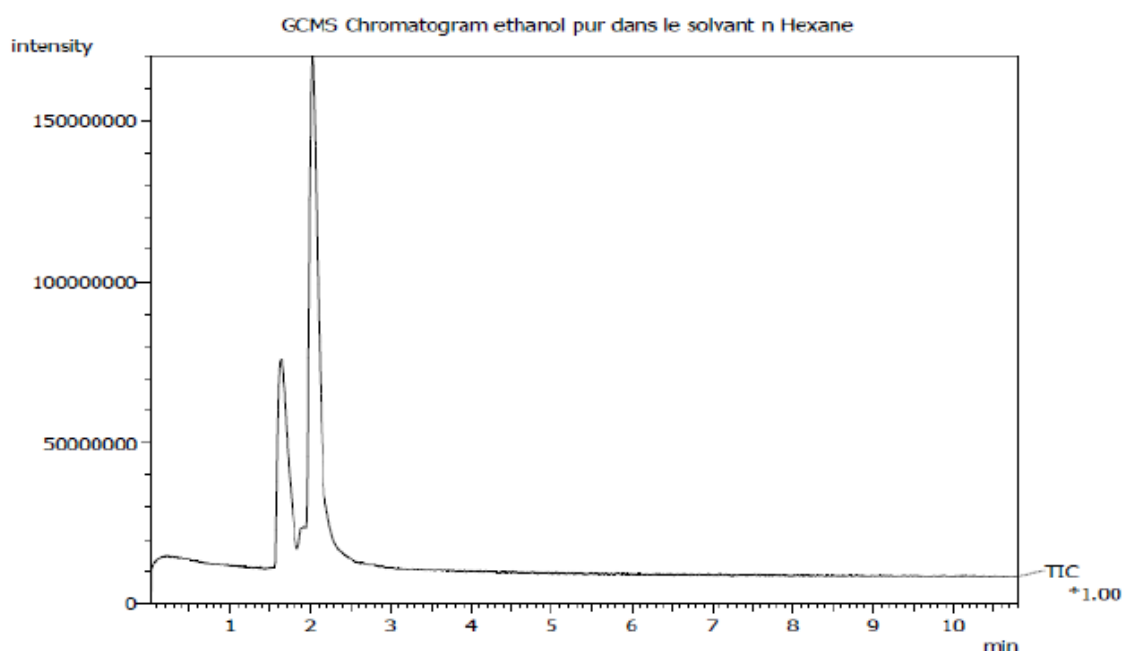
**Figure 5.16 :** Chromatogramme du distillat alcoolique du Marc de raisin

D'après le chromatogramme obtenu, le distillat est d'une pureté très élevée, ce qui donne une importance particulière aux substrats et à la levure utilisées. L'identification de notre bioéthanol se fait à travers l'identification de son étalon, pour notre cas d'étude le temps de rétention ( $t_R$ ) des deux chromatogrammes est quasi proche, car il représente une valeur de 2,531 et 2,549 respectivement pour l'éthanol absolu et le bioéthanol.

### 5.9. Analyse par CG-MS :

L'identification du bioéthanol se fait à travers une analyse CG-MS, les résultats sont traité par un logiciel informatique de base de données CG/MS SOLUTION.

Les résultats obtenus sont montrés dans les deux figures suivantes :

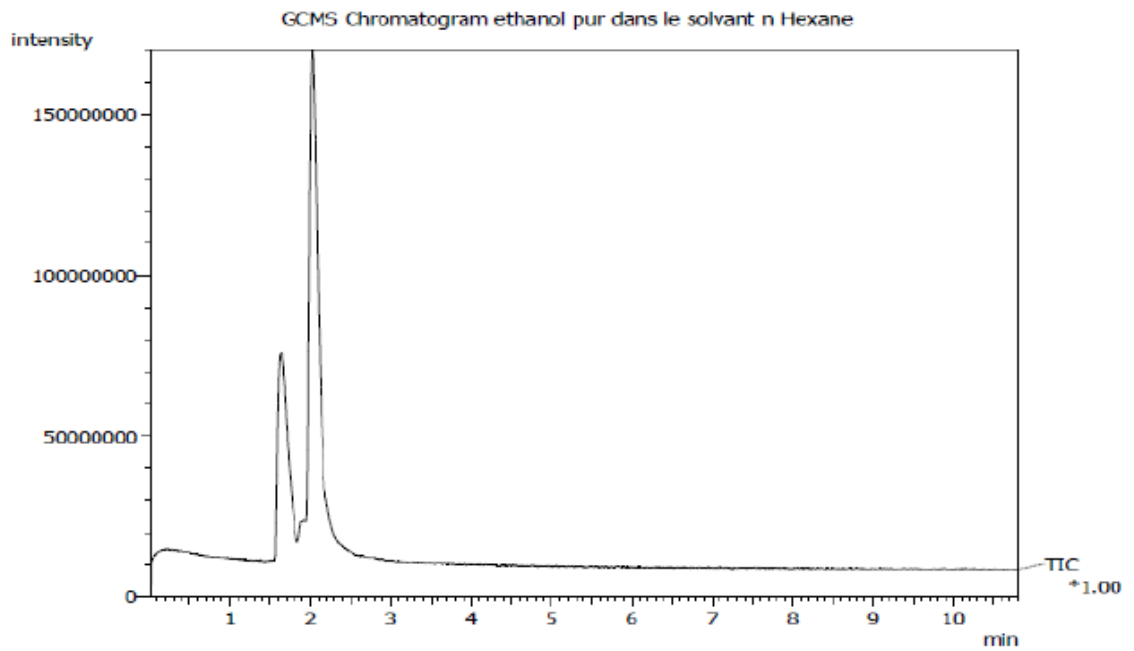


**Figure 5.17:** Chromatogramme de l'éthanol pur

Pour une analyse qualitative quelques goutte d'éthanol à 96% de pureté a été dilué dans un solvant n-Hexane pour améliorer la séparation et protéger l'appareillage.

La figure (5.17) représente le chromatogramme traité par le logiciel informatique de base de données CG/MS SOLUTION ce dernier montre deux pics majoritaires à  $t_R=1.61$  min et  $t_R=2.25$  min représentent respectivement l'éthanol et le n-Hexane.





**Figure 5.18** : Chromatogramme du distillat alcoolique du marc de raisin.

Le traitement du chromatogramme par le logiciel a révélé la présence de l'éthanol a  $t_R=1.61$  a un pourcentage de 85% l'analyse a révélé aussi la présence du 1-Butanol ( $C_4H_{10}O$ ) correspond au deuxième pic proche du premier avec un  $t_R= 3.18$  min cela est dû à une fermentation incomplète.

## CONCLUSION GENERALE

L'éthanol ou bioéthanol est un alcool qui s'obtient par la fermentation des sucres provient de plusieurs espèces végétales, comme la canne à sucre. La fabrication de biocarburants de première génération passe d'abord par l'obtention de deux produits de bases :

- d'une part éthanol « alcool » qui sera incorporé à l'essence
- d'une part, les huiles végétales qui seront incorporé au gazole.

Ces biocarburants entrent en concurrence directe avec la chaîne alimentaire, ils sont produits à partir de matières premières qui peuvent utilisées dans une chaîne alimentaire, animale ou humaine.

Aujourd'hui, cette génération est produite à l'échelle industrielle.

La présente étude a pour el but la valorisation d'un déchet issu d'une biomasse de marc de raisin en produisant de bioéthanol de la première génération.

A travers cette étude nous avons essayé d'optimiser les conditions de production de bioéthanol à partir du marc de raisin par la levure *Saccharomyces cerevisiae* et celle isolée du jus de marc de raisin.

Pour l'étude du sujet, deux méthodes ont été utilisées : la première méthode a pour la fermentation alcoolique été utilisée à la présence de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à des différentes températures (ambiante, 25°C, 30°C) qui a été utilisée pour démontrer que la température 30°C permettait un développement plus rapide de la biomasse en phase exponentielle, toutefois, pour atteindre des concentrations élevées en éthanol, et le taux des sucres réducteurs et diminue 1,68 g/l ainsi que une diminution de pH =3.64.

La seconde méthode appliqué est une fermentation alcoolique par isolement et sélection des souches levuriennes productrices qu'ils ont isolé à partir du marc de raisin, les résultats de cette méthode montre une diminution des pH=3.72 de la concentration des sucres réducteurs 2.32g /l cette fermentation consistait en 72 heures et a été reproduite avec une concentration des sucres égale à 2.32g/l.

Les déchets de raisins constituent un substrat de choix pour la mise au point de substances à forte valeur ajoutée, entre autres alcool éthylique et la mise au point d'un procédé de fabrication d'alcool permettra sans nul doute une meilleure maîtrise du procédé industriel.

Ce procédé a le mérite d'être à la fois dépolluant, car il réduit énormément la quantité de déchets solides et valorisant par la production des substances simples qui peuvent être considérée comme une très bonne forme d'énergie renouvelable, propre et ne génère pas de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) supplémentaire dans l'atmosphère.

Ce genre de procédé peut aussi améliorer les revenus des unités industrielles des pays producteurs de déchets et permettre le développement d'activités industrielles propres qui créeraient des opportunités d'emploi et offriraient une meilleure compétitivité sur le marché international.

Dans cette étude, nous proposons quelques recommandations :

- ✓ Application de cette technique sur des variétés précises.
- ✓ Amélioration le milieu réactionnel (jouer sur les concentrations des sels minéraux, des sucres, et la concentration du marc de raisin).
- ✓ Sélectionner les levures qui sont dans le marc de raisin (sélectionner la meilleure levure qui nous a donné une bonne fermentation).
- ✓ Application cette technique à l'échelle semi-pilot une suivie d'une étude technico-économique.

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITÉ de BLIDA 1**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie des Procédés**



# **Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER EN GENIE DES PROCEDES**

**Spécialité :** Procédés de Traitement des Effluents et Protection de  
l'Environnement (P.T.E.P.E)

Intitulé du mémoire

***Optimisation des conditions de production  
d'un bioéthanol à partir du marc de raisin  
par la levure *Saccharomyces cerevisiae****

**Présenté par :**

***Messaoui Hanane***

***Promotrice : Dr Laribi Hassiba***

***Co-promoteur : Pr ELhadi Djamel***

***Année Universitaire : 2016/2017***

## Remerciements

*Au premier lieu, je tiens à remercier le bon dieu de m'avoir donné le courage et la volonté de terminer ce travail. Je remercie ma mère est un trésor précieux pour moi. Je suis le fruit de ton amour malgré les épreuves que nous avons connues ensemble, tu es restée forte et réconfortante. Tu as toujours été une « mère » poule qui protège ses poussins des risques et dangers de l'existence.*

*Je commence par exprimer mon admiration à M<sup>me</sup> HABCHI LARJBI HASSIBA, ma promotrice. Je suis reconnaissante de vous avoir croisé dans ma vie. Ce fut lors d'un cours à la fac, pendant lequel je ne pouvais pas arrêter de vous écouter parler avec tant de passion de la Microbiologie. Merci pour m'avoir donné l'occasion de continuer. Merci parce que j'ai senti dans chaque regard un encouragement et une grande confiance.*

*Vous étiez toujours présente pour m'écouter, pour réfléchir avec moi, et pour m'assurer toute aide possible. Mais la thèse n'a pas été seulement ce que vous m'avez partagé. Je n'oublierai jamais votre soutien pendant les moments difficiles, qui ne manquaient jamais.*

*Je tiens à remercier mon Co-promoteur Monsieur ELHADI.*

*Je remercie tous les membres du jury pour avoir bien voulu donner de leur temps pour lire ce travail et faire partie des examinateurs. Certains ont dû prendre en compte de se déplacer de leur endroit de travail. Qu'ils en soient particulièrement remerciés.*

*Je remercie aussi l'ensemble des enseignants de département de chimie industrielle qui ont contribué à notre formation.*

*Je remercie également toutes l'ingénieures de laboratoires : Nawel, Nesrine ,Zahira, Fatiha, Karima, Nafissa , Rachida et Tahar , Mourad, Zoubir, rachid.*

*Merci à ma partenaire, ma famille et à mes amis encore présents ou disparus, proches ou parfois trop éloignés, merci pour tout. Cela serait beaucoup trop long à détailler je me contenterais donc d'un grand merci à tous.*

*Seghour Abderraouf Ce message fait de mille mercis est une preuve d'amitié. Te dire merci est une manière simple et directe de te dire ma reconnaissance. Merci pour ton humanité, ton altruisme et ton souci de l'autre Que tes belles actions te soient rendues au centuple.*

## Dédicaces

*Je dédie ce travail :*

*A ma mère, qui m'a encouragé à aller de l'avant et qui m'a donné tout son amour pour reprendre mes études.*

*A mon ange mon frère Ismail qui je le remercie de m'avoir soutenu dans les moments difficiles je te remercie de tout mon cœur.*

*A mon grand père et ma grand mère.*

*A mes cousins et cousines « Riad , Ali , Anis , Nawel , Narimene , Mohamed , Wassim , Said , Mehdi , Younes , Islem , le petit Anis , Arwa , Lina , Firas »*

*A tous les membres de ma famille pour leurs sacrifices, leurs encouragements, et pour leur soutien matériel et moral tout au long de ma formation.*

*A mes amis qui n'ont cessé de m'aider et de me conseiller pour accomplir ma mémoire de fin d'étude.*

*A mes adorables : Mimi, Amina, Sabrina, Manel, Nadjet, Meriem, Karima, Souad, Fatma zohra. Habiba.*

*A tous ceux qui m'ont aidé de prêt ou de loin.*

## RESUME

L'éthanol est un composé à usages très variés allant de la chimie à l'agroalimentaire.

Cependant, la croissance actuelle du marché se fait essentiellement autour de l'utilisation de l'éthanol en tant que carburant. L'objectif de ce projet est d'optimiser les paramètres de production d'un bioéthanol à partir du marc de raisin.

Le moût issu de marc de raisin, de par sa richesse en sucres simples constitue un milieu favorable pour le développement des levures de l'espèce « *Saccharomyces cerevisiae* ».

La présente étude a pour but la valorisation de cette biomasse en produisant du bioéthanol de première génération.

Les pourcentages d'éthanol produits par fermentation du jus de marc de raisin avec *Saccharomyces cerevicea* sont de 45%, 40% et 50% à T° ambiante, à 25° et 30°C respectivement. Par contre celui de la levure isolée à partir du jus de marc de raisin est de 47.5 % à 30°C.

L'identification du bioéthanol par CPG a montré une pureté considérable à travers son étalon une valeur de rétention ( $t_R$ ) 2,531 et 2,549.

En conclusion, ce travail a permis de mettre au point un procédé biotechnologique pour valoriser la biomasse solide, qui permet non seulement de réduire l'impact environnemental, mais aussi de diminuer les coûts et d'ajouter une valeur socio-économique à ces déchets.

**Mots clés :** éthanol, optimisation, marc de raisin, moût, *Saccharomyces cerevisiae*, pureté, valorisation.



## Abstract

Ethanol is a compound with a wide range of uses ranging from chemistry to agri-food. However, the current growth of the market is essentially around the use of ethanol as fuel. The objective of this project is to optimize the production parameters of a bioethanol from grape marc.

The grape marc wort, because of its richness in simple sugars, constitutes a favorable environment for the development of yeasts of the species "*Saccharomyces cerevisiae*".

The aim of this study is to exploit this biomass by producing first generation bioethanol.

The percentages of ethanol produced by fermentation of the grape marc juice with *Saccharomyces cerevicea* are 45%, 40% and 50% at room temperature, at 25 ° and 30 ° C., respectively. On the other hand, that of the yeast isolated from grape marc juice is 47.5% at 30 ° C.

The identification of the bioethanol by GPC showed a considerable purity through its standard a retention value (tR) 2.531 and 2.549.

In conclusion, this work has led to the development of a biotechnological process to develop solid biomass, which not only reduces the environmental impact, but also reduces costs and adds socio-economic value to the waste.

**Key words:** ethanol, optimization, grape marc, must, *Saccharomyces cerevisiae*, purity, valorization.

## ملخص

يثانول هو مركب مع مجموعة واسعة من الاستخدامات تتراوح من الكيمياء إلى الأغذية الزراعية ومع ذلك، فإن النمو الحالي للسوق هو أساسا حول استخدام الإيثانول كوقود. والهدف من هذا المشروع هو تحسين معلومات الإنتاج من الإيثانول الحيوي من مارك العنب. نبتة مارك العنب، بسبب ثراها في السكريات البسيطة، يشكل بيئة مواتية لتطوير الخمائر من الأنواع "ساشارومييسز سيريفيسياي".

والهدف من هذه الدراسة هو استغلال هذه الكتلة الحيوية من خلال إنتاج الجيل الأول من الإيثانول الحيوي إن نسبة الإيثانول الناتج عن تخمير عصير مارك العنب مع سكرومييسز سيريفيسيا هي 45% و 40% و 50% في درجة حرارة الغرفة عند 25 درجة و 30 درجة مئوية على التوالي. من ناحية أخرى، أن الخميرة معزولة عن عصير مارك العنب هو 47.5% في 30 درجة مئوية

أظهر تحديد الإيثانول الحيوي من قبل غك نقاء كبير من خلال معياره قيمة الاحتفاظ (تر) 2.531 و 2.549 وفي الختام، أدى هذا العمل إلى تطوير عملية التكنولوجيا الحيوية لتعزيز الكتلة الحيوية الصلبة، التي لا تقلل فقط من الأثر البيئي، ولكن أيضا يقلل من التكاليف ويضيف القيمة الاجتماعية والاقتصادية لهذه النفايات الكلمات الرئيسية: الإيثانول، الأمثل، مارك العنب، يجب، ساشارومييسز سيريفيسياي، نقاء، تثمين

## **LISTE DE TABLEAUX**

**Tableau 1.1** : Propriétés physico-chimiques principales de l'éthanol.

**Tableau 1.2** : Les avantages et les inconvénients de l'utilisation du bioéthanol.

**Tableau 2.1** : Composition chimique de différents types de marc.

**Tableau 3.1**: Les avantages et les inconvénients de la fermentation à haute densité.

**Tableau 4.1** : Réactifs utilisés.

**Tableau 5.1** : Résultats physico-chimiques du Marc de raisin.

**Tableau 5.2.** : Le rendement alcoolique du marc de raisin.

**Tableau 5.3** : L'analyse de l'indice de réfraction.

## Liste des figures

**Figure 1.1** : Le bioéthanol de la production à l'utilisation.

**Figure 1.2** : La production de l'éthanol « première génération ».

**Figure 1.3** : La production d'éthanol par la voie biochimique.

**Figure 1.4** : La structure de la cellulose.

**Figure 1.5** : Filières d'utilisation du bioéthanol.

**Figure 2.1** : Marc de raisin originale.

**Figure 2.2** : Schéma de valorisation de raisin.

**Figure 2.3** : Schéma de valorisation de marc de raisin.

**Figure 3.1**: La fermentation alcoolique.

**Figure 3.2**: Le bourgeonnement de *Saccharomyces cerevisiae*.

**Figure 3.3**: Le génome de *Saccharomyces*.

**Figure 3.4** : La glycolyse.

**Figure 3.5** : Le cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique).

**Figure 3.6**: Nœud métabolique du pyruvate et l'acétaldéhyde.

**Figure 4.1** : Marc de raisin originale.

**Figure 4.2** : Dispositif de la fermentation alcoolique.

**Figure 4.3** : Séchage de marc de raisin originale.

**Figure 4.4** : Broyage et hydratation du marc de raisin originale.

**Figure 4.5** : Isolement des lèveurs.

**Figure 4.6** : Préparation de l'inoculum.

**Figure 4.7** : Dosage des sucres réducteurs.

**Figure 4.8** : La cendre du marc.

**Figure 4.9 :** Four à moufle.

**Figure 4.10 :** La distillation alcoolique.

**Figure 5.1:** Evolution de la croissance de *S. cerevisiae* en fonction du temps à T° ambiante.

**Figure 5.2 :** Evolution de la croissance de *S. cerevisiae* en fonction du temps à 25°C.

**Figure 5.3 :** Evolution de la croissance de *S. cerevisiae* en fonction du temps à 30°C.

**Figure 5.4 :** Evolution de la croissance de la levure isolée en fonction du temps à 30°C.

**Figure 5.5 :** Evolution des sucres réducteurs du marc de raisin à température ambiante.

**Figure 5.6 :** Evolution des sucres réducteurs durant la fermentation avec *S. cerevisiae* à 25°C.

**Figure 5.7 :** Evolution des sucres réducteurs durant la fermentation avec *S. cerevisiae* à 30°C.

**Figure 5.8 :** Evolution des sucres réducteurs durant la fermentation avec la levure isolée à 30°C.

**Figure 5.9 :** Evolution du pH de la fermentation de *S. cerevisiae* à T ambiante.

**Figure 5.10:** Evolution du pH de la fermentation de *S.cerevisiae* à 25°C.

**Figure 5.11:** évolution du pH de la fermentation de *S. cerevisiae* à 30°C.

**Figure 5.12:** Evolution du pH de la fermentation de la levure isolée à 30°C.

**Figure 5.13:** l'évolution du degré alcoolique des 4 essais.

**Figure 5.14:** La courbe d'étalonnage de l'indice de réfraction.

**Figure 5.15:** Chromatogramme de l'éthanol absolu (étalon).

**Figure 5.16 :** Chromatogramme du distillat alcoolique du Marc de raisin.

**Figure 5.17:** Chromatogramme de l'éthanol pur.

**Figure 5.18 :** Chromatogramme du distillat alcoolique du marc de raisin.

# LISTE DES ABREVIATIONS

- ETBE: Ethyle-Tertio-Butyl-Ether.
- DO : Densité Optique.
- MS : Matière Sèche
- MAT : Matières Azotées Totales
- CB : Cellulose Brute
- MM : Matière Minérale
- MG : Matière Grasse
- MO : Matière Organique

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] Ademe (2010). Analyses de Cycle de Vie appliquées aux biocarburants de première génération consommés en France (Etude réalisée pour le compte de l'Agence de l'environnement et de la Maîtrise de l'Energie, du Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer, du Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche, et de FranceAgriMer) par BIO Intelligence Service.
- [2] Laurent P. *et al* 2011., Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. The Royal Society of Chemistry 2011.
- [3] Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 412–422.
- [4] Julien Riess Intensification de la brique « fermentation alcoolique » de substrats betteraviers pour la production d'éthanol thèse 2012.
- [5] Pohorecky et Brick, 1988; Larpent et al, 1992.
- [6] Dossier technique filière de bioéthanol sur le site : <http://data0.eklablog.net/ocan/perso/cours%20et%20tp%20en%20ligne/bioethanol.pdf>
- [7] France Agrimer, 2011, L'économie sucrière Campagne 2009/10, Juin 2011, Edition l'arborial.
- [8] Renewable fuels association, 2008, changing the climat: Ethanol industry outlook 2008. [http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/RFA\\_Outlook\\_2008.pdf](http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/RFA_Outlook_2008.pdf). Retrieved 2008-05-10. Source: F.O. Licht (dernière consultation 09/03/2010).
- [9] Negro, M. (1991). Degradacion Enzimatica de la Biomasa de *Onopordum nervosum* bois. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia.
- [10] Fengel, D, & Wegener, G. (1984). *Wood. Chemistry, ultrastructure and reactions*. Berlin: Gruyter & Co.

- [11] Davila, G, & Vasquez-Duhalt, R. (2001). Enzymas Ligninolíticas fungicas para fines ambientales. Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Facultad de Médecine, Département de Biochimie.
- [12] Oliva, D. (2003). Efecto de los Productos de Degradacion Originados en l'Explosion a Vapor de Biomasa de Chopo sobre Kluyveromyces marxianus. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Sciences Biologiques, Département de Microbiologie.
- [13] Sanchez O. J., Cardona C. A., 2008, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, Bioresour. Techno. 99, p. 5270-5295
- [14] M. Ben Chaabane, intensification de la production d'éthanol biocarburant dans un bioréacteur avec recyclage cellulaire. Thèse
- [15] Health effect institute, 1996, the potential health effects of oxygenates added to gasoline: a review of the current literature. Health Effect Institute, Cambridge.
- [16] Gaffney J. S. ET Marley N. A., 2009, the impacts of combustion emissions on air quality and climate – From coal to biofuels and beyond, Atmos. Environ. 43, p. 23–36.
- [17] Morrison D., 2006, Ethanol fuel presents a corn-undrum. University of Minnesota. Retrieved 2008-01-14.
- [18] Heitz Clementine., utilisation de composte de marc de raisin comme engrais et amendement en céréales a paille biologiques en Languedoc-Roussillon, mémoire fin d'étude, école nationale supérieure des sciences agronomiques de bordeaux aquitaine 1, cours du général de Gaulle-CS 40201 - 33175 GRADIGNAN cedex 2015.
- [19] Larwence, A. ; Hammouda, F. ; Salah, A., 1984.Valeur alimentaire des marcs de raisin.III-Role des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton : effet d'une addition de polyéthylène glycol 4000. Ann. Zootech., 33 :533-543.
- [20] J.-L. (ed.), Alibés X. (ed.). Fourrages et sous-produits méditerranéenes. Zaragoza : CIHEAM, 1991. p. 89 -99.
- [21] Reyne, Y. ; Garamboi, X ; 1977.valeur alimentaire chez le mouton de l'ensilage de marc de raisin épuisé .Ann .Zootech, 26 :471-479.



- [22] Larwence, A., 1983. Recherche sur les facteurs limitants de la faible valeur nutritive des marcs de raisin pour le ruminant : procédés d'amélioration. Thèse de doctorat et sciences, université de Dijon, 248 p.
- [23] Larwence, A.; Yahiaoui, A., 1983. Valeur alimentaire des marcs de raisin. I-influence des 8 sources azotées de complémentation sur l'utilisation digestive par le mouton de marc de raisin épuisé et ensilé. Ann. Zootech., 32 :357-370.
- [24] Larwence, A. ; Hammouda, F. ; Gaouas, Y., 1985. Valeur alimentaire des marcs de raisin. IV-Effet de différents niveaux de concentre de complémentation sue la digestibilité chez le mouton e rations de marcs traitées ou non à la soude. Ann. Zootech., 34 :389-400.
- [25] Arrêté du 17 août 2011 relatif à la distillation des sous-produits de la vinification prévue à l'article 103 ter viciés du règlement (CE) n°1234/2007 du Conseil du 22 octobre 2007 modifié.
- [26] Campbell N.A. et Reece J.B., 2004, Biologie, Edition du Renouveau Pédagogique inc., p.168-181.
- [27] Kherraz Zineb et Lorbi Sara(2015)- Contribution à l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur l'activité amylolytiques des levures.
- [28] Site d'internet : [<https://fr.scribd.com/document/90882437/UElevurepart1-PDF>].
- [29] « *Saccharomyces cerevisiae* Genome Overview | SGD » sur [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org) (consulté le 14 mars 2016).
- [30] Lei F., Rotboll M. Et Jorgensen S. B., 2001, A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biotechnology. 88, p. 205–221.
- [31] Ratlegde C., 1991, Yeast Physiology: a micro synopsis. Bioprocess Engineering 6, p. 195-203.
- [32] Petrik M., Kappeli O. et Fiechter A., 1983, An expended concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short- and long-term regulation, J. Gen. Microbiol., 129, p. 43-49.

- [33] Das Neves M. A., Kimura T., Shimizu N. et Shiba K., 2006, Production of Alcohol by Simultaneous Saccharification and fermentation of Low-grade Wheat Flour, Braz. Arch. Bio. Technol. Vol.49, n. 3, p. 481-490.
- [34] Bvochora J.M., Read J.S. et Zvauya R., 2000, Application of very high gravity technology to the co-fermentation of sweet stem sorghum juice and sorghum grain, Ind. Crop. Prod. 11, p. 11-17.
- [35] Jones H. L., Margaritis A. Et Stewart R. J., 2007, The combined effects of oxygen supply strategy, inoculum size and temperature profile on very-high-gravity beer fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, J. Inst. Brew. 113, p. 168–184.
- [36] Puligundlap P., Smogrovicova D., Obulam V. S. R. and KoS., 2011, Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update; J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38, p.1133-1144.
- [37] Bataillon M, Rico A, Sablayrolls JM, Salmon JM, Barre P (1996) Early thiamine assimilation by yeasts under enological conditions : impact on fermentation kinetics. Journal of Fermentation and Bioengineering 82(2):145-150.
- [38] Bely M., Sablayrolls JM, Barre P (1990a) Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and interest. American Journal of Enology and Viticulture, 41 (4), 319-324.
- [39] Salmon JM, Vincento, Mauriciojc, Belym, Barre P (1993) Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major factor of enological fermentations. American Journal of Enology and Viticulture 44(1):56-64.
- [40] Roustan JL, Sablayrolls JM (2004) Role of trehalose and glycogen in alcoholic fermentation in wine-making conditions. Journal of Wine Research 15:189-202.
- [41] Alfenore S., Cameleyere X., Bendadis L., Bideaux C., Uribelarrea J.L., Goma G., Molina-Jouve C. et Guillouet S.E., 2004, Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process, Appl. Microbiol. Biotechnol. 63 p. 537-54.

- [42] Poilpre E., 2002, Mécanisme d'adaptation rapide en métabolisme oxydatif : implication des sucres de réserves et de la capacité respiratoire. Thèse INSA Toulouse p.32-37.
- [43] Rosenfeld E., Beauvoit B., Blondin B. et Salmon J.M., 2003, Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics, *Appl. Env. Microbiology.*, p. 113-121.
- [44] Saez C., 1986, Etude de paramètres de la fermentation alcoolique. Application à l'élaboration de pétillant de raisin. Thèse INSA Toulouse.
- [45] Kruger L., Pickerell A. T. W. et Axcell B., 1992, The sensitivity of different brewing yeast strains to carbon dioxide inhibition fermentation and production of flavour-active volatile compounds, *J. I. Brewing* vol. 98, n o 2, p. 133-138.
- [46] Ansanay-Galeote V., Blodin B., Dequin S. et Sablayrolls J.M., 2001, Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology. Let.* 23, p. 677-681.
- [47] Aldiguiet A. S., Alfenore S., Cameleyre X., Goma G., Uribelarrea J. L., Guillouet S.E. et Molina-Jouve C., 2004, Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behavior in ethanol bio-fuel production, *Bioprocess Biosys T. Eng.* 26 p. 217-222.
- [48] De Miniac M., 1988, Conduite des ateliers de fermentation alcoolique de produits sucriers (mélasse et égouts), *Ind. Aliment. Agric* Juillet/Aout, p. 675-688.
- [49] B.Word, "Alcohol production from biomass in developing countries, Word Bank. Whashington, (1980).
- [50] D. Fabienne. « Génie Fermentaire », Editeurs, pp. 226-229, Paris, (1991).
- [51] Belkacem Nacera, « contribution à l'étude des propriétés antidiabétiques de *Punica granatum* L chez les rats diabétiques ». Mémoire de magister 2009, université de Tlemcen vol 113 page 14-36.
- [52] Gail Lorenz Miller. 1972. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.

- [53] Vijay Praksh Meena, Mahesh Chand Meena, And Suman Lata Sharma “Quantitative Estimation of Some Metabolites and enzymes In insect Induced Leaf Galls of Ficus Religiosa”, International Journal of Life science and Pharma Research, (September 2014).
- [54] O.Kapeli., «régulation of carbon metabolisme in saccharomyces cerevisiae and related yeast» Adv Microbiol . and physical p 28, 181-209.(1986).
- [55] J .Folch,., M .Lees., . G.H Sloane-Stanley, J. Biol. Chem., 226, 497-509.(1957).
- [56] Handbook, 1991-1992.
- [57] S.Acourene et al. « Caractérisation physicochimique des principaux cultivars de dattes de la région des Zibans ».Recherche agronomique 9,19-30. (1997).
- [58] Anonyme., 1980. Contrôle de la levure Fraîche et sèche, Ed, Serial Blida, 5p.
- [59] M.Becker. ;K.Nehring. ; handbook der futter millerl ester band paul parey 151-153.

## Annexe 1

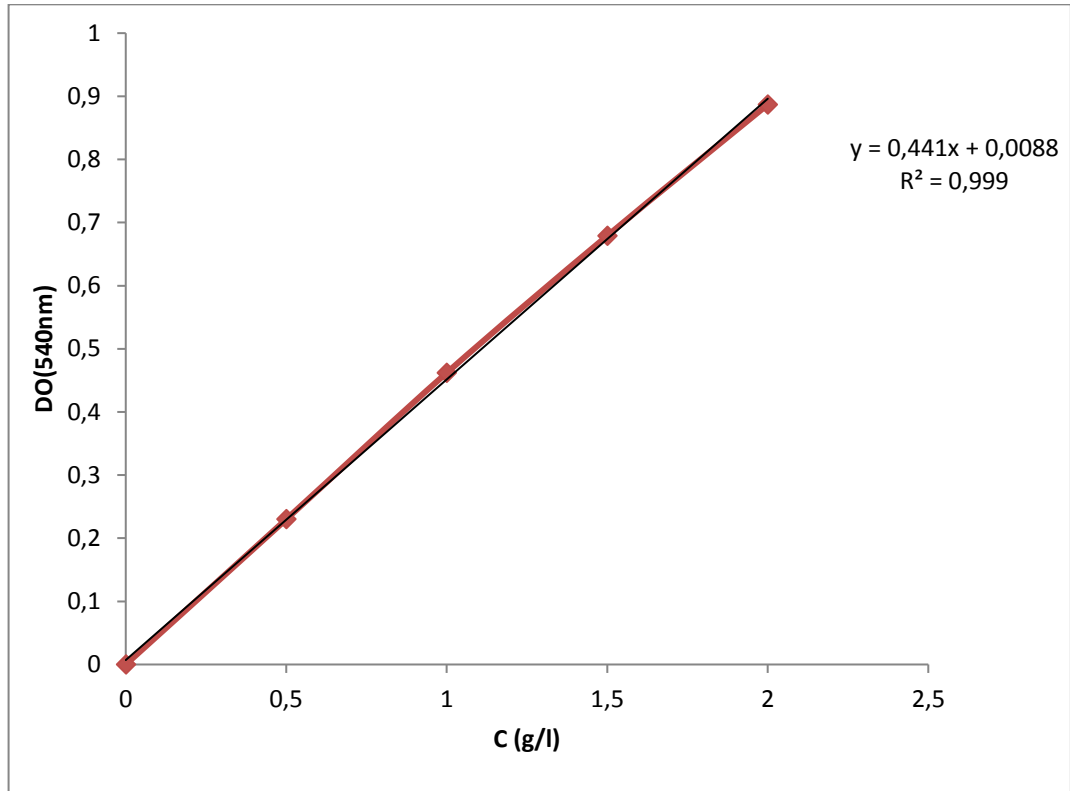


Figure : Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs

## ANNEXE 2

### Réactifs de BIURET :

CuSO<sub>4</sub>            1,5 g

EDTA              6 g

KI                  1 g

NaCl              0,9 g

Dissoudre dans 300 ml d'eau.

Ajouter une fois 300 ml de Na OH à 2,5 Mol.l<sup>-1</sup> puis compléter à 1 l.

## *Remerciement*

*Au premier lieu, je tiens à remercier le bon dieu de m'avoir donné le courage et la volonté de terminer ce travail. Je remercie ma mère est un trésor précieux pour moi. Je suis le fruit de ton amour malgré les épreuves que nous avons connues ensemble, tu es restée forte et réconfortante. Tu as toujours été une « mère » poule qui protège ses poussins des risques et dangers de l'existence.*

*Je commence par exprimer mon admiration à M<sup>me</sup> HABCHI LARIBI HASSIBA, ma promotrice. Je suis reconnaissante de vous avoir croisé dans ma vie. Ce fut lors d'un cours à la fac, pendant lequel je ne pouvais pas arrêter de vous écouter parler avec tant de passion de la Microbiologie. Merci pour m'avoir donné l'occasion de continuer. Merci parce que j'ai senti dans chaque regard un encouragement et une grande confiance.*

*Vous étiez toujours présente pour m'écouter, pour réfléchir avec moi, et pour m'assurer toute aide possible. Mais la thèse n'a pas été seulement ce que tu m'avais partagé. Je n'oublierai jamais ton soutien pendant les moments difficiles, qui ne manquaient jamais. Malgré les peines et les douleurs, un doux sentiment me rassurait, il suffisait de penser que tu es là, de compter sur toi, de jouer un air sur ta guitare !!!*

*Je tiens à remercier mon Co-promoteur Monsieur ELHADI.*

*Je remercie tous les membres du jury pour avoir bien voulu donner de leur temps pour lire ce travail et faire partie des examinateurs. Certains ont dû prendre*

*en compte de se déplacer de leur endroit de travail. Qu'ils en soient particulièrement remerciés.*

*Je remercie aussi l'ensemble des enseignants de département de chimie industrielle qui ont contribué à notre formation.*

*Je remercie également toutes l'ingénieures de laboratoires : Nawel, Nesrine ,Zahira, Fatiha, Karima, Nafissa , Rachida et Tahar , Mourad, Zoubir, rachid.*

*Merci à ma partenaire, ma famille et à mes amis encore présents ou disparus, proches ou parfois trop éloignés, merci pour tout. Cela serait beaucoup trop long à détailler je me contenterais donc d'un grand merci à tous.*

*Seghour Abderraouf Ce message fait de mille mercis est une preuve d'amitié. Te dire merci est une manière simple et directe de te dire ma reconnaissance. Merci pour ton humanité, ton altruisme et ton souci de l'autre Que tes belles actions te soient rendues au centuple.*