

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 :Eau ; Environnement et développement durable

Intitulé du mémoire

**Production du Bioéthanol à partir d'une biomasse
lignocellulosique (les grignons d'olives)**

Présentée par :

Brahim Imene

Encadrée par :

Dr. Boutemak Khalida

Année universitaire 2015/2016

Remerciement

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

*Je tiens particulièrement à remercier ma promotrice, **M^{me}. K. BOUTEMAK** Maître de conférence « B » au département de Génie de procédés pour ses précieux conseils, sa patience, le suivi et l'intérêt qu'elle m'a apportée tout au long de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et ma profonde gratitude.*

*Je remercie **M^r O. Bouras** professeur au département de Génie de procédés et responsable de master génie des procédés option EEDD pour ma donner les conseils dans tous les années de mes études et aussi je remercie **M^r A. Aouabed** professeur au département de Génie de procédés à université Blida1.*

Je remercie tous les ingénieurs de laboratoire surtout l'ingénieure de labo 116 et les profs qui m'ont aidé pour la réalisation de mon travail.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de jury d'avoir accepté de m'honorer de leurs présences pour juger ce travail.

Et je remercie mes parents pour leur soutien, patience et spécialement pour leurs encouragements et je remercie tous mes amis de group EEDD et je remercie aussi Nour el houda et MAHMOUDI Meriem, Romaisa et Zaki...

Enfin, Mes remerciements vont à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à ma formation.

Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce travail

A mes très chers parents.

A ma sœur.

A tous mes profs et à ma promotrice

A tous mes chers amis. Et mes amis de section EEDD

A tous les membres de la famille.

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

الملخص

في عملنا، قمنا بدراسة إمكانية استخدام وتعزيز ثفل الزيتون كركيزة لإنتاج الإيثانول عن طريق التحويل البيولوجي اللاهوائي في وجود الخميرة. تتم عملية إنتاج الإيثانول الحيوي من الجيل الثاني في خمس مراحل رئيسية هي: إعداد الكتلة الحيوية (ثفل الزيتون)، وتمييع حمض المائي، الإنزيمية مع السيلولوز (0.5% و 1%)، التخمير الكحولي و التقطير. خلال التخمير، تابعنا تطور العديد من المعلمات وهي درجة الحموضة، ودرجة الكحولية، ومستويات السكر. وأظهرت حركية درجة الحموضة انخفاضا في نهاية التخمير في 72 ساعة. أقصى درجة الكحول الذي تم الحصول عليه (ما يعادل 7 °). في نهاية التخمير، كشفنا تدهور كبير للسكر، مع زيادة في إنتاج الكحول حيث كان معدل إنتاج الإيثانول 50%.

الكلمات المفتاحية: ثفل الزيتون، التخمير الكحولي، الكتلة الحيوية.

Résumé :

Dans notre travail, on a étudié la possibilité de l'utilisation et la valorisation du grignon d'olive comme substrat pour la production de l'éthanol par la bioconversion anaérobie en présence de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le procédé de production de bioéthanol de seconde génération est réalisé selon cinq étapes principales : préparation de la biomasse (grignons d'olives), hydrolyse acide dilué, hydrolyse enzymatique avec la cellulase (0,5% et 1%), la fermentation alcoolique et la distillation. Durant la fermentation, nous avons suivi l'évolution de plusieurs paramètres à savoir : le pH, le degré alcoolique, le taux de sucre. La cinétique classique du pH présentait une diminution du pH jusqu'à l'arrêt de la fermentation au bout de 72H. Le degré alcoolique maximal obtenu est D° égale à 7°GL. A la fin de la fermentation, une importante dégradation du sucre est révélée, par contre la production d'alcool a augmenté où le rendement en éthanol était 50 %.

Mots clés : Biomasse lignocellulosique, grignon d'olives, bioéthanol, hydrolyse, fermentation.

Abstract:

In our work, we studied the possibility of the use and development of the pomace of olives as a substrate for the production of ethanol by the anaerobic bioconversion in the presence of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The second generation bioethanol production process is carried out according to five main steps: preparation of biomass (pomace olive), hydrolysis diluted acid, enzyme hydrolysis with cellulase (0.5% and 1%), the alcoholic fermentation and distillation. During the fermentation, we followed the evolution of several parameters including: pH, alcoholic, sugar. Classic kinetic of pH showed a decrease in pH until the fermentation is stopped at the end de72H. The maximum obtained alcoholic degree is D° equal to 7 ° GL. At the end of fermentation, a considerable degradation of sugar is revealed, however the production of alcohol has increased where the ethanol yield was 50%.

Key words: Lignocellulosic biomass, olive stones, bioethanol, hydrolysis, fermentation.

Sommaire

Résumé	4
Introduction général	15
<u>Chapitre1</u> : Généralités sur les grignons d'olives	
1.1 Introduction :.....	17
1.2 L'olivier :	17
1.2.1 Oleiculture en Algérie :	17
1.2.2 Composition d'olive :	18
1.2.3 Mise en œuvre des olives :	19
1.3 Les grignons d'olive :	20
1.3.1 Différents types de grignon d'olive :	20
1.3.2 Compostion de grignon d'olive :	20
1.3.3 Utilisations des grignons d'olives :	23
1.3.4 Conservation des grignons d'olives :	24
<u>Chapitre2</u> :Généralité sur le bioéthanol	
2.1 Introduction :.....	25
2.2 Définition des biocarburants :	25
2.2.1 Différents biocarburants :	25
2.2.2 Différentes générations de biocarburants :	26
2.2.3 Comparaison des trois générations des biocarburants :	27
2.3 Le bioéthanol :	28
2.3.1 Introduction :	28
2.3.2 Définition :	29
2.3.3 Ressource des biomasses lignocellulosiques :	29
2.3.4 Composition de la biomasse lignocellulosique :	29
2.3.5 Procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol :	29

2.3.6	L'utilisation de bioéthanol :	31
2.3.7	Avantages et inconvénients du bioéthanol :	32
2.4	:Généralité sur la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.4.1	Introduction :	33
2.4.2	Définition :	33
2.4.3	Classification :	33
2.4.4	Reproduction :	34
2.4.5	Morphologie :	34
2.4.6	Conditions de culture de <i>S. cerevisiae</i> :	34
2.4.6.1	Besoins nutritionnels :	35
2.4.6.2	Besoins physico-chimiques :	35
2.5	Applications industrielles de la levure <i>S. cerevisiae</i> :	35

Chapitre3 :Materiel et méthodes

3.1	Introduction :	36
3.2	Préparation des grignons d'olives	36
3.2.1	Séchage :	36
3.2.2	Broyage :	36
3.3	Caractérisation des grignons d'olives :	36
3.3.1	Taux d'humidité :	36
3.3.2	Taux de cendre :	37
3.4	Production du bioéthanol :	37
3.4.1	Hydrolyse acide dilué :	37
3.4.2	Hydrolyse enzymatique :	38
3.4.3	Fermentation :	38
3.4.3.1	Mesure du pH :	41
3.4.3.2	Teneur en sucre réducteurs.....	41

3.4.3.3	Teneur en sucre totaux.....	43
3.5	La distillation alcoolique :.....	42
3.5.1	Le degré alcoolique :.....	43
3.6	Caractérisation de l'éthanol :.....	44
3.6.1	Vérification de la pureté :.....	44
3.6.2	Mesure de la densité :.....	44
3.6.3	Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) :.....	45

Chapitre4 :Résultat et discussion

4.1	Caractérisations de grignons d'olives :.....	46
4.1.1	Taux d'humidité :.....	46
4.1.2	Taux de cendre :.....	46
4.2	Résultats et interprétation des analyses effectués au cours de la fermentation :..	46
4.2.1	Evolution du pH durant la fermentation alcoolique :.....	46
4.2.2	Teneur des sucres réducteurs :.....	49
4.2.3	Teneur en sucre totaux :.....	51
4.2.5	Evolution du degré alcoolique durant la fermentation :.....	53
4.3	Quantité de l'éthanol:.....	55
4.4	Indice de réfraction (vérification la pureté) :.....	56
4.5	Densité :.....	57
4.6	Chromatographie en phase gazeuse CPG :.....	58
	Conclusion.....	60

Références bibliographique

Annexes

Liste des figures :

Figure 1.1: Composition d'olive.....	19
Figure 1.2: Diagramme de mise en œuvre des olives	19
Figure 1.3: Présentation de la cellulose	21
Figure 1.4: Présentation de l'hémicellulose.....	22
Figure 1.5: Présentation de la lignine	23
Figure 2.1 : Schéma de production des Biocarburants de 1 ^{er} génération.....	26
Figure 2.2 : Schéma de production des Biocarburants de 2 ^{ème} génération.....	27
Figure 2.3: Composition générale de la biomasse lignocellulosique.....	29
Figure 2.4: Schéma de la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique....	31
Figure 2.5: Micrographie de <i>S.cerevisiae</i>	34
Figure 2.6: Aspect morphologie de <i>S. cerevisiae</i>	34
Figure 3.1: Milieu de culture.....	38
Figure3.2 : Ecoulements des boites.....	39
Figure 3.3: Ensemencement.....	39
Figure 3.4: Milieu de fermentation.....	40
Figure 3.5: Dispositif de la fermentation.....	41
Figure 3.6: Test des sucres.....	42
Figure 3.7: Courbe d'étalonnage des sucres	42
Figure 3.8 : montage de distillation.....	43
Figure3.9: Test de degré alcoolique.....	44
Figure4.1: Cinétique du pH durant la fermentation alcoolique pour le grignon d'olivepour une concentration cellulaire0.5g/L.....	47

Figure4.2: Cinétique du pH durant la fermentation alcoolique pour le grignon d'olive pour une concentration cellulaire 1g/L.....	47
Figure4.3: Cinétique du pH durant la fermentation alcoolique pour le grignon d'olive pour une concentration cellulaire de 2g/L.....	48
Figure4.4: Cinétique du pH durant la fermentation alcoolique pour le grignon d'olive pour une concentration cellulaire de 4g/L.....	48
Figure 4.5: Evolution de la teneur en sucres réducteurs durant la fermentation pour une concentration cellulaire 0.5g/L	49
Figure 4.6: Evolution de la teneur en sucres réducteurs durant la fermentation pour une concentration cellulaire 1g/L	49
Figure 4.7: Evolution de la teneur en sucres réducteurs durant la fermentation pour une concentration cellulaire 2g/L	50
Figure 4.8: Evolution de la teneur en sucres réducteurs durant la fermentation pour une concentration cellulaire 4g/L	50
Figure 4.9: Evolution de la teneur en sucres totaux durant la fermentation pour une concentration cellulaire 0.5g/L	51
Figure 4.10: Evolution de la teneur en sucres totaux durant la fermentation pour une concentration cellulaire 1g/L	51
Figure 4.11: Evolution de la teneur en sucres totaux durant la fermentation pour une concentration cellulaire 2g/L	52
Figure 4.12: Evolution de la teneur en sucres totaux durant la fermentation pour une concentration cellulaire 4g/L	52
Figure 4.13: Evolution du degré alcoolique durant la fermentation pour une concentration cellulaire 0.5g/L	55

Figure 4.14: Evolution du degré alcoolique durant la fermentation pour une concentration cellulaire 1g/L	55
Figure 4.15: Evolution du degré alcoolique durant la fermentation pour une concentration cellulaire 2g/L	56
Figure 4.16: Evolution du degré alcoolique durant la fermentation pour une concentration cellulaire 4g/L	56
Figure 4.17 : Courbe d'étalonnage d'indice de réfraction.....	57

Listes des tableaux :

Tableau 1.1 : L'olivier en Algérie 2006/2007.....	19
Tableau 1.2: Composition des composants de l'olive	19
Tableau 1.3: Composition de grignon d'olive.....	21
Tableau 1.4: La composition de grignon d'olive en hémicellulose, cellulose et lignine dans la littérature	23
Tableau 2.1: Principales applications de la levure <i>S. cerevisiae</i>	35
Tableau 4.1: Teneur en humidité.....	46
Tableau 4.2 : Teneur en cendre	46
Tableau 4.3 : Rendement de la production d'éthanol.....	57
Tableau 4.4 : Rendement de la production d'éthanol.....	57
Tableau 4.5 : Indice de réfraction (0.5% de l'enzyme).....	58
Tableau 4.6 : Indice de réfraction 1% de l'enzyme.....	59
Tableau 4.7 : Densité 0.5% de l'enzyme.....	59
Tableau 4.8 : Densité 1% de l'enzyme.....	59
Tableau 4.9 : Temps de rétention 0.5% de l'enzyme.....	59

Tableau 4.10 : Temps de rétention 1% de l'enzyme.....	59
--	-----------

Listes des équations :

Equation 1 :Taux d'humidité	36
Equation 2 :Taux de cendre.....	37
Equation 3 :Degré alcoolique.....	43
Equation 4 : Densité	44

Liste des abréviation :

D° : degré alcoolique

g : Gramme

H : Humidité

h : Heure

L: Litre.

mg : milligramme

ml : millilitre

M : Molarité

pH : Potentiel d'Hydrogène.

T : Température.

V : Volume

% : Pourcentage.

Introduction générale

Introduction générale

La biomasse lignocellulosique représente une des ressources renouvelables les plus abondantes sur terre, et certainement une des moins coûteuses. Sa conversion en bioéthanol à usage carburant devrait permettre de subvenir à une partie des besoins énergétiques, couverts jusqu'à présent essentiellement par les produits dérivés du pétrole, tout en générant de nouvelles opportunités pour le monde agricole.

Les biocarburants produits à partir des plantes saccharifiées et amylacées comme la betterave et les céréales sont appelés de première génération, et ceux produits à partir de la lignocellulose sont de seconde génération. La concurrence avec les produits alimentaires et l'instabilité du prix des matières premières est un inconvénient majeur des biocarburants de première génération, malgré leur existence à plus de 22% des carburants des véhicules dans quelques pays.

Les biocarburants de seconde génération ont résolu certains des problèmes soulevés avec les biocarburants de première génération ; mais ces biocarburants ne sont pas encore disponibles sur le marché. Le principal but est comment convertir le maximum de biomasse, suivre les différentes étapes de conversion (Hydrolyse, fermentation, distillation) jusqu'à l'obtention du bioéthanol pouvant être utilisé dans les moteurs à essence et dans d'autres applications.

L'objectif principal du présent travail est la production de bioéthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique (grignon d'olive).

Cette étude comporte trois grandes parties : synthèse bibliographique, matériels et méthodes et résultats et discussion.

- La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle on présentera :

Des généralités sur le grignon d'olive, des généralités sur les biocarburants et le bioéthanol et une présentation de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

- La deuxième partie sera consacrée aux matériel et méthodes où on présentera le protocole expérimental de la préparation des grignons d'olives (séchage, broyage..) et le procédé utilisé pour la production de bioéthanol (Hydrolyse acide dilué et Hydrolyse enzymatique et distillation) ainsi que la méthode de caractérisation du bioéthanol synthétisé.

La troisième partie consacrée à l'interprétation des résultats expérimentaux et nous terminerons par une conclusion générale.

Synthèse
bibliographique

Chapitre 1 :
Généralités sur les grignons
d'olives

1.1 Introduction :

L'industrie oleicole est une activité importante, concernée principalement dans les pays méditerranéens.

Le processus de trituration des olives produit l'huile d'olive vierge et engendre deux résidus l'un liquide : les margines et l'autre solide : les grignons. Les olives contiennent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% d'eau de végétation.

1.2 L'olivier :

L'olivier appartient à la famille des oleacées dont le nom latin est « olea ». il comporte diverses espèces dont l'oleae Europaea, qui se divise en deux sous-espèces : Olea Europa sylvestris ou Oléastre. C'est-à-dire l'olivier sauvage et olea Europaea sativa ou l'olivier cultivé.

La culture de l'olivier est très ancienne. Son histoire se confond avec celle du bassin méditerranéen et les premières traces d'oliviers remontent à 6000 ans avant J.C en Palestine et en Syrie[1].

Cette culture a connu ensuite un fort développement en Grèce puis une extension dans tout le bassin méditerranéen grâce aux romains qui développèrent la culture de l'olivier et le commerce de l'huile [1].

L'olivier est un arbre au tronc tortueux et noueux qui s'adapte aux sols pentus et caillouteux. L'olive est le fruit de l'olivier. Il existe de nombreuses variétés : olives noires et vertes qui ne sont pas nécessairement des variétés différentes mais correspondent à différents stades de maturité du fruit. l'olive, verte au départ devient violette puis noire à sa maturité ; plus elle est mure, plus elle est gorgée d'huile.

1.2.1 Oleiculture en Algérie :

Actuellement, cette filière se concentre dans certaines wilayas comme Béjaïa, Tizi-Ouzou et Bouira qui ont produit, à elles seules en 2008, 179180 hectolitres sur une surface de 102893 ha, soit 51% de la production nationale et environ 44% du verger national oleicole. Ces trois wilayas sont spécialisées beaucoup plus dans la production d'huile.

Durant la campagne 2009/2010, la production oleicole Algérienne était de 50000 tonnes d'huile soit 1.7% de la production mondiale[2].

La quasi-totalité d'olives est produite par les pays méditerranéens, dont l'Algérie produit environ 1% de la production mondiale [3].

Le Tableau 1.1 représente la surface totale oléicole actuelle de l'Algérie, la quantité des arbres et la quantité d'huile produite et les olives.

Tableau 1.1: L'olivier en Algérie 2006/2007 (ministère de l'agriculture (Algérie)).

Surface totale plantée	276 253 hectares
Arbres en production	18 313 260
Olives récoltés	208 952 tonnes
Huile d'olive produite	20 538 tonnes
Olives de table produite	81 778 millions tonnes

1.2.2 Composition d'olive :

Afin de comprendre plus facilement les variations de la composition des différents types de grignons, il peut être utile de rappeler (tableau 1.2) la composition des différents composants de l'olive [1].

Tableau 1.2: composition des composants de l'olive.

Constitution	Matière azotée totale	Matière grasse	Matière minérale	Cellulose brute	Extractif non azoté
Partie					
Épicarpe	9.8	3.4	1.6	2.4	82.8
Mésocarpe	9.6	51.8	2.3	12	24.2
Endocarpe (noyau et amande)	1.2	0.8	1.2	74	22.7

L'olive est un fruit à noyau. Elle est constituée d'un épicarpe, d'un mésocarpe et d'un endocarpe (figure 1.1) [1].

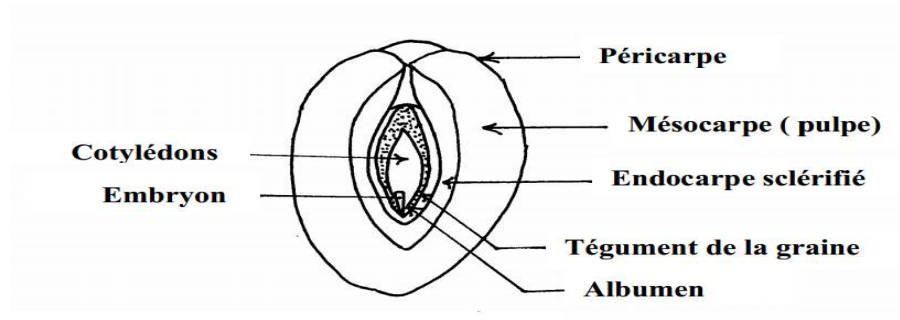


Figure 1.1: Composition de l'olive.

1.2.3 Mise en œuvre des olives :

La production d'huile d'olive a toujours été le principal objectif de la culture de l'olivier. Les méthodes d'extraction ont évoluées mais le processus d'extraction d'huile d'olives reste toujours le même. Il inclut quatre opérations principales : le nettoyage, le broyage, le malaxage et la séparation des phases[4].

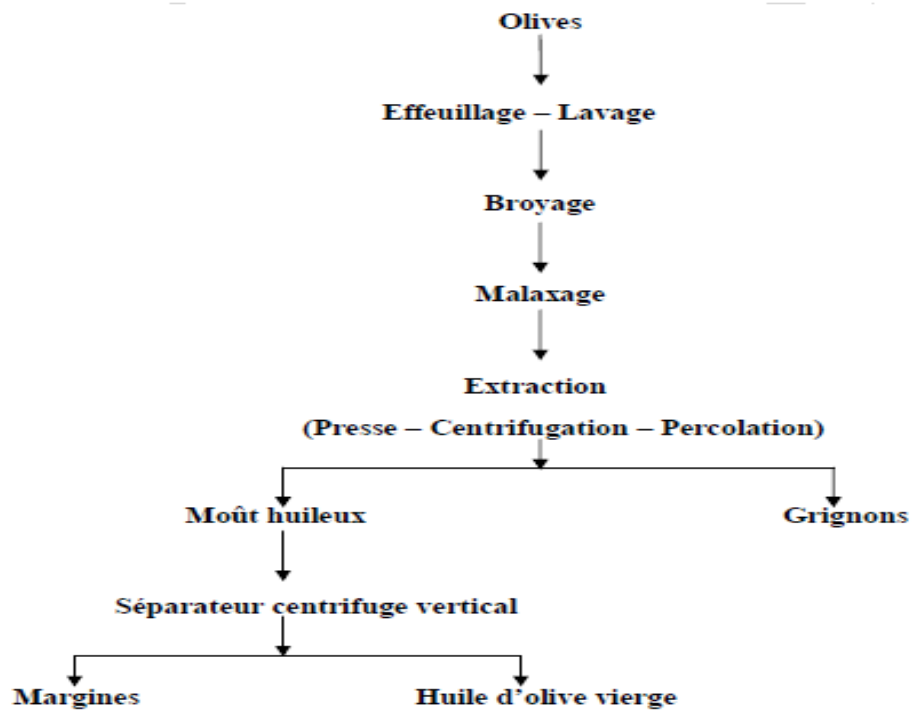


Figure 1.2: Diagramme de mise en œuvre des olives.

1.3 Les grignons d'olive :

Les grignons sont les résidus solides issus de la première pression ou centrifugation et sont formés des pulpes et noyaux d'olives. Le grignon est un sous-produit du processus d'extraction de l'huile d'olive composé des peaux, des résidus de la pulpe et des fragments des noyaux [2].

1.3.1 Différents types de grignon d'olive :

❖ Grignon brut :

C'est le résidu de la première extraction de l'huile d'olive entière. Ses teneurs relativement élevées en eau et en huile favorisent son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'aire libre [5].

❖ Grignon épuisé :

C'est le résidu obtenu après déshuilage de grignon d'olive brut par un solvant ; qui est généralement l'hexane [5].

❖ Grignon partiellement dénoyauté :

Il résulte de la séparation partielle du noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation [5].

1.3.2 Composition de grignon d'olive :

Les grignons bruts renferment la coque du noyau, réduite en morceaux, la peau et la pulpe broyée de l'olive, environ 25% d'eau et encore une certaine quantité d'huile qui favorisent leur altération rapide.

Les grignons épuisés diffèrent essentiellement par une plus faible teneur en huile et une teneur en eau réduite du fait qu'ils ont été déshydratés au cours du processus de l'extraction.

Les grignons épuisés partiellement dénoyautés sont constitués essentiellement par la pulpe et contiennent encore une petite proportion de coques qui ne peuvent être séparées complètement par les procédés de tamisage [6].

La composition de grignon varie en fonction des variétés d'olives triturées ; le tableau donne une indication sur cette composition [7].

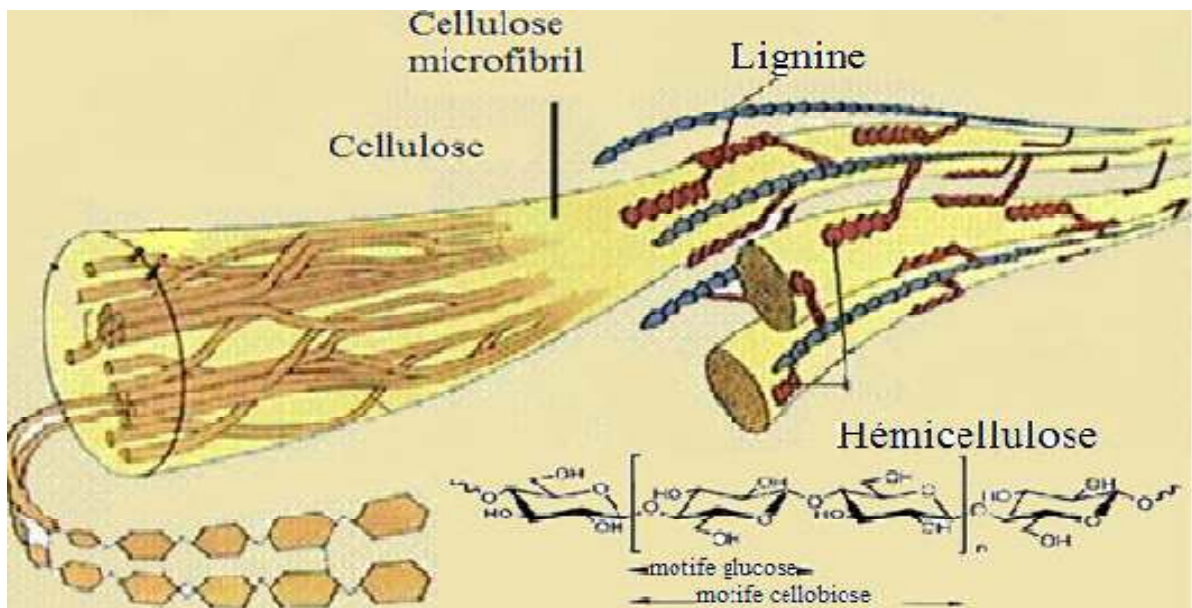
Tableau 1.3: composition de grignon d'olive.

Matière Sèche	Matières Minérales	Matières Azotées Totales	Cellulose Brute	Matières Grasses
75-80%	3-5%	5-10%	35-50%	8-15%

Plus simplement, on peut considérer que le grignon est composé par une fraction riche en lignine provenant des fragments de noyaux et l'autre renfermant principalement des glucides, comme la cellulose, l'hémicellulose, des protéines et de l'huile résiduelle qui dépend de la technique d'extraction [7].

➤ **Cellulose :**

La cellulose est un homopolymère linéaire composé d'une longue chaîne de molécules de glucose liées entre elles par des liaisons glycosidiques en β -(1,4). Le degré de polymérisation varie suivant l'origine des fibres et le type de procédés d'isolement [8].

**Figure 1.3:** Présentation de la cellulose.

➤ **Hémicellulose :**

La structure chimique d'hémicellulose est considérée comme un polymère d'xylose $n(C_5H_8O_4)$. Les hémicelluloses sont définies comme étant des polysaccharides non cellulosiques présents dans les paroi cellulaires des végétaux. Ces macromolécules présentent une grande diversité de structure [8].

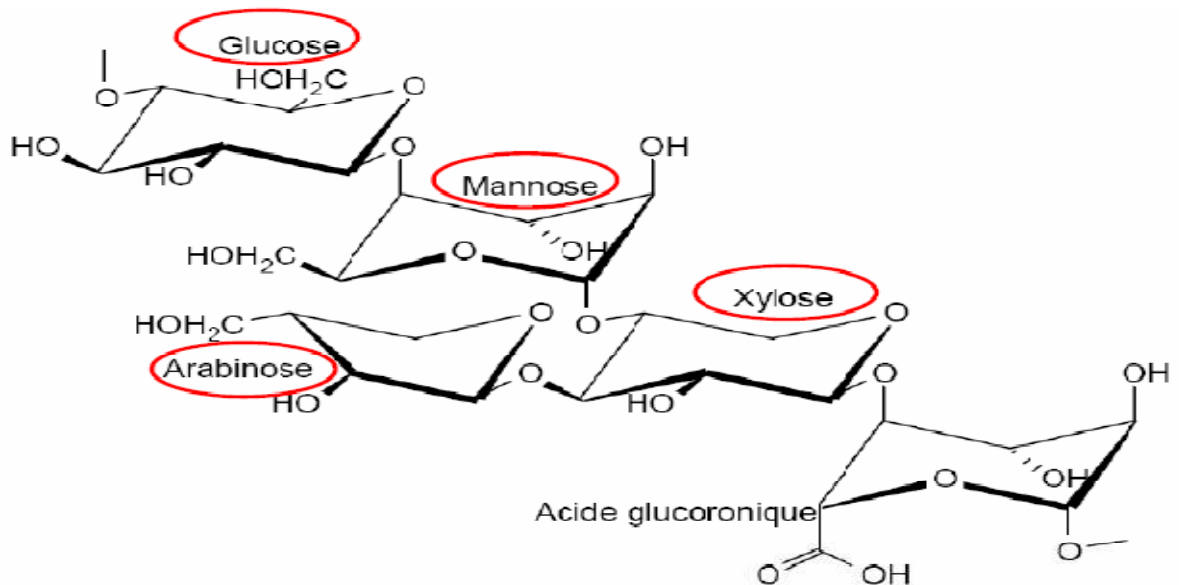


Figure 1.4: Présentation de l'hémicellulose.

➤ **La lignine :**

La lignine est un polymère tridimensionnel formé d'éléments de phénylpropanes assemblés pour former une grosse molécule complexe, ces polymères sont déposés principalement dans les parois secondaires des cellules, les rendant rigides et imperméables. La lignine est généralement polymérisée à partir de trois monomères phénylpropanoïdes, les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique qui sont aussi connus comme les monolignols H, G et S respectivement.

Après une série des réactions d'oxydation et de polymérisation, les trois monomères phénylpropanoïdes H, G et S donnent une forme complexe, sa complexité provient de l'association des trois monolignols par différentes liaisons chimiques sans caractère ordonnée ni répétitif [8].

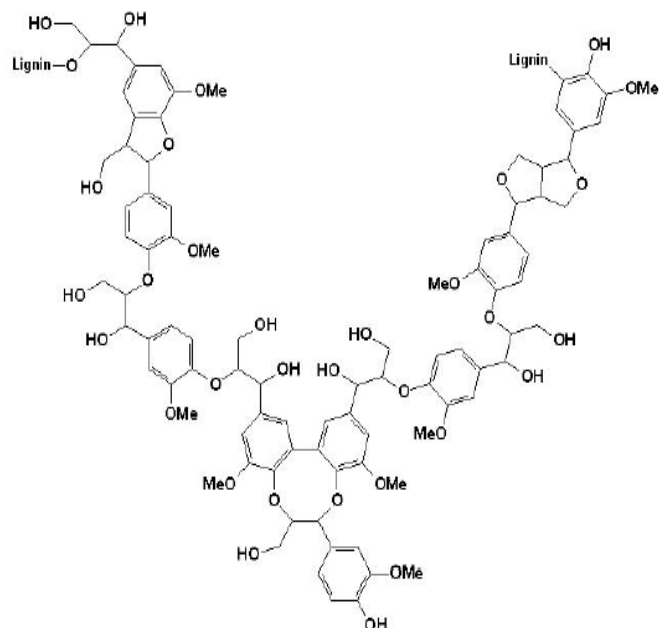


Figure 1.5:présentation de la lignine

Le tableau suivant montre que la lignine représente entre le tiers et la moitié de la masse des grignons d'olives.

Tableau 1.4: la composition de grignon d'olive en hémicellulose,cellulose et lignine dans la littérature.

Auteurs	Hémicellulose %	Cellulose %	Lignine %
Demirbas.2004	23.6	24	48.4
Jauhiainen et al.2005	44	44	45
Garcia-ibanez et al.2006	21.5	24.3	38

1.3.3 Utilisations des grignons d'olives :

Le grignon d'olive est un déchet de l'industrie oleicole, ce dernier est un danger pour l'environnement. Des nombreux travaux de recherche ont été faits dans le but de le valoriser afin de limiter son impact environnemental.

-Les grignons d'olives sont utilisés comme biosorbants pour l'élimination de différents métaux lourds [9].

-La production du charbon actif à partir des grignons d'olive a fait l'objet de plusieurs travaux. Ce charbon a été utilisé pour l'adsorption de nombreuses matières organiques et minérales [10].

-L'extraction de l'huile de grignon d'olive permet de donner une certaine valeur ajoutée à la production de l'huile d'olive. Cette huile est de qualité médiocre, elle peut être destinée soit à des usages techniques, soit après raffinage à la consommation humaine ou animale.

-Comme le grignon d'olive possède un pouvoir calorifique élevé (3000 Kcal/kg), son utilisation comme combustible est l'application la plus courante dans la plupart des pays à vocation oleicole. Les grignons d'olive sont aussi utilisés pour l'alimentation du bétail et comme fertilisant [10].

-Aux Etats-Unis, les grignons d'olives sont utilisés pour le nettoyage de certaines surfaces métalliques par sablage [11].

1.3.4 Conservation des grignons d'olives :

Le problème principal qui se pose pour la conservation des grignons bruts est leur teneur relativement élevée en eau et la présence d'une quantité encore importante de matière grasse. Il est estimé que les grignons bruts obtenus par centrifugation se détériorent après 4-5 jours et les grignons obtenus par pression se détériorent après environ 15 jours. Ces mêmes grignons déshydratés ne se conserveraient guère plus de 45 jours. Par contre, les grignons épuisés déshydratés au cours de l'extraction pourraient se conserver plus d'un an [12].

Chapitre 2 :

Généralités sur le bioéthanol

2.1 Introduction :

L'exploitation de ressource bio-organique n'est pas une technique récente, l'homme utilisait déjà le bois comme combustible, et faisait l'extraction des plantes et utilisa d'autres techniques et moyens d'exploitation de la biomasse. Mais avec l'exploration du pétrole, ce dernier devient le plus important réservoir des matières organiques, car il est facilement utilisable, le pétrole n'est pas une source durable et son utilisation est la principale cause de réchauffement climatique.

Alors pour trouver une source d'énergie durable, pratiquement moins coûteuse, l'homme réfléchit de revenir à l'exploitation des biomasses organiques, se basant sur les nouvelles technologies de la science, afin d'obtenir des carburants alternatifs, de l'énergie et des produits à haute valeur ajoutée.

2.2 Définition des biocarburants :

Les biocarburants sont des sources énergétiques issues des matériaux biologiques qui les distinguent des autres sources d'énergie non fossiles. De plus, quel que soit la forme des biocarburants (solide, liquide, ou gazeuse), il est clair que c'est une énergie durable, et renouvelable puisqu'elle est d'origine végétale et animale, et donc elle peut être remplacée après une courte période [13].

2.2.1 Différents biocarburants :

Les dix biocarburants cités par-là commission Européen (directive 2003/30/CE) sont : le bioéthanol, le biodiesel, le biogaz, le bio-méthanol, le bio-diméthyléther, le bio-éthyle-tertio-butyle-éther (bio-ETBE), le bio-Méthyl-tertio-butyle-éther (bio-MTBE), les biocarburants synthétiques, le bio-hydrogène et les huiles végétales pures [14].

Les deux principaux biocarburants candidats prêts à un développement industriel sont l'éthanol et l'ester méthylique d'huile végétale ou le biodiesel.

2.2.2 Différentes générations de biocarburants :

- **Première génération :**

Les biocarburants de première génération, sont produits à partir de la biomasse agricole par exemple :

- la betterave sucrière,
- la canne à sucre,
- le tournesol, le colza,
- le soja,
- le blé et le maïs, etc.

Ils sont produits par deux filières distinctes :

- La filière bioéthanol qui comprend l'éthanol pour alimenter en mélange les véhicules à essence,
- La filière huiles végétales avec l'ester méthylique d'huiles végétales, ou d'acides gras pour les véhicules diesel [15].

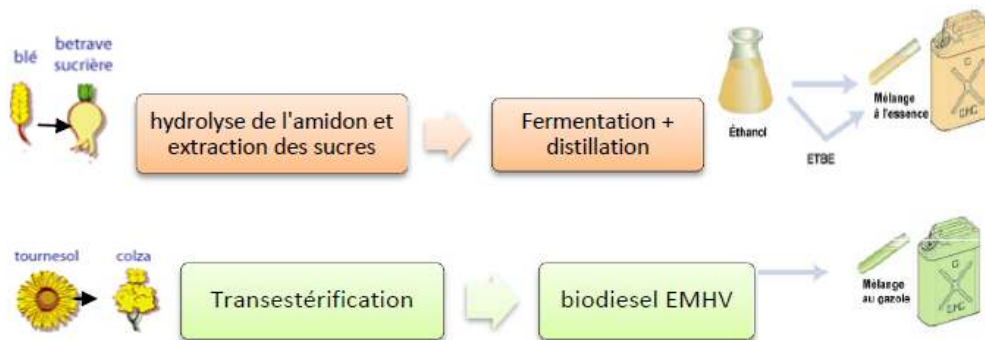


Figure 2.1 : Schéma des filières de production des biocarburants de 1^{er} génération.

- **Deuxième génération :**

Ce sont les biocarburants issus de la transformation de la biomasse lignocellulosique comme le bois et le papier...etc. La ressource de la biomasse lignocellulosique provient aussi bien des résidus agricoles ou des sous-produits de transformation du bois, qu'il s'agisse de plantes ligneuses ou de plantes herbacées [3].

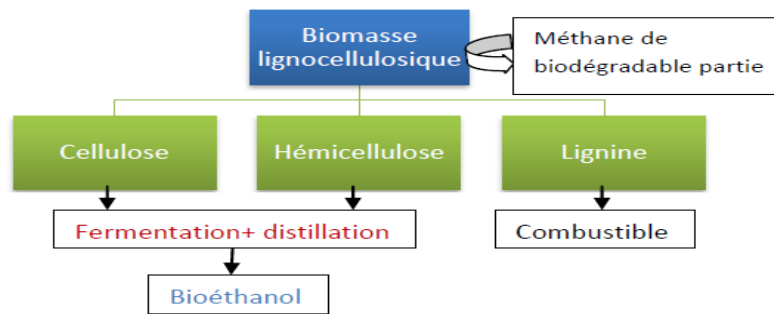


Figure 2.2 : Schéma de production des Biocarburants de 2ème génération.

- **Troisième génération :**

C'est probablement à partir des cultures de microalgues que des agrocarburants, de troisième génération, pourront être produits avec les meilleurs rendements, rendant ainsi envisageable une production de masse, sans déforestation massive ni concurrence avec les cultures alimentaires [3].

2.2.3 Comparaison des trois générations des biocarburants :

[16].

- **1^{er} génération :**

Avantages :

- Peu coûteuse, réduction des émissions des gaz à effet de serre,
- Contribution à l'indépendance énergétique du pétrole,
- Diversification des activités agricoles et valorisation des coproduits,
- Temps de recyclage de biomasse agricole 3 mois-1 année.

Inconvénients :

- Risque d'épuisement de la qualité organique et minérale du sol,
- L'utilisation abusive d'engrais et pesticide pour améliorer les rendements de la matière première,
- Compétition entre productions agricoles alimentaires et celles destinées au biocarburant.

- **2^{ème} génération :**

Avantages :

- Cout des matières premières faible,
- Pas de compétence avec la filière alimentaire,
- Pas de co-produits et volumes de biocarburants produits plus importants.

Inconvénients :

- Concurrence entre les différents usages des terres agricoles.
- Concurrence avec les usages traditionnels des matières premières.
- Risque de sur-exploitation des matières premières.

- **3^{ème} génération :**

Avantages :

- Pas de problème de sol.
- Taux de croissance plus élevée pour les micro-algues moins de 1 mois.
- 90% du rejet de gaz à effet de serre moins que l'essence.

Inconvénients :

- On ne connaît pas les impacts sur l'environnement que pourrait avoir la culture de micro-algues,
- Coût de production élevé.

Par rapport aux produit agricoles, la biomasse lignocellulosique est plus abondante et moins coûteuse parce qu'elle n'entre pas directement en compétition avec les usages alimentaires de ces dernières, d'après ça les biocarburants de 2^{ème} génération sont actuellement favorisés.

2.3 Le bioéthanol :

2.3.1 Introduction :

Généralement, l'industrie agroalimentaire et de transformation des plantes fournissent des quantités importantes de déchets lignocellulosiques qui sont mal exploitées. Aussi, avec l'augmentation du prix de pétrole et l'aggravation des émissions de gaz à effet de serre

justifient la recherche de matières premières et de technologies alternatives capables de réduire la dépendance en ces combustibles fossiles et de protéger l'environnement.

Comme nous avons vu dans les paragraphes précédents, les biocarburants de 2^{ème} génération sont caractérisés par plusieurs points positifs, mais le plus important c'est la façon de production la moins coûteuse et la plus simple.

2.3.2 Définition :

L'éthanol C_2H_5OH est le produit de la fermentation des sucres. Le bioéthanol est l'éthanol élaboré à partir de la biomasse lignocellulosique. Il est obtenu par la fermentation des sucres contenus dans la biomasse en présence d'une levure, *Saccharomyces cerevisiae* qui est l'une des levures utilisées lors de la fermentation des sucres.

2.3.3 Ressource des biomasses lignocellulosiques :

Les ressources exploitables proviennent :

- Des déchets agricoles ; pailles de céréale, cannes à sucre, ect...
- Des déchets d'exploitation forestière,
- Des déchets de l'industrie du bois et du papier (papiers usagés, liqueurs noires).

2.3.4 Composition de la biomasse lignocellulosique :

La biomasse lignocellulosique est composée de cellulose, d'hémicellulose et de lignine dans des quantités variables. Elle contient aussi jusqu'à 10 % de substances minérales (cendres, silice).

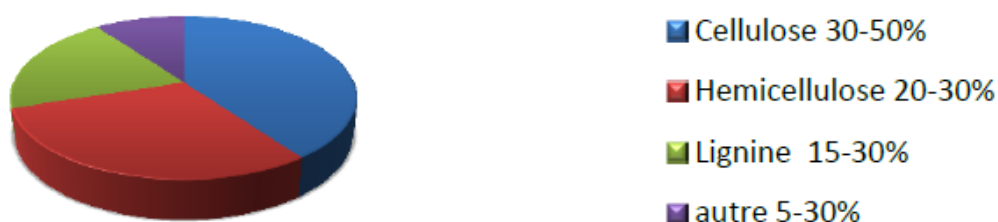


Figure 2.3: composition générale de la biomasse lignocellulosique

2.3.5 Procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol :

La filière de production du bioéthanol est la filière biochimique, qui a pour principe de transformer de la cellulose et de l'hémicellulose en sucres à l'aide d'enzymes. Cependant, ces

derniers représentent un facteur critique dans leurs commercialisations car leurs coûts sont onéreux.

Le procédé comprend les étapes suivantes:

- Préparation de la matière première : avant d'introduire la biomasse lignocellulosique dans les principales étapes de transformation, une étape de préparation de biomasse lignocellulosique s'impose et qui nécessite plusieurs opérations : broyage, séchage... Etc.
- Un prétraitement de la biomasse tel que l'explosion à la vapeur ou le traitement à l'acide est recommandé car l'utilisation de la cellulose et l'hémicellulose est inhibée par la présence de la lignine.
- Hydrolyse d'acide concentré ou dilué.
- Hydrolyse enzymatique : est effectuée à une température de 45 à 50 °C et à un pH entre 4.8 et 4.5, à l'aide des enzymes conduisant à la formation de glucose[15].
- Fermentation alcoolique : après prétraitement et hydrolyse acide diluée et enzymatique, les sucres obtenus sont ensuite fermentés par un procédé de fermentation alcoolique qui conduit donc à la formation d'éthanol. Cette fermentation est réalisée par des microorganismes, des levures appartenant aux genres *saccharomyces*.
- La récupération de l'éthanol: après fermentation, la concentration volumique d'éthanol dans la solution est encore faible, il est nécessaire de purifier par distillation à température ne dépassant pas 80 °C.

Le schéma suivant explique les étapes de la production de bioéthanol :

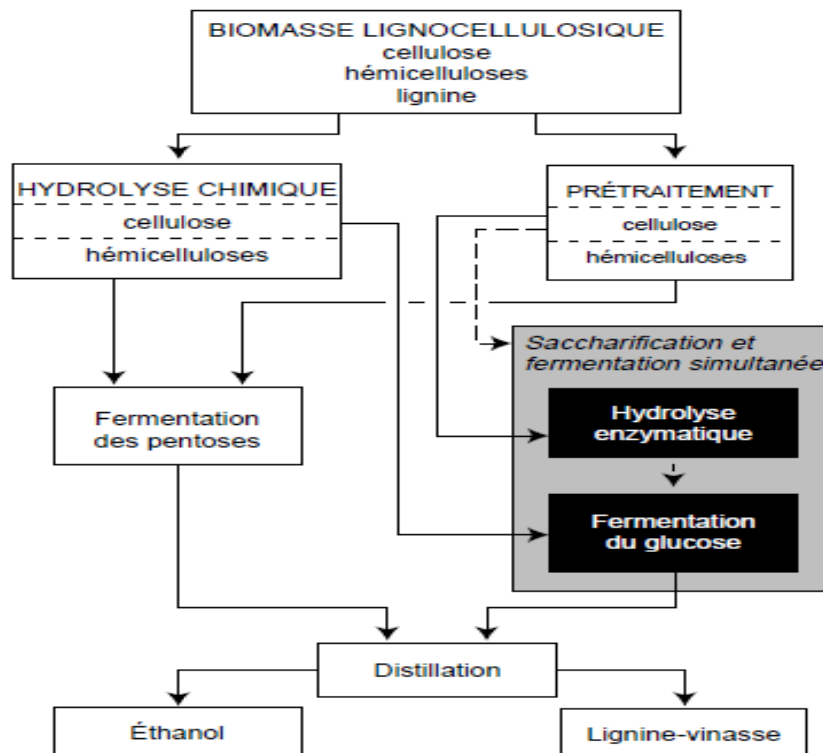


Figure 2.4: schéma de la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique.

2.3.6 L'utilisation de bioéthanol :

Le bioéthanol peut être utilisé :

- À l'état pur comme carburant substitut à l'essence dérivé du pétrole ou bien en mélange à des niveaux de concentration variables,
- Sous forme d'ETBE (Ethyle Tertio Butyle Ether), qui est formé par l'éthérisation catalytique de l'isobutène avec de l'éthanol. Il contient 45% en masse d'éthanol combiné sous forme chimique. L'ETBE possède les mêmes avantages que l'éthanol en termes d'accroissement d'indice d'octane [16],
- Toutefois, l'incorporation de 10 % d'éthanol dans l'essence ne réduit que de 3 % la puissance du moteur et favorise une meilleure combustion d'un même ordre de grandeur [16],
- L'ETBE est le résultat de la synthèse entre 49% de bioéthanol et 51% d'isobutylène, une base pétrolière issue des raffineries. Il est destiné à être incorporé à l'essence, jusqu'à 15%. Aujourd'hui, 80% de la production du bioéthanol est dédiée à la production d'ETBE, mais ce chiffre devrait rapidement décroître, avec le développement de l'incorporation directe dans les essences.

- Sous forme d'E85, avec des véhicules Flex-fuel, L'E85 est composé à 85% de bioéthanol, et à 15% d'essence sans plomb 95 (SP 95). Il constitue le carburant le plus écologique de la filière bioéthanol destiné à l'essence[17].

2.3.7 Avantages et inconvénients du bioéthanol :

Avantages :

- Le principal avantage technique et économique de l'éthanol est d'améliorer l'indice d'octane des essences,
- Les composés Organiques Volatiles (COV) réagissent beaucoup dans l'atmosphère, et sont des sources importantes d'ozone au niveau du sol. Grâce à la propriété oxygénative de l'éthanol, il y'a une nette diminution, approximativement 7%, des COV émanant des mélanges essence- éthanol, un taux bas par rapport aux essences conventionnelles,
- Le CO₂ rejeté lors de la combustion des biocarburants « bioéthanol injecté à différentes teneurs » correspond à la quantité absorbée lors de la croissance des végétaux, il n'augmente pas donc l'effet de serre. De plus la présence d'oxygène dans les molécules des biocarburants améliore leur combustion et diminue le nombre de particules dus aux hydrocarbures imbrûlés, ainsi que le monoxyde de carbone,
- La valorisation optimale de la biomasse, Si l'on tient compte des coproduits obtenus par les filières (paille, drèches, tourteaux, pulpes...) valorisés en alimentation animale, en engrais, en énergie ou dans l'industrie.

Inconvénients

- Il existe des inconvénients au sujet de la présence et de la dégradation de la lignine. Les processus de prétraitements pour dégrader la lignine sont chers, il est donc indispensable de réduire les coûts de production pour que la fabrication du bioéthanol et son utilisation soient rentables[18].

2.4 Généralité sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* :

2.4.1 Introduction :

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires qui se multiplient par bourgeonnement. Il existe plusieurs centaines d'espèces, quelques unes présentent un grand intérêt industriel du fait de leur pouvoir fermentaire [19].

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) est l'organisme eucaryote dont la biologie cellulaire est la mieux étudiée pour les raisons suivantes :

- Importance industrielle.
- Simplicité de l'organisation unicellulaire et la croissance rapide dans les conditions de laboratoire,
- Exigence des substrats peu économiques [19].

2.4.2 Définition :

S.cerevisiae vient du mot saccharose qui signifie «sucre», myces « champignon », tandis que *cerevisiae* fait référence à «cervoise», c'est un terme scientifique, nom qu'on donnait autrefois à la bière, c'est un terme utilisé pour désigner le petit champignon microscopique qui compose les différentes sortes de levures qu'on utilise pour la fermentation. Elle est littéralement connue comme levure du sucre [19].

2.4.3 Classification :

Selon Larpent (1992) [20], la classification de la levure *S. cerevisiae* est la suivante :

Règne.....	<i>Protiste</i>
Embranchement.....	<i>Eucaryote</i>
Classe.....	<i>Ascomycètes</i>
Sous classe.....	<i>Hemiascomycetes</i>
Ordre.....	<i>Endomycétales</i>
Famille.....	<i>Saccharomycetaceae</i>
Sous famille.....	<i>Saccharomycetoideae</i>
Genre.....	<i>Saccharomyces</i>
Espèce.....	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

2.4.4 Reproduction :

La reproduction végétative se fait généralement par bourgeonnement. Dans certaines conditions de culture, la levure *S. cerevisiae* peut se reproduire par voie sexuée. (Figure 2.3) [19].

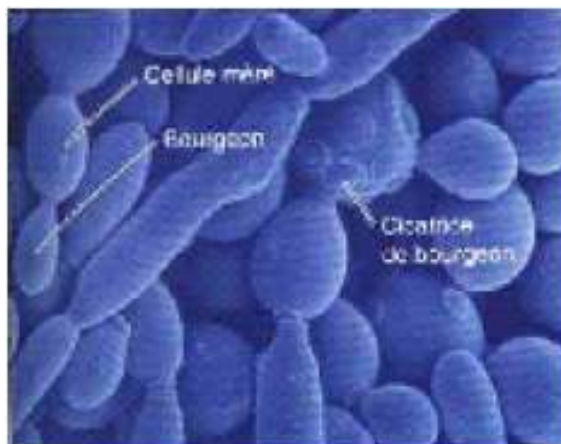


Figure 2.5: Micrographie de *S. cerevisiae*

2.4.5 Morphologie :

S. cerevisiae est une cellule sphérique, ovoïde ou allongée de taille très variable (3-10 μm x 4-14 μm). Certaines cellules sont cylindriques et de grandes taille jusqu'à 20 μm de longueur ou plus (figure 2.4) [19].

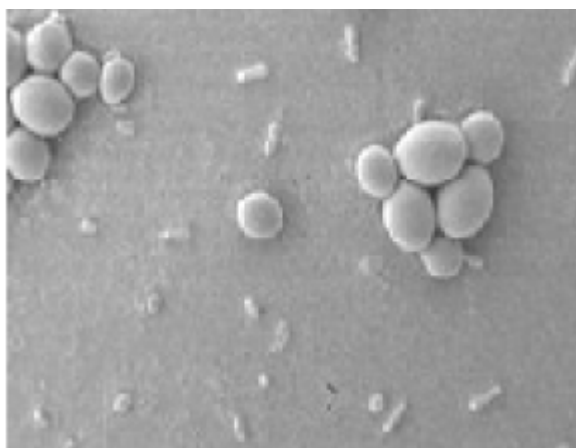


Figure 2.6: Aspect morphologie de *S. cerevisiae*.

2.4.6 Conditions de culture de *S. cerevisiae* :

La croissance d'un micro-organisme peut être considérée comme une série d'interaction entre les cellules et l'environnement. Pour cela, le milieu de culture doit apporter

tous les éléments nécessaires aux systèmes cellulaires et aux besoins énergétiques de la levure [19]. Les besoins nutritionnels et physico-chimiques sont les suivants :

2.4.6.1 Besoins nutritionnels :

- Source de carbone et d'énergie,
- L'azote,
- Source minérale : *S. cerevisiae* a besoin aussi du phosphore, du potassium, du calcium.....
- Source vitaminique: l'apport des vitamines est indispensable pour assurer une bonne croissance, ses besoins surtout en thiamine (B₁) [19].

2.4.6.2 Besoins physico-chimiques :

- **La température** : la température convenable pour la croissance de *S.cerevisiae* est de 30°C,
- **Le pH** :*S. cerevisiae* représente l'avantage de croître sur un milieu acide, elle préfère un pH compris entre 4 et 4.8,
- **L'aération** : la levure s'adapte à deux modes de vie en présence ou en absence d'oxygène [19].

2.4.7 Applications industrielles de la levure *S. cerevisiae* :

La levure *S. cerevisiae* est le microorganisme le plus appliqué aux procédés microbiologiques traditionnels, industriels et dans la fabrication de divers produits dont les principales applications sont mentionnées dans le tableau [21] :

Tableau 2.1: principales applications de la levure *S. cerevisiae*.

Produits de <i>S. cerevisiae</i>	Applications
Alcool et CO ₂	Fabrication du pain, bière
Ethanol	Solvants
Protéines animales	Alimentation de l'homme et bétail
Vitamines	Industrie pharmaceutique

Partie expérimentale

Chapitre 3 : matériel et méthodes

3.1 Introduction :

L'objectif de ce travail consiste à la production d'un biocarburant « Bioéthanol » à partir d'une biomasse lignocellulosique « grignon d'olive ». Le procédé de conversion du grignon d'olives en bioéthanol est subdivisé en 5 parties principales : préparation des grignons d'olives ; hydrolyse acide dilué, hydrolyse enzymatique, fermentation et distillation.

3.2 Préparation des grignons d'olives

3.2.1 Séchage :

Cette étape est primordiale avant le broyage où les grignons d'olives sont séchés naturellement à l'aire libre.

3.2.2 Broyage :

Le broyage est une opération qui consiste à diviser un solide, pour augmenter sa surface spécifique. Les grignons d'olive sont broyés à l'aide d'un broyeur à billes. La taille (0.8-1.18 mm)

3.3 Caractérisation des grignons d'olives :

3.3.1 Taux d'humidité :

C'est le rapport exprimé en pourcentage du poids de l'eau contenu dans les grignons d'olives au poids du même matériau sec.

Mode opératoire :

On pèse 5g de grignons d'olives qu'on introduit dans un verre de montre (m_0), on place ensuite l'échantillon dans l'étuve à 105 °C pendant 2 heures. On pèse de nouveau l'échantillon (m_1). Le taux d'humidité est donné par la relation suivante :

$$H \% = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \text{ (Eq 1)}$$

3.3.2 Taux de cendre :

Il permet de connaître la part des matières organiques qui rentre dans la composition des grignons d'olives.

Mode opératoire :

2g de grignons d'olives sont séchés dans l'étuve pendant 12 heures puis placé dans un creuset en céramique. Ce creuset est mis par la suite dans un four réglé à 600°C pendant 45 min jusqu'à l'obtention d'une couleur grise claire au blanchâtre. Une fois la carbonisation est terminée, le creuset est ensuite retiré du four, refroidi à l'air libre puis pesé. Le taux de cendre est calculé par la formule suivante :

$$C \% = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100 \quad (\text{Eq 2})$$

Tel que :

P_0 : Le poids du creuset remplis avant carbonisation en (g).

P_1 : Le poids du creuset remplis après carbonisation en (g).

3.4 Production du bioéthanol :

La production du bioéthanol a été réalisée à partir de la biomasse lignocellulosique (les grignons d'olives) en adoptant les différentes étapes selon le protocole suivant[22] :

3.4.1 Hydrolyse acide dilué :

- Dans un bécher de 500 ml rincé à l'eau distillée et séché préalablement, 50g de matière sèche.
- Ajustez 300 ml de solution d'acide sulfurique (0.025M) à l'aide d'une éprouvette graduée.
- Faites agiter le mélange sous les conditions suivantes : 250 tr/min sous chauffage à une température maximal égale à 110 °C pendant 10 min.
- Ensuite refroidir la solution pendant une durée de 10 min.
- Filtrer le mélange à l'aide de papier filtre.
- Laver le résidu solide par l'eau distillée et laissez séché à température ambiante.

3.4.2 Hydrolyse enzymatique :

- Dans un erlenmeyer de 150 ml, mettez 10 g de résidu insoluble dans l'eau (solide).
- Ajustez 100 ml de solution tampon de citrate (0.05M, pH = 4.8).
- Faites l'agiter à 150 tr/min à 50 °C pendant 3h.
- Dans un bécher de 150 ml, ajoutez de l'enzyme cellulase à différentes concentrations (0.5% et 1%) dans 100 ml de l'eau distillée.
- Ajouter 10 g de matière sèche.
- Mettez la solution dans une étuve à une température de 45 °C pendant 60 min.
- Ensuite, Filtrer la solution.

3.4.3 Fermentation :

Les *saccharomyces cerevisiae* sont l'espèce la plus utilisée en fermentation alcoolique. Il a un bon pouvoir alcoologène (17°) et a un potentiel enzymatique, aromatique généralement intéressant. L'action sur les sucres fermentescibles est rapide et complète. Cette souche de levure disparaît rapidement en fin de fermentation [23].

❖ Préparation du 1^{er} milieu de culture :

- Dans un erlenmeyer de 100 ml rincé à l'eau distillée et séché préalablement, mettez après pesée, les composés suivants : Extrait de levure (0.3g), extrait de malt (0.3g), peptone (0.5g), D-glucose(1g), Agar-Agar (2g).
- Ajustez le volume à 100 ml d'eau distillée à l'aide d'une éprouvette graduée.
- Mettre la solution sous agitation pendant 5min.
- Bien fermez l'erlenmeyer avec du coton roulé de gaz, le bout est enveloppé de papier aluminium.



Figure 3.1: milieu de culture

- Stérilisation à 120°C pendant 20 min.
- Retirez de l'autoclave, et laissez refroidir à l'air ambiant.

❖ **Ecoulement sur les boîtes de pétri :**

- Stérilisez la paillasse à l'aide d'eau de javel, et allumez les becs benzène.
- Disposez un nombre adéquat de boîtes de pétri.
- Faites écouler le milieu à 3mm d'épaisseur.
- Laissez les boîtes semi ouvertes pour éviter l'accumulation de la vapeur, ensuite fermez et placez les boîtes à l'envers dans la paillasse.



Figure3.2 : écoulements des boîtes

❖ **Ensemencement :**

- L'ensemencement se fait par strie à l'aide d'une pipette pasteur à partir de notre culture (voir annexe 1).



Figure 3.3: Ensemencement

- Faites incuber à 30°C pendant 60h.

❖ **Préparation du 2^{ème} milieu culture :**

- Dans un erlenmeyer de 500 ml mettez les composés suivants : 2g d'extrait de levure, 1,8g de peptone, 1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g de KH_2PO_4 , 12,5g de D-Glucose.
- Ajustez le volume à 500 ml d'eau distillée.

- Prenez une boîte de pétri dont les colonies ont pris masse, et on les cueillit à l'aide d'une anse de pasteur.
- Incubez l'erenmeyer à 30°C pendant 24h.
- Après ce temps, les cellules ont été récupérées par centrifugation (7000tr, 10 min), on les lave avec un mélange chlorure de sodium dilué (NaCl) (0,1M) en solution, et mises en suspension dans le milieu de fermentation pour obtenir une concentration cellulaire de 0,5, 1, 2 et 4 g/L.
- Avant le processus de fermentation, les hydrolysats ont été concentrés sous vide à 40 ° C, en utilisant un rotavapor.
- Les essais de fermentation ont été effectués dans un Erlenmeyer de 150mL avec un volume de 125 ml d'hydrolysat. Les hydrolysats étaient supplémenté avec les nutriments suivants: extrait de levure (0,25 g), peptone (0,22g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,18 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,12 g), KH_2PO_4 (0,12g).

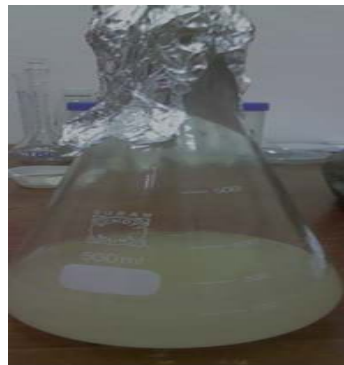


Figure 3.4: milieu de fermentation

- Le milieu de culture a été ensuite filtré à l'aide de pré filtre.
- Ajoutez une masse de 6.25g de grignon d'olive.
- Faites la fermentation à 30°C (pH entre 4,5 et 5) pendant 72h.



Figure 3.5: Dispositif de la fermentation

- Chaque 24h, faire un prélèvement 1 fois par jour,

Au cours de la fermentation, nous avons suivi :

- Le pH.
- Le dosage des sucres totaux et réducteurs.
- Le degré alcoolique.

3.4.3.1 Mesure du pH :

La détermination du pH est essentielle pour le contrôle du milieu, avant et au cours de la fermentation. Sa variation montre l'activité métabolique de la levure au cours de la transformation des sucres en alcool.

Mode opératoire :

- Prendre un volume de 10ml du milieu de fermentation dans un bécher,
- L'électrode est plongée dans la solution et l'opération s'effectue trois fois.

Expression des résultats

Le pH est mesuré par une lecture directe de la valeur indiquée sur le pH-mètre (de la marque CRISON MM 40).

3.4.3.2 Teneur des sucres réducteurs :

Le dosage des sucres réducteurs est effectué par la méthode de phénol / acide sulfurique introduite par Dubois et al[24],

Mode opératoire :

- Dans 9 tubes à essai, introduire 2ml de la solution sucrée (milieu de fermentation)
- Ajouter 0.05ml de phénol à 5%.
- Ajouter 2.5 ml d'acide sulfurique concentré.
- Les tubes sont laissés au repos 10 minutes, puis agités et placés pendant 10 à 20 minutes à une température de 30°C.
- L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 490 nm et nous déterminons la concentration à l'aide de la courbe d'étalonnage (voir annexe 2).



Figure 3.6: Test des sucres réducteurs

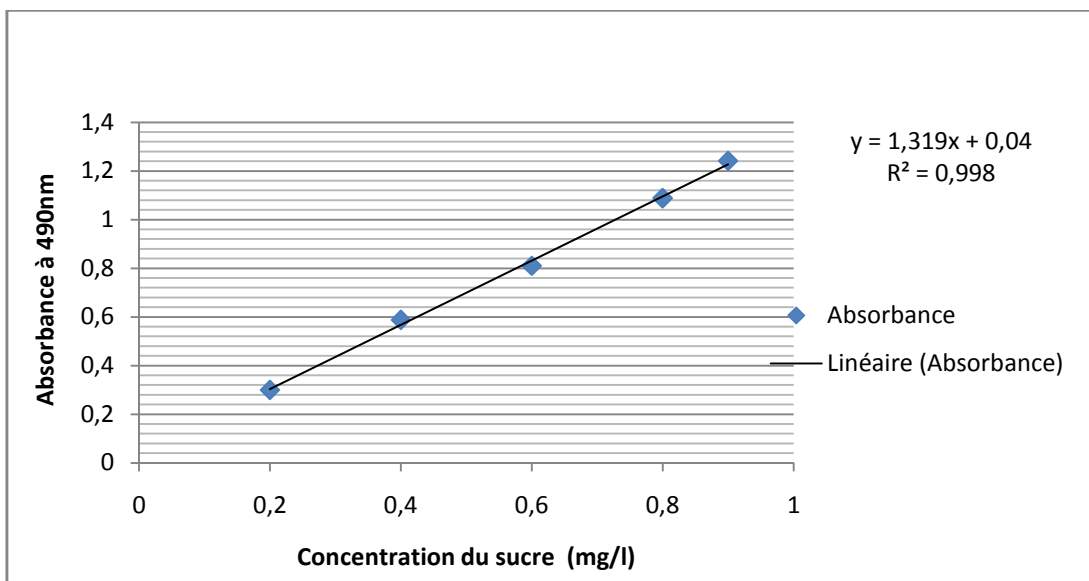


Figure 3.7 : Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs.

3.4.3.3 Teneur en sucre totaux :

Principe : cette hydrolyse est activée par l'utilisation du chauffage. Leur apparition est suivie en mesurant l'augmentation de la densité optique à 490nm [24].

3.5 La distillation alcoolique :

A la fin de fermentation, l'éthanol est récupéré à l'aide du montage de distillation, la température de distillation est entre 78 à 80°C.

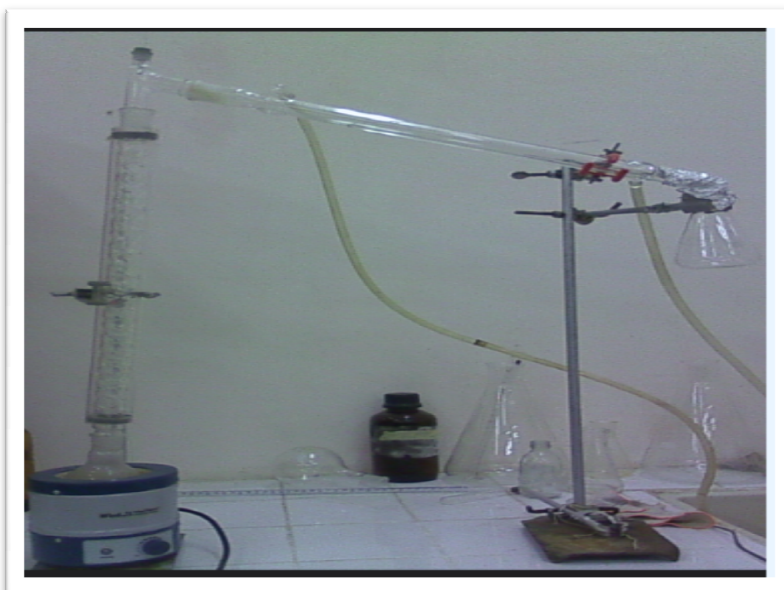


Figure 3.8: montage de distillation

3.5.1 Le degré alcoolique :

Le degré alcoolique (D^0) est le pourcentage volumique d'alcool. Il correspond au volume d'éthanol en ml présent dans 100ml du liquide fermenté. Pour se faire, tout d'abord, on effectue une distillation puis on dose l'éthanol du distillat grâce au titrage et cela après son oxydation avec la solution du dichromate de potassium concentrée dans un milieu acide [25].

Mode opératoire :

Dans un erlenmeyer de 100 ml :

- Introduire 10 ml de dichromate de potassium ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}, 2\text{K}^+$) (0.5M).
- Ajoutez 5 ml d'acide sulfurique concentré.
- Ajoutez 5 ml de distillat (éthanol) et fermer l'erlenmeyer.
- Agiter pendant 15 min.
- Faire le titrage avec le sulfate de fer et d'ammonium de (0.5M) tout en agitant la solution jusqu'à la coloration vert.

Expression des résultats

Le degré alcoolique est calculé selon la formule suivante :

$$D^0 = \left(100 * \frac{3}{2} * M \text{ CH}_3\text{COOH} * \left(\frac{([\text{CrO}_7^{2-}] * V(\text{CrO}_7^{2-}) - [\text{Fe}^{3+}] * V\text{E})}{6}\right)\right) / 1.05 \text{ (Eq 4)}$$

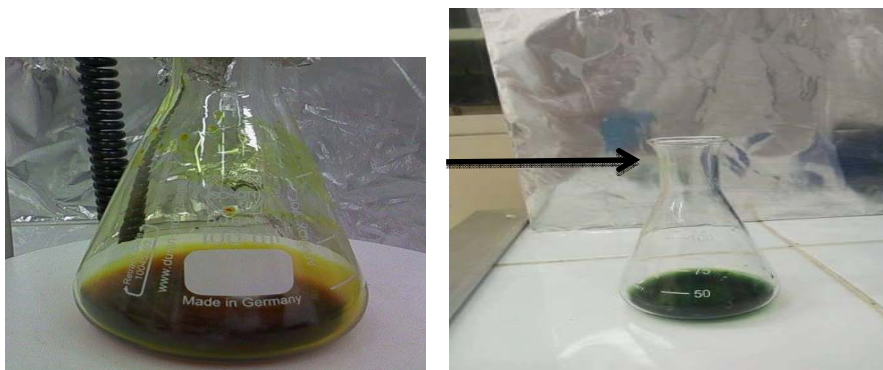


Figure 3.9: Test de degré alcoolique

3.6 Caractérisation de l'éthanol :

3.6.1 Vérification de la pureté :

La vérification de la pureté de l'éthanol a été effectuée à l'aide de la mesure de l'indice de réfraction afin de déterminer la concentration de l'alcool recueilli. La réfractométrie est une méthode d'analyse simple et rapide d'un produit liquide, permettant d'identifier un composé, de vérifier sa pureté ou de déterminer la composition d'un mélange. La mesure de l'indice de réfraction est effectuée grâce à un réfractomètre.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée à partir des indices de réfraction à différents pourcentage d'éthanol absolu à 96% afin de déterminer le pourcentage d'éthanol de la solution de distillation (voir annexe 3).

3.6.2 Mesure de la densité :

La densité d'une substance se note d et correspond au rapport de la masse volumique de cette substance par la masse volumique de l'eau.

Pour déterminer le poids d'un volume connu d'un liquide, on procède à la mesure de la densité à l'aide d'un pycnomètre.

Mode opératoire :

- Peser un pycnomètre de 10 ml vide.
- Ensuite, faire la pesé avec la solution (éthanol) et autre fois avec l'eau distillée.
- La densité est calculée selon la formule suivante :

$$d = \frac{M_0 - M_1}{M_0 - M_2} \quad (\text{Eq}t5)$$

Sachant que :

d : La densité.

M_0 = masse de pycnomètre vide.

M_1 = masse de pycnomètre rempli avec les échantillons d'éthanol.

M_2 = masse de pycnomètre rempli avec eau distillée.

3.6.3 Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a été réalisée à l'aide d'un chromatographe GC- 17A. La quantité injectée est 0,1 μl .

Les conditions opératoires de l'analyse par CPG sont:

- Colonne OV17,
- Type de détecteur : FID,
- Débit 12 ml/mn,
- Pression : 54 m pascal,
- Température de la colonne : 85 °C,
- Température de l'injecteur : 200°C,
- Température de détecteur: 220° C.

Le chromatogramme obtenu permet de déterminer l'aspect qualitatif de notre produit.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

4.1 Caractérisations de grignons d'olives :

4.1.1 Taux d'humidité :

Nous avons calculé le taux d'humidité selon l'équation (1), les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4.1: Teneur d'humidité.

	m_0	m_1	H%
Grignons d'olives	48.10	47.52	1.205

4.1.2 Taux de cendre :

Le taux de cendre est déterminé à partir de l'équation (2), les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4.2 : Taux de cendre

	P_0	P_1	C%
Grignons d'olives	39.7	37.2	6.297

4.2 Résultats et interprétation des analyses effectués au cours de la fermentation :

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de l'enzyme sur la production du bioéthanol

4.2.1 Evolution du pH durant la fermentation alcoolique :

Les résultats sont montrés dans les figures 4.1, 4.2, 4.3 et 4.4 :

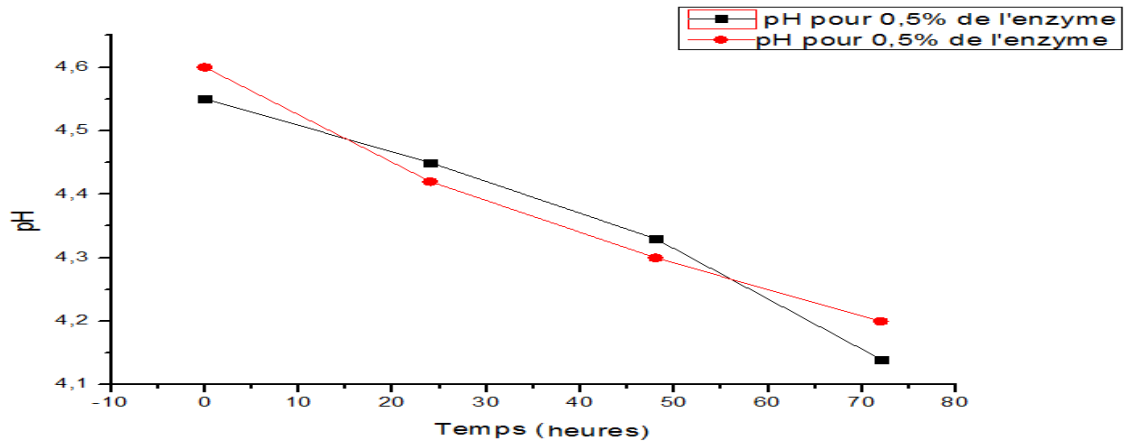


Figure4.1: Cinétique du pH durant la fermentation alcoolique pour une concentration cellulaire(0.5g/L).

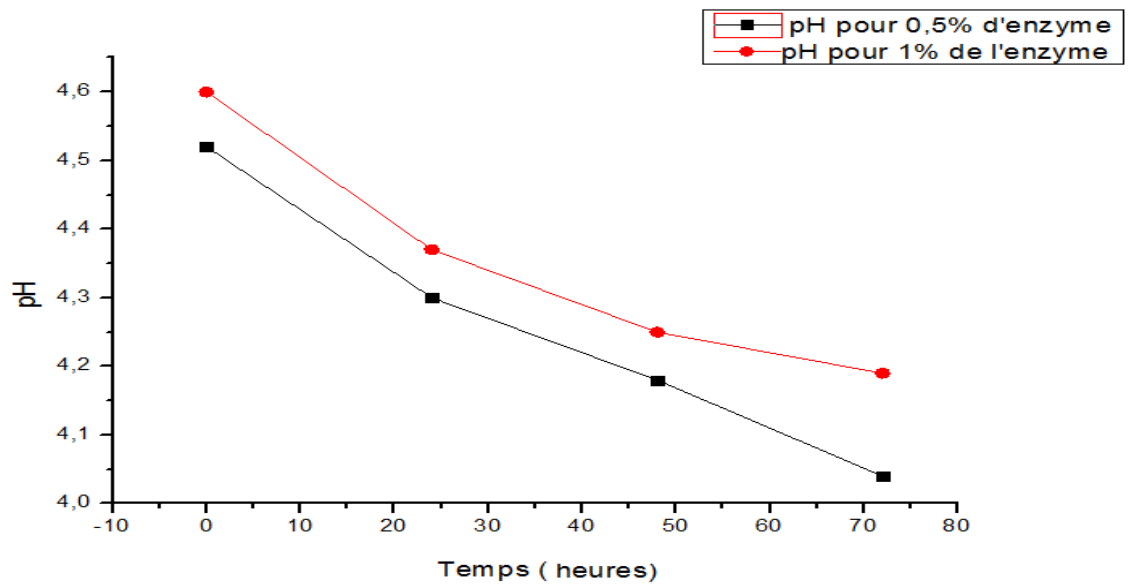


Figure4.2: Cinétique du pH durant la fermentation alcoolique pour une concentration cellulaire(1g/L).

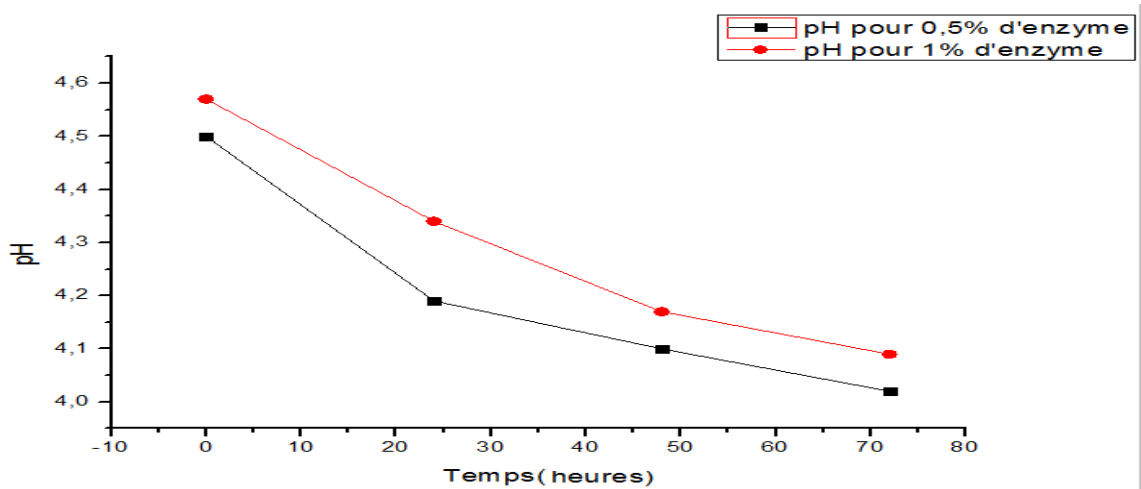


Figure4.3: Cinétique du pH durant la fermentation alcoolique pour une concentration cellulaire(2g/L).

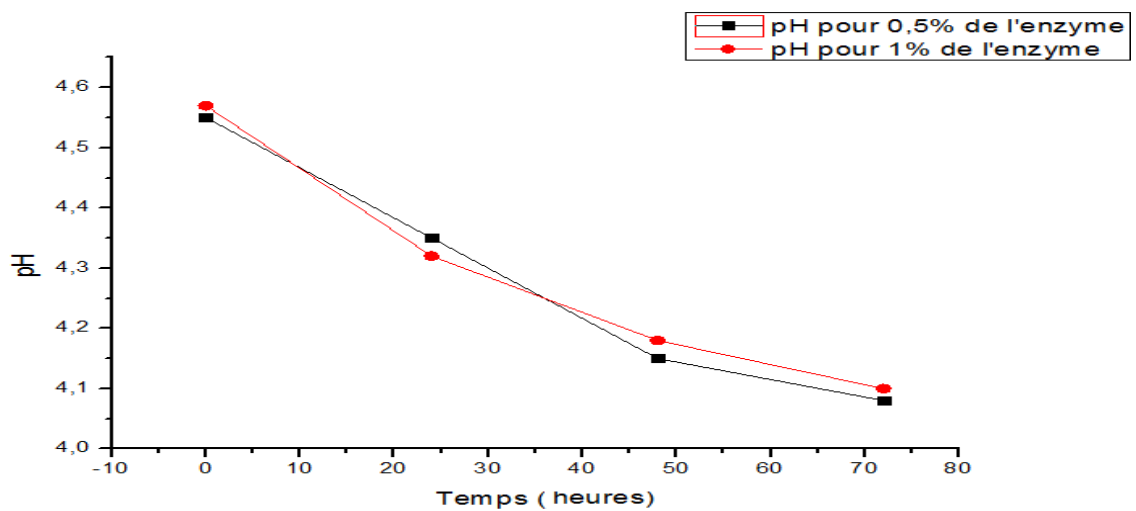


Figure4.4: Cinétique du pH durant la fermentation alcoolique pour une concentration cellulaire(4g/L).

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[26]. On observe une évolution du pH comme représenté sur les figures. Lors de cette étude, nous avons utilisé deux concentrations de l'enzyme cellulaire dans l'étape

hydrolyse enzymatique à savoir 0,5% et 1% afin de voir l'effet de l'enzyme sur l'activité de la levure au cours de la fermentation alcoolique.

Pendant la fermentation alcoolique, l'évolution classique du pH présente une diminution du pH jusqu'à l'arrêt de la fermentation.

4.2.2 Teneur des sucres réducteurs :

Les résultats de la teneur en sucres réducteurs des quatre différentes concentrations cellulaires sont représentés dans les figures 4.5 et 4.6 et 4.7 et 4.8.

La production de l'éthanol par la levure *saccharomyces cerevisiae* est nécessaire la consommation des sucres.

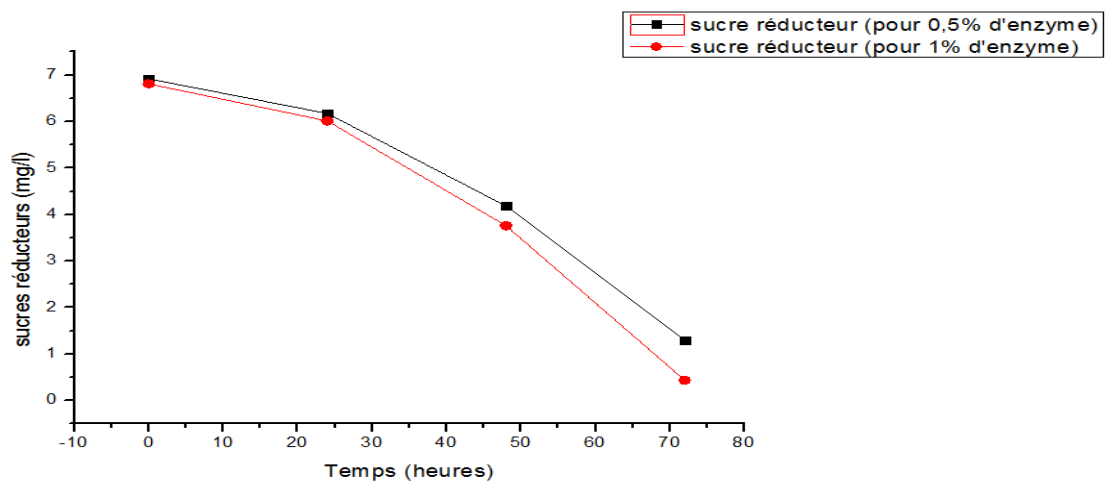


Figure 4.5: Evolution de la teneur en sucres réducteurs durant la fermentation pour une concentration cellulaire(0.5g/L).

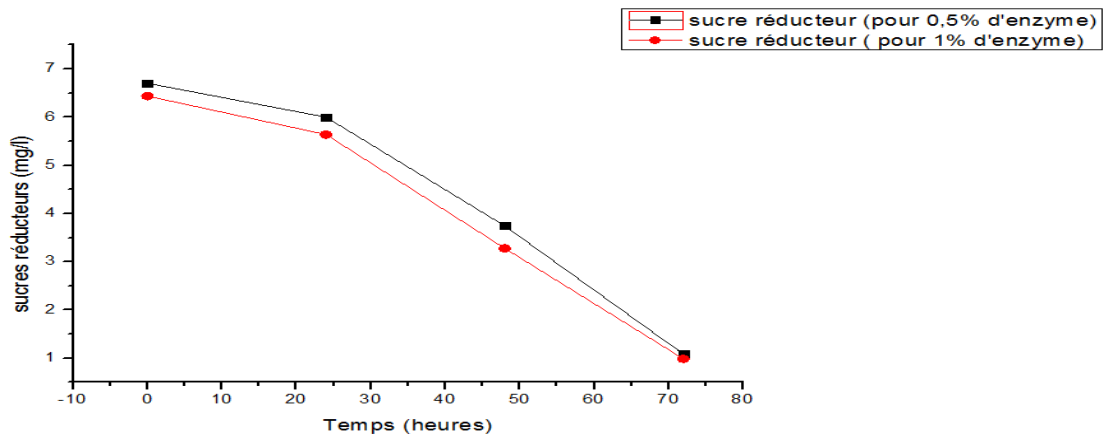


Figure 4.6: Evolution de la teneur en sucres réducteurs durant la fermentation pour une concentration cellulaire(1g/L).

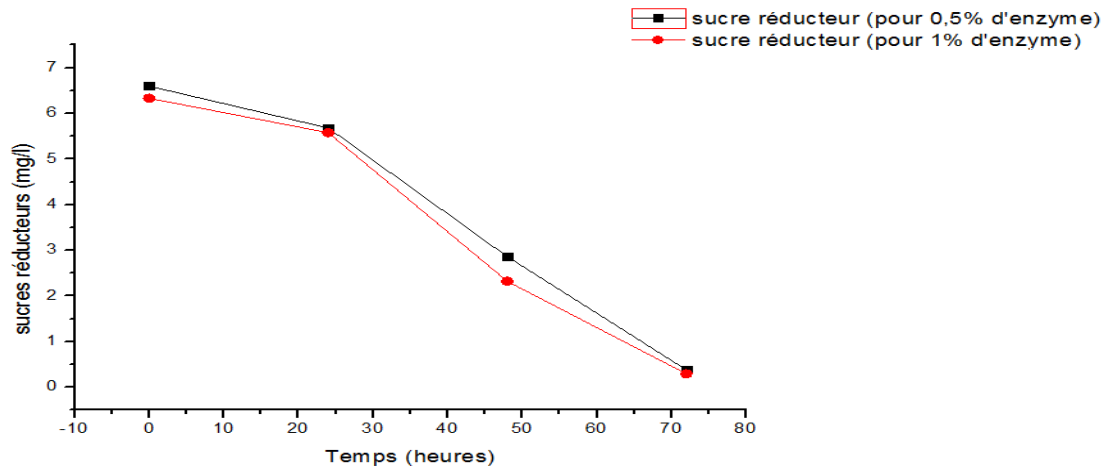


Figure 4.7: Evolution de la teneur en sucres réducteurs durant la fermentation pour une concentration cellulaire(2g/L).

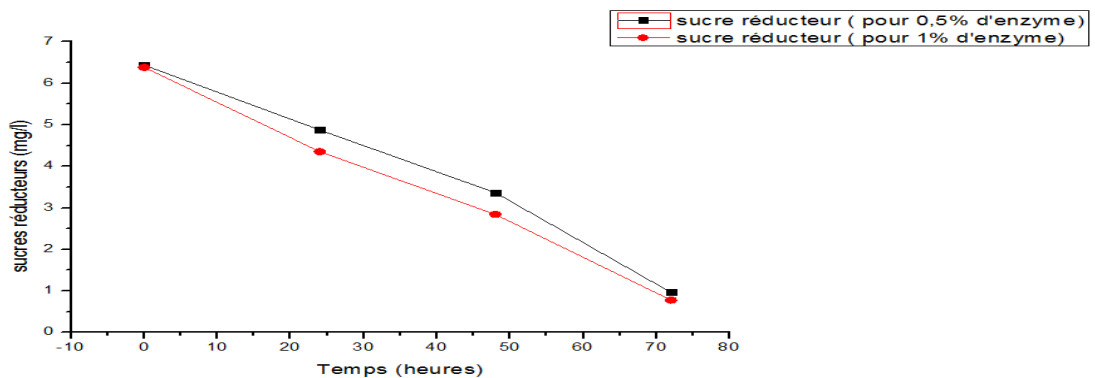


Figure 4.8: Evolution de la teneur en sucres réducteurs durant la fermentation pour le pour une concentration cellulaire (4g/L).

D'après les figures, on remarque que la teneur des sucres réducteurs est variable dans les quatre variables des concentrations cellulaires et on remarque aussi qu'à la fin de fermentation le % de sucre est faible donc la dégradation des sucres réducteurs est presque totale.

4.2.3 Teneur en sucre totaux :

Les résultats de teneur en sucre totaux sont mentionnés dans les figures suivantes 4.9 ; 4.10 ; 4.11 et 4.12:

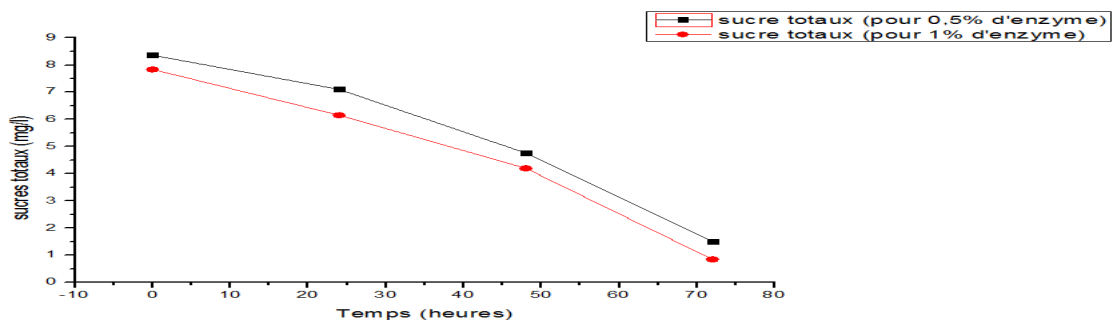


Figure 4.9: Evolution de la teneur en sucres totaux durant la fermentation pour une concentration cellulaire (0.5g/L).

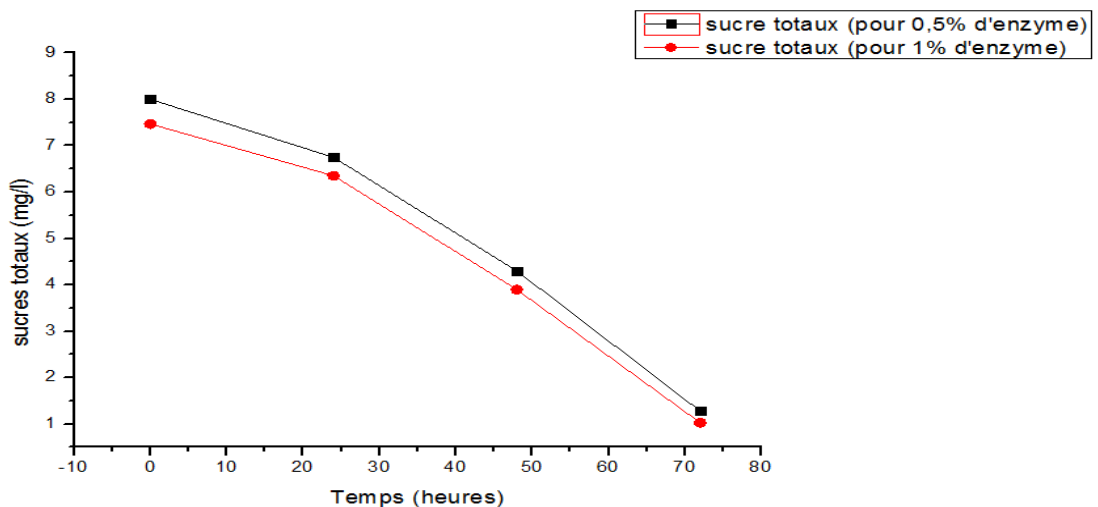


Figure 4.10: Evolution de la teneur en sucres totaux durant la fermentation pour une concentration cellulaire (1g/L).

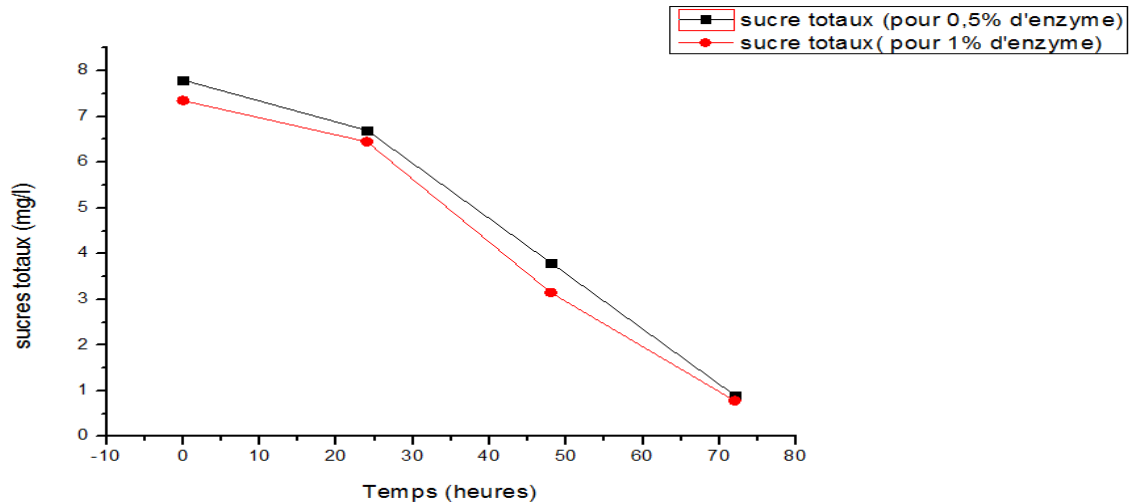


Figure 4.11: Evolution de la teneur en sucres totaux durant la fermentation pour une concentration cellulaire (2g/L).

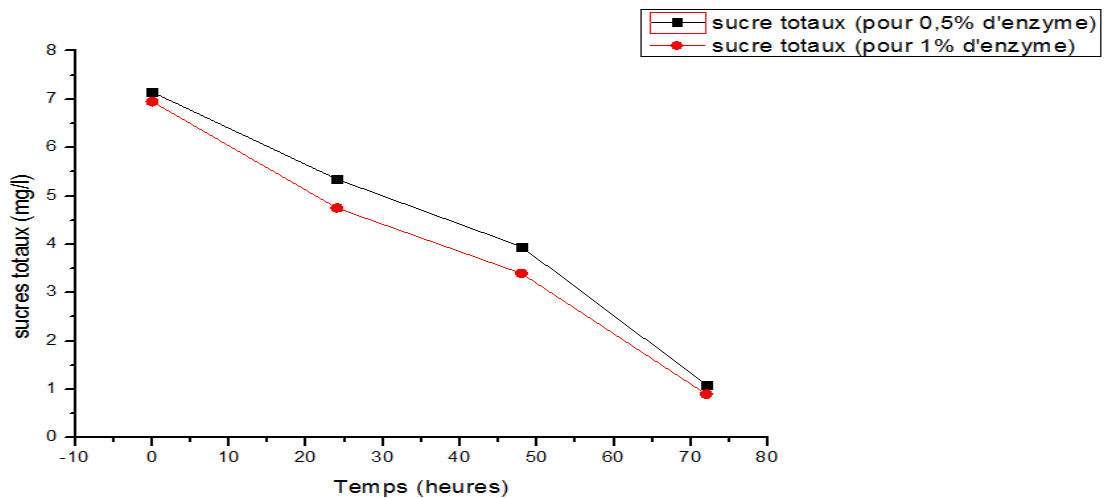


Figure 4.12: Evolution de la teneur en sucres totaux durant la fermentation pour une concentration cellulaire (4g/L).

L'examen des figures montre que les teneurs en sucres totaux varient entre 8.36 % à 7.15 % selon les concentrations cellulaires et la concentration de l'enzyme cellulaire utilisé dans l'étape de l'hydrolyse enzymatique, par contre les teneurs en sucres réducteurs varient entre 6.917 % et 6.437 %. On remarque que pour 72 heures de fermentation alcoolique, une importante dégradation du sucre est révélée.

4.2.4 Evolution du degré alcoolique durant la fermentation :

Les résultats de l'évolution du degré alcoolique sont illustrés dans les figures suivantes 4.13, 4.14, 4.15 et 4.16 :

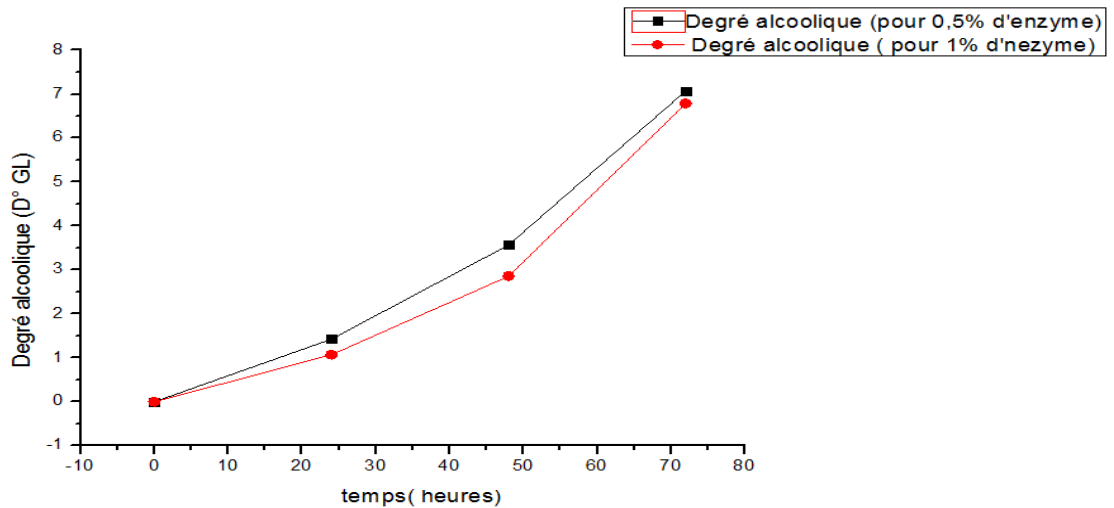


Figure 4.13: Evolution du degré alcoolique durant la fermentation pour une concentration cellulaire (0.5g/L).

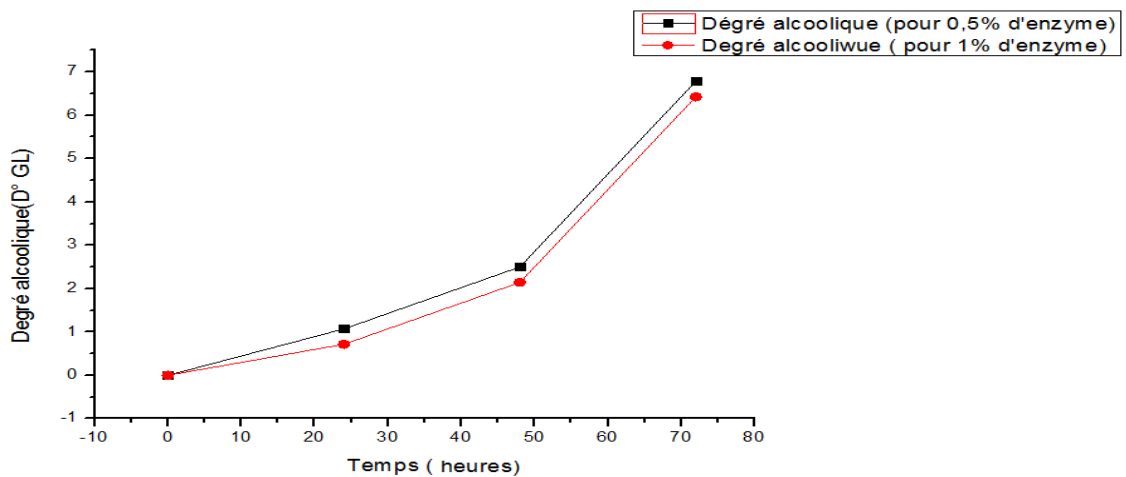


Figure 4.14: Evolution du degré alcoolique durant la fermentation pour une concentration cellulaire (1g/L).

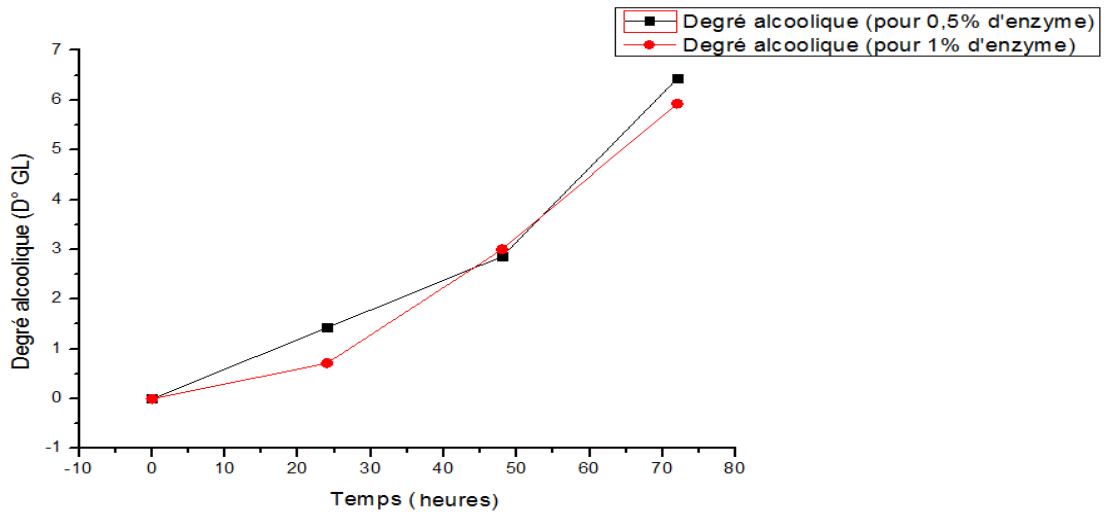


Figure 4.15: Evolution du degré alcoolique durant la fermentation pour une concentration cellulaire(2g/L).

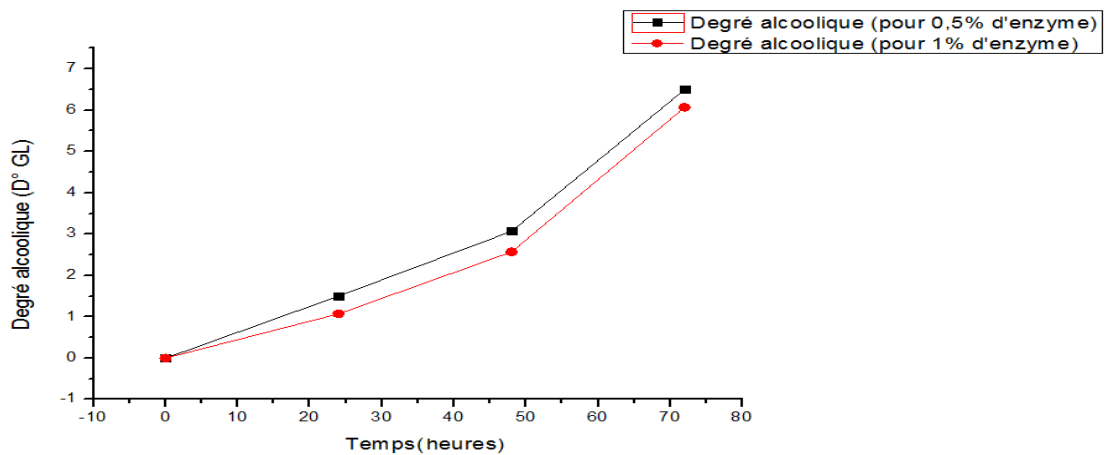


Figure 4.16: Evolution du degré alcoolique durant la fermentation pour une concentration cellulaire(4g/L).

D'après ces graphes on remarque que le degré alcoolique augmente au cours de la fermentation ce qui montre la production de l'alcool. Aussi on remarque que le degré alcoolique de grignon d'olive hydrolysé avec l'enzyme à

une concentration de 0,5% est élevée par rapport grignon d'olive hydrolysé avec l'enzyme 1%. Le degré alcoolique maximal obtenu est D° égale à 7.07°(GL).

4.3 Quantité de l'éthanol:

A la fin de la fermentation alcoolique, l'éthanol est distillé et le résultat de la quantité d'éthanol sur les tableaux suivants:

- **0.5 % de l'enzyme :**

Tableau 4.3 : quantité de la production d'éthanol

concentration cellulaire	Quantité de solution de fermenté	Quantité de l'éthanol
0.5g/L	125 ml	50 ml
1g/L	125 ml	35 ml
2g/L	125 ml	45 ml
4g/L	125 ml	40 ml

- **1% de l'enzyme :**

Tableau 4.4 : quantité de la production d'éthanol

concentration cellulaire	Quantité de solution de fermenté	Quantité de l'éthanol
0.5g/L	125 ml	43 ml
1g/L	125 ml	20 ml
2g/L	125 ml	40 ml
4g/L	125 ml	40 ml

Lors de la fermentation, bien que l'éthanol est le produit majeur, d'autres composés peuvent exister. Le meilleur rendement de l'éthanol est obtenu avec une concentration cellulaire égale à 0,5g/L pour un grignon d'olives hydrolysé

enzymatiquement (0.5% de concentration) par rapport au grignon d'olive (1% de concentration); et aussi il existe des autres composants comme l'eau... Pour cette raison on ne peut jamais obtenir un rendement de 100%. Le rendement maximal obtenu est 50%.

4.4 Indice de réfraction (vérification la pureté) :

D'après les mesure effectués d'indices de réfraction, nous déduisons les concentrations de l'éthanol dans les quatre échantillons :

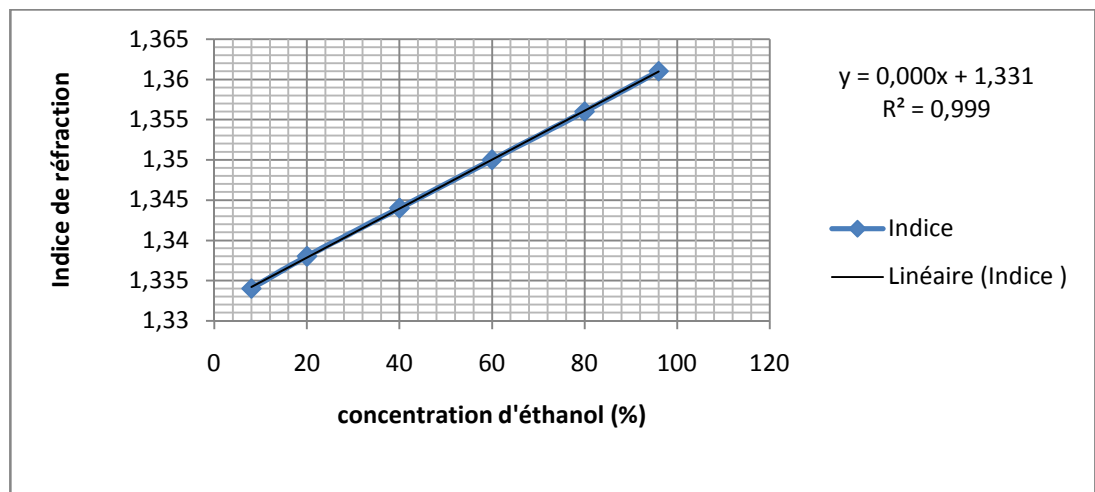


Figure 4.17: Courbe d'étalonnage de l'indice de réfraction.

Suite aux mesures effectuées de l'indice de réfraction, nous déduisons les concentrations des deux échantillons étudiés

Tableau 4.5 : indice de réfraction (0.5% de l'enzyme).

concentration cellulaire (g/L)	Indice de réfraction	Concentration d'éthanol en %
0.5	1.348	54.3
1	1.34	27.6
2	1.338	21
4	1.336	14.3

Tableau 4.6 : Indice de réfraction (1% de l'enzyme)

concentration cellulaire (g/L)	Indice de réfraction	Concentration d'éthanol en %
0.5	1.339	24.3
1	1.337	17.6
2	1.336	14.3
4	1.336	14.3

4.5 Densité :

La mesure de la densité est présentée dans les tableaux suivants :

Tableau 4.7 : Densité (0.5% de l'enzyme)

Concentration cellulaire (g/L)	Densité
0.5	0.85
1	0.89
2	0.91
4	0.96

Tableau 4.8 : Densité (1% de l'enzyme)

Concentration cellulaire (g/L)	Densité
0.5	0.89
1	0.94
2	0.96
4	0.96

Une diminution de la densité au cours de la fermentation, peut être expliquée par la transformation du glucose en alcool et la perte de masse sous forme de CO₂[26].

A partir de nos résultats, la densité la plus faible (0,85) est observée pour une concentration cellulaire 0,5g/L et une concentration d'enzyme égale à 0,5%.

Comparant nos résultat avec la densité de l'éthanol 96% ($d= 0.82$), On peut conclure que qu'il y'a eu de la transformation du glucose en alcool.

4.6 Chromatographie en phase gazeuse CPG :

Les résultats de l'analyse chromatographique CPG de l'éthanol sont montrés dans les tableaux suivants :

Tableau 4.9 : Temps de rétention (0.5% de l'enzyme)

Concentration cellulaire (g/L)	Temps de rétention
0.5	1.589
1	1.579
2	1.60
4	1.592

Tableau 4.10 : Temps de rétention (1% de l'enzyme)

Concentration cellulaire (g/L)	Densité
0.5	1.571
1	1.589
2	1.594
4	1.599

Temps de rétention pour l'éthanol pur : 1.577.

L'identification du bioéthanol s'effectue en le comparant l'indice de rétention du chromatogramme de l'éthanol pur dans les mêmes conditions d'analyse. L'observation des chromatogrammes montre que le temps de rétention de l'éthanol pure (1.577) est quasi proche du bioéthanol synthétisé(1.589).

Conclusion :

L'objectif visé par notre travail est de développer un bioéthanol à partir des dérivés d'une biomasse lignocellulosique (les grignons d'olives) en utilisant comme procédé, la fermentation alcoolique en présence de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Lors de cette étude, deux concentrations de l'enzyme cellulase (0,5% et 1%) dans l'étape hydrolyse enzymatique ont été utilisés afin de voir l'effet de l'enzyme sur l'activité de la levure au cours de la fermentation alcoolique à différentes concentrations cellulaires (0,5g/L, 1g/L, 2g/L et 4g/L).

L'évolution du pH présentait une diminution jusqu'à l'arrêt de la fermentation, cette variation du pH a montré une activité métabolique de la levure au cours de la transformation des sucres en alcool.

Par ailleurs, l'évolution de la teneur en sucre durant la fermentation a montré que pour 72 heures de fermentation alcoolique, une importante dégradation du sucre est révélée.

L'évolution du degré d'alcool durant la fermentation a montré que la cinétique de la production d'alcool est proportionnelle au taux de sucre contenu dans notre biomasse. Le produit obtenu présentait un degré alcoolique égale à 7.07°(GL) et un rendement de 50 % en bioéthanol.

Au vu de ces résultats, cette souche de levure peut être utilisée comme ferment efficace dans la perspective d'une production de bioéthanol à partir du grignon d'olives et en plus ce bioéthanol présente l'avantage d'être des produits 100 % bio, respecte l'environnement et ne porte pas atteinte à l'écologie.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] :Babakhouya.N, « Récupération des métaux lourds par l'utilisation des adsorbants naturels »;Thèse de magister ; Université M'hamed Bougara Boumerdès.2010
- [2] :Djadoun.S, « Influence de l'hexane acidifié sur l'extraction de l'huile de grignons d'olive par micro-ondes» ; Thèse de magister ; Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- [3] :Touati.L, « Valorisation des grignons d'olive étude de cas : Essai de valorisation en biocarburant » ;Thèse de magister ;Université M'hamed Bougara Boumerdès.2013
- [4] : Boudissa.F ; « Influence des radiations micro-ondes sur l'extraction de l'huile de grignon d'olive» ; Thèse de magister ; Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- [5] :Nefzaoui. A, « contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits », OLIVAE IV Tunisie , Janvier 1987 .
- [6] : LOUSSERI.R et BROUSSE.G, "L'olivier Ed. Maisonneuve et Larose – Paris, 1978
- [7] :Nefzaoui. A. « Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. : Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie ». Etude FAO production et santé animales 43. Rome .
- [8] :THIEBAUD .S ; « Valorisation chimique de composé lignocellulosiques : Obtention de nouveaux matériaux », thèse de Docteur, pp 11-17 ; Toulouse.1995.
- [9] :Ghattas.D ; « Valorisation des margines par digestion anaérobie ». Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA). Contrôle et gestion de qualité. 2004.
- [10] :Schwartzberg.H-G, et Chao.R-Y; « diffusivités de soluté dans les processus de lixiviation», la technologie alimentaire, 36 (2), pp 73-86.1982.
- [11] : Moulin.J-P, et Preau.D, « Transfert de la matière »; Technique de l'Ingénieur, Traité Génie des procédés.
- [12] :Sansoucy. R, « Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animales dans le bassin méditerranéen ». Rome. 1984.
- [13] :Scragg Alan.H ; « production de biocarburants, l'application et le développement», 2009.

[14] :Perrin .R, Scharff. J.P, « les biocarburants en France et en Europe » ; chimie industrielle ; Lyon, 2005.

[15]=Derbali.M ; « conception d'une bioraffinerie de second génération » ; Mémoire master académique ; Université Kasdi Merbah Ouaragla.2012.

[16] :CHAIB .H, « Etude et conception d'une bioraffinerie pour production des biocarburants de seconde génération » ; Mémoire de Magister énergétique et procédés. Université d'Ouargla. 2011.

[17] : OULD EL HADJ.M.D ;« Etude comparative de la productivité d'alcool brut de dattes selon les variétés ». Recherche Agronomique,(2001).

[18] :BEN CHABANE.M "intensification de la production d'éthanol biocarburant dans un bioréacteur avec recyclage cellulaire".

[19] :Zidani.S ; « influence des techniques de séchage sur la solubilité des protéines de la levure *Saccharomyces cerevisiae* » ;thèse de magister ; Université El hadj Lakhdar Batna ; 2009.

[20] : Larpent J. P. « La microbiologie de la fermentation panaière. Technologie et documentation ». Cedex, 51 p. 1992.

[21] :Comonis J. H. « Modélisation de l'activité des protéines RAS et régulation de cycle de division cellulaire de la levure *S. cerevisiae* », Thèse de doctorat. Université Laval. Canada 192p.1990.

[22]:Cuevas.M; Sanchez.S et Garcia Martin.J.F. « Valorization of olive stones for xylitol and ethanol production from dilute acide pretreatment via enzymatic hydrolysis and fermentation by *Pachysolen tannophilus* », biochemical engineering journal, September 2014.

[23] : Raherimandimby.R; « conception d'une cuve de fermentation-etude comparative de la fermentation et de la distillation des canne à sucre, ananas et litchi » ;mémoire d'ingénieur ;Université d'antananarivo ; 2003.

[24]: DUBOIT.M, GILIEK.L, HMITLON.J; REBERG.A et SMITH.F, « *colorimétric method for determination of sugars and related substances* ». Anal. Chem., 28, p: 350-356. 1956.

[25]:Handbook, 1991-1992.

[26]: Boulal. A. Benbrahim. Z., Benali.B. et. Ladjel. S, « Etude comparative de rendement de la production d'éthanol de deux variétés de dattes communes de faible valeur commerciale (Tinaceur et Aghmou) de Sud – Ouest de l'Algérie ».Revue des Energies Renouvelables Vol. 16 N°3 (2013)

Annexes

Annexe1 :

- Préparation de solution tampon de citrate de sodium de 0.05M et pH=4.8 :

D'après G. Gomori, 1995 pour préparer solution tampon de citrate de pH4.8 :

Solution A : 0.1M de la solution d'acide citrique.

Solution B : 0.1M de la solution de citrate de sodium.

23 mL de A + 27 mL de B, puis ajouté 50ml de l'eau distillé.

Et pour préparer solution tampon de 0.05M :

Prendre 50ml de la solution de 0.1M et compléter avec l'eau distillé jusqu'à 100ml.

- 1- Préparer solution d'acide citrique de 0.1M dans 23ml :

$$Mm=210.14 \text{ g/mol}$$

$$n = c * v = 0.1 * 23 * 10^{-3} = 2.3 * 10^{-3} \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{Mm} \rightarrow m = n * Mm = 2.3 * 10^{-3} * 210.14 = 0.48 \text{ g dans } 23 \text{ ml}$$

- 2- Préparer solution de citrate de sodium de 0.1M dans 27ml :

$$Mm=294.1 \text{ g/mol}$$

$$n = c * v = 0.1 * 27 * 10^{-3} = 2.7 * 10^{-3} \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{Mm} \rightarrow m = n * Mm = 2.7 * 10^{-3} * 294.1 = 0.79 \text{ g dans } 27 \text{ ml}$$

Annexe2 :

- Milieu de culture :

Dans un tube à essai :

- Ajouter 5ml d'eau distillé.
- Ajouter 0.01g de la levure *saccharomyces cerevisiae*, puis mélanger.

Annexe 3 :

- Courbe d'étalonnage des sucres totaux :

Mode opératoire : dubois 1956

Préparer solution de glucose (0.9g de glucose dans 100ml d'eau distillé).

- Prélever 2 ml de la solution sucré.
- Ajouter 0.05 ml de phénol à 5%.
- Ajouter 2.5 ml d'acide sulfurique concentré.
- Les tubes sont laissés au repos 10 minutes, puis agités et placés pendant 10 à 20 minutes à une température de 30°C.
- L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 490 nm.

Concentration (mg/l)	Absorbance à490nm
0,2	0,3
0,4	0,588
0,6	0,81
0,8	1,088
0,9	1,241

Annexe 4 :

- courbe d'étalonnage de l'indice de réfraction.

Concentration d'éthanol%	Indice de réfraction
8	1,334
20	1,338
40	1,344
60	1,35
80	1,356
96	1,361

