



UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1



Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité: Chimie Industrielle

CONTRIBUTION A LA VALORISATION ET LA CARACTÉRISATION DES SOUS-PRODUITS DE DATTES DANS LA PRODUCTION DU BIOÉTHANOL

Présentée par :

CHIBI SOUAD

Devant le jury composé de :

M ^{me} . HADJZIANE Amel	Professeur	U. Blida -1	Présidente
Mr. BOUCHEKIMA Bachir	Professeur	U. Ouargla	Examineur
Mr. BENRACHEDI Khaled	Professeur	U. Boumerdès	Examineur
Mr. NOURI L'Hadi	Professeur	U. Boumerdès	Examineur
Mr. EL-HADI Djamel	Professeur	U. Blida -1	Directeur de thèse

Le 09 Novembre 2020

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

*Tous les membres de ma famille qui m'ont toujours aidé et encouragé
durant toutes ces années. Plus particulièrement, merci à mes parents pour
leur soutien absolu et inconditionnel et leurs encouragements illimités, un
grand merci aussi à mon mari et mes enfants pour m'avoir supporté
pendant toutes ces années*

Tous mes amis (es).

RESUME

Dans cette étude, il a été procédé à des essais de production de bioéthanol à partir de dattes (Degla-Beida, Kentichi et Hamraya), au niveau de laboratoire par fermentation alcoolique du moût de ces variétés de dattes. Un fruit très riche en sucre et spécifique à la région Sud de l'Algérie. L'étude in vitro de l'effet des paramètres culturels tels que la concentration en l'éthanol, la température, le pH et la salinité sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* isolée de moût des dattes retenues dans cette étude a permis de sélectionner deux souches levuriennes (S1 et S3) les plus résistantes aux stress environnementaux potentiellement agressifs. Après, on a optimisé les facteurs influençant la croissance des levures sélectionnées en appliquant la méthodologie des plans d'expériences, afin d'obtenir une croissance maximale. L'effet de l'incorporation des cendres du noyau de *Deglet-Nour* sur le rendement en bioéthanol a été étudié.

Mots clés: Moûts de dattes, *Saccharomyces cerevisiae*, Biomasse, Alcool, Modélisation.

ABSTRACT

In this study, tests were carried out on the production of bioethanol from dates (Degla-Beida, Kentichi and Hamraya), a fruit that is very rich in sugar and specific to the southern region of Algeria. The in vitro study of the effect of cultural parameters such as ethanol concentration, temperature, pH and salinity on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from juice of dates selected in this study allowed the selection of two yeast strains (S1 and S3) most resistant to potentially aggressive environmental stresses. Then the factors influencing the growth of the selected yeasts were optimized by applying the methodology of the experimental plans, in order to obtain maximum of growth. The effect of the incorporation of ashes from the Deglet-Nour core on bioethanol yield was also studied.

Key words: Musts of dates, *Saccharomyces cerevisiae*, Biomass, Alcohol, Modeling.

ملخص

في هذه الدراسة اجريت سلسلة من الاختبارات على مستوى المخبر بهدف استخلاص كحول الإيثانول عن طريق التخمير الكحولي لعصير ثلاث انواع من اصناف التمور (دقلة البيضاء، كنتيشى وحمرايا) اصناف تعد ذات نوعية رديئة ويصعب تسويقها لكنها غنية جدا بالسكر الجلوكوز تتميز بإنتاجها مناطق الجنوب الجزائري. استنادا إلى إستراتيجية التصاميم التجريبية قمنا بدراسة تأثير العوامل البيئية مثل درجة الحموضة، درجة الحرارة، تركيز الإيثانول ودرجة الملوحة على نمو خميرة *Saccharomyces cerevisiae* التي تم عزلها من عصير عدة اصناف من التمر نو النوعية الرديئة. سمحت هذه الدراسة باختيار سلالتين من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* (S1 و 3S) أكثر مقاومة للعوامل البيئية. أخيراً، تم استغلال هاتين السلالتين لإنتاج الإيثانول الحيوي عن طريق تخمير التمر. كما تمت دراسة تأثير اضافة رماد نوات صنف دقلة نور على مردود انتاج الإيثانول العضوى.

كلمات دالة: عصير التمر، *Saccharomyce cerevisiae* سلالة، كتلة حيوية، كحول، نمذجة.

REMERCIEMENTS

الحمد والشكر لله الكريم على التوفيق

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur **Djmel EI-HADI**, professeur à l'USD de Blida pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire et de diriger ce travail de recherche. Il m'a accordé sa confiance tout au long de ces quelques années et je lui en suis vraiment très reconnaissante.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse, et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon manuscrit et à la rédaction de leurs rapports éclairés.

J'adresse également mes remerciements à Madame **Amel HADJZIANE-ZAFOUR**, professeur à l'USD de Blida, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, merci à Monsieur **Bachir BOUCHEKIMA**, Professeur à l'université de Ouargla ; à Monsieur **Khaled BENRACHEDI** et Monsieur **L'Hadi NOURI**, Professeur à l'université de Boumerdès pour avoir accepté de faire le déplacement jusqu'à l'université de Blida et qui ont bien voulu juger ce travail en étant examinateurs de cette thèse.

Mes plus vifs remerciements et toute ma reconnaissance vont aux personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement et à l'aboutissement de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
LISTE DES SYMBOLES	
INTRODUCTION	13

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Données sur les palmiers dattier	16
1.1. Historique	16
1.2. Taxonomie	16
1.3. Systématique	17
1.4. Morphologie	17
1.5. Ecologie	18
1.6. Le secteur dattier	19
1.6.1. Le secteur dattier dans le monde	19
1.6.2. Le secteur dattier en Algérie	20
1.7. La datte	21
1.7.1. Définition	21
1.7.2. Evolution physiologique de la datte	22
1.7.3. Composition chimique des dattes	23
1.7.4. Les variétés de dattes	27
1.7.5. Valorisation des sous-produits de dattes	27
1.7.6. Valorisation technologique	28
1.7.7. Valorisation biotechnologique	29
1.8. Le biocarburant et bioéthanol	31
1.8.1. Définition	31
1.8.2. Caractéristiques des biocarburants	32
1.8.3. Le bioéthanol	33
1.8.4. Filières d'utilisation du bioéthanol	41
1.9. La levure <i>saccharomyces cerevisiae</i>	43
1.9.1. Taxonomie et morphologie	43
1.9.2. Reproduction des levures	44
1.9.3. Physiologie et métabolisme de la levure	44
1.9.4. Notion stress chez les microorganismes	49
1.10. Plans d'expériences	53
1.10.1. Définition d'un plan d'expérience	53
1.10.2. Notion d'espace expérimental	54
1.10.3. Principaux avantages des plans d'expériences	55
1.10.4. Plan centré composite	55

1.10.5. Modèle mathématique	56
-----------------------------	----

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2. Matériel	57
2.1. Zone d'étude	57
2.2. Matériel végétal	58
2.3. Matériel biologique	59
2.4. Milieux et condition de culture	59
2.5. Méthodes	61
2.5.1. Isolement et purification des <i>S. cerevisiae</i>	61
2.5.2. Identification des levures par galerie AUXACOLOR	62
2.5.3. Conservation des souches pures obtenues	63
2.6. Préparation et caractérisation de jus de dattes	63
2.7. Préparation des cendres de noyaux de datte de Deglet-Nour	64
2.8. Mise en évidence du pouvoir fermentaire des souches sélectionnées	64
2.8.1. Condition de culture des tests de résistance des levures à l'éthanol	64
2.8.2. Condition de culture des tests de l'effet des paramètres environnementaux sur la croissance des souches	65
2.8.3. Condition de culture des tests de production du bioéthanol	66
2.8.4. Culture en mode batch	66
2.9. Technique et méthode analytique	67
2.9.1. Caractérisation physique de la datte	67
2.9.2. Analyse physico-chimique de la datte et des moûts de dattes	67
2.9.3. Analyse microbiologique	75
2.9.4. Analyse de la biomasse	75
2.9.5. Etude des paramètres de fermentation	78
2.9.6. Distillation fractionnée	79
2.9.7. Vérification de la pureté	80

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Isolement et caractérisation de souches de levure (<i>s. cerevisiae</i>) cultivée sur mout de rebut de dattes : Etudes physiologique de l'adaptation et de la résistance à l'éthanol	81
3.1.1. Introduction	81
3.1.2. Caractéristiques physiques et morphologiques des dattes	81
3.1.3. Caractérisation physico-chimique de la pulpe et de la solution mère de moût des six variétés étudiées	83
3.1.4. Caractérisation et identification des isolats de levures	87
3.1.5. Étude de la résistance des souches <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à la concentration initiale en éthanol	90
3.1.6. Cinétique de consommation de glucose	95

3.2. Optimisation et modélisation des paramètres environnementaux sur la croissance de " <i>saccharomyces cerevisiae</i> " isolée de rebut de datte	99
3.2.1. Introduction	99
3.2.2. <i>Matrice d'expérience</i>	99
3.2.3. <i>Evaluation de l'effet combiné des quatre facteurs sur la biomasse maximale des deux souches</i>	102
3.2.4. <i>Evaluation de l'effet combiné des quatre facteurs sur la vitesse de croissance maximale des deux souches</i>	104
3.2.5. <i>Evaluation de l'effet combiné des quatre facteurs sur la phase de latence des deux souches</i>	107
3.3. <i>La bio-production de l'éthanol à partir de déchets de dattes : effet de l'incorporation des cendres du noyau de Deglet-Nour sur le rendement</i>	110
3.3.1. Introduction	110
3.3.2. Pouvoir fermentaire de la levure sélectionnée	112
3.3.3. Purification du bioéthanol	115
3.3.4. Résultats de l'analyse de produit obtenu	118
CONCLUSION GENERALE	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

LISTE DES ILLUSTRATIONS, FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Palmier dattier	16
Figure 1.2	Présentation schématique du palmier dattier	18
Figure 1.3	Coupe schématique d'une datte	22
Figure 1.4	Composition biochimique globale de la datte	24
Figure 1.5	Structure cellulaire des levures	43
Figure 1.6	Schéma de la glycolyse (A) et du cycle de Krebs (B)	46
Figure 1.7	Utilisation du glucose par <i>Saccharomyces</i> sous conditions anaérobies (fermentation)	47
Figure 1.8	Le niveau bas du facteur est noté par -1 et le niveau haut par +1	54
Figure 1.9	Les points expérimentaux sont disposés dans le domaine d'étude défini par l'expérimentateur.	55
Figure 1.10	Plan composite centré	56
Figure 2.1	Situation géographique de la zone d'étude	58
Figure 2.2	Aspect des dattes cultivars "Mech-Degla, Horra, Bamakhluf, Hamraya, Kentichi et Degla-Beida	58
Figure 2.3	Extrait de trois variétés de rebut dattes utilisées pour la production du bioéthanol.	64
Figure 2.4	Préparation de l'inoculum	66
Figure 2.5	Courbe étalon du glucose (Méthode du Dubois)	71
Figure 2.6	La chambre de comptage de la cellule de Malassez.	76
Figure 2.7	Courbe d'étalonnage de dosage de l'éthanol avec étalon interne	79
Figure 3.1	Les pourcentages de la pulpe et du noyau dans la datte entière pour chaque variété étudiée.	83
Figure 3.2	Aspect culturale de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	87
Figure 3.3	Aspect culturale de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolée sur milieu solide, a : gélose WLN modifiée, b : gélose WLN, c : milieu Sabouraud chlorophinicol.	88
Figure 3.4	La lecture définitive après 48 heures d'incubation à 30°C.	88
Figure 3.5	Aspect microscopique des cellules des six souches après une culture de 24 heures sur YEPD liquide à 30°C et pH 4	89
Figure 3.6	Profil cinétique de croissance à différents teneurs en éthanol en 6 souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	91
Figure 3.7	Comparaison de la concentration de biomasse maximale en fonction de différentes tenures en éthanol pour 6 souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A) et en fonction de différentes souches pour 6 tenures en éthanol différentes (B).	93
Figure 3.8	Pourcentage de viabilité à différentes tenures en éthanol pour 6 souches de <i>S. cerevisiae</i>	94
Figure 3.9	Variation de la concentration de glucose au cours de la fermentation à différents teneurs en éthanol pour 6 souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96
Figure 3.10	Croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S1 et S3) dans des milieux de culture de pourcentage différents d'éthanol à 30°C.	98
Figure 3.11	Diagramme de Pareto pour X_{max} de S1 et S3 maximale	102
Figure 3.12	Diagramme de Pareto pour μ_{max} de S1 et S3	105
Figure 3.13	Diagrammes de Pareto pour le temps de latence (λ) de S1 et S3	106

Figure 3.14	Diagramme de production de l'éthanol	110
Figure 3.15	Cinétique de la croissance de <i>S. cerevisiae</i> sur différents moûts au cours de la fermentation.	112
Figure 3.16	Concentration de l'éthanol en fonction de temps de fermentation	114
Figure 3.17	Changement de couleur du mout de Hamraya: (a) moût de datte avant la fermentation; (b) moût de datte après 3jours de fermentation; (c) bioéthanol purifié.	118
Figure 3.18	Comparaison entre les spectres de l'éthanol et le bioéthanol produite	119
Tableau 1.1	Productions annuelles de dattes, entre (2010 -2013)	19
Tableau 1.2	Production nationale par wilaya	21
Tableau 1.3	Valorisation biotechnologique de sous-produit des dattes.	30
Tableau 1.4	Principales caractéristiques des biocarburants et comparaison avec celles de l'essence et du gazole	32
Tableau 1.5	Avantage et inconvénients du bioéthanol	35
Tableau 1.6	Proportion massique de lignine, hémicellulose et cellulose dans différents types de biomasse	38
Tableau 1.7	Différentes filières d'utilisation du bioéthanol	42
Tableau 2.1	Facteurs de correction correspondant aux divers acides	70
Tableau 3.1	Caractéristiques physiques et morphologiques des dattes	82
Tableau 3.2	Résultats des caractéristiques physico-chimiques de la pulpe et le moût de six variétés de rebut de datte.	84
Tableau 3.3	Comparaison des taux spécifiques de croissance maximum (μ_{max}) pour les 6 souches en fonction de temps de latence à différentes concentration en éthanol.	93
Tableau 3.4	Concentration de glucose résiduel à différentes teneurs en éthanol pour 6 souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	97
Tableau 3.5	Définition des différents niveaux des variables de la matrice d'expériences d'un plan Composite Centré.	100
Tableau 3.6	Présentation des paramètres de croissance pour chaque expérience sur milieux synthétique des deux souches (S1, S3).	101
Tableau 3.7	Effet des paramètres environnementaux sur la concentration de biomasse maximale (X_{max}).	103
Tableau 3.8	Effet des paramètres environnementaux sur le taux spécifique maximal de croissance (μ_{max}).	105
Tableau 3.9	Effet des paramètres environnementaux sur la phase de latence (λ).	107
Tableau 3.10	Composition minérale de cendre du noyau de Déglet-Nour	111
Tableau 3.11	Biomasse maximale, Sucres consommés, Volume en éthanol après la 2 ^{eme} distillation fractionnée ainsi l'indice de réfraction pour les trois variétés de dattes étudiées	117

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

a_1, a_2, a_3	Paramètres
ATP	Adénosine Triphosphate
ADP	Adénosine Diphosphate
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
CSTR	Continuous Stirred Tank Reactors
CCF	Central Composite Face-centered
DO600nm	Densité Optique à 600 nm
ETBE	Ethyl-tertiobutyl-éther.
EMHC	Ester méthylique d'huile de colza.
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FA	Fermentation alcoolique
FADH ₂	Flavin adenine dinucleotide
f	Le facteur de dilution.
IOR	Indice d'octane recherche.
IP	Iodure de propidium
IARC	International Agency for Research on Cancer
<i>lag</i>	Le temps de latence
Levurienne	Néologisme constituant l'adjectif de levure, au même titre que bactérienne pour bactéries.
MS	Matière sèche
NAD	Nicotinamide adénine dinucleotide
N	Le nombre de mL de solution de glucose à 5 % utilisée
N'	Le nombre de mL de filtrat utilisé pour la décoloration de la liqueur de Fehling
n_D^{20}	Index de réfraction à 20°C
PVR	La pression de vapeur Reid est mesurée à une température de 37,8°C
P _i	Phosphate inorganique
PCI	Pouvoir calorifique inférieur.
R	La quantité des sucres réducteurs en g/litres ;
r	Le rapport du taux de sucres totaux sur le taux d'humidité
rpm	Rotation par minutes
S. <i>cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UFC	Unité Formant Colonie
v/v	Volume à volume.
μ / μ_{\max}	Taux népérien de croissance (h ⁻¹) / Le taux de croissance maximum
X ₀ / X _{max}	La densité cellulaire initiale / La densité cellulaire maximale
YPD	Yeast peptone dextrose
YEPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) est une plante vitale pour les régions désertiques du Moyen Orient et du nord-africain où il constitue une base de survie à leurs populations. On compte actuellement de par le monde, plus de 2000 variétés ou cultivars différents, mais, seul un nombre limité est valorisé pour la qualité de leurs fruits [1]. La filière dattes est classée parmi les filières stratégiques en Algérie, à côté des viandes rouges et blanches, le lait, les céréales et la pomme de terre.

En Algérie, la phoeniciculture constitue le pivot de l'agriculture saharienne avec une prédominance du palmier dattier d'environ 22% de la superficie totale de plantations, avec un nombre de palmiers dattiers est plus de 18 million, et un nombre de variétés qui dépasse les milles. La production totale dépasse les 800.000 t/an, dont une grande partie est utilisée dans l'alimentation de bétail ou à l'échange avec les pays voisins spécialement le Mali et le Niger sous forme de troc [2]. Parmi les régions phoenicicoles potentielles en Algérie, la vallée de l'Oued-Righ, est très connue par sa diversité génétique du palmier et la particularité spécifique de sa population, très attachée à la culture phoenicicole. Ces ressources génétiques sont très mal exploitées à l'exception de Deglet Nour et à degré moindre, Ghars, Degla-Beida et Mech-Degla qui présentent une importance économique majeure.

Les activités agricoles et agro-industrielles, génèrent des quantités importantes de déchets qui constituent une nuisance certaine pour l'environnement et une perte de matière recyclable. Les rebuts de dattes représentent une moyenne de 53% de la production dattier annuellement [3]. Les fruits de dattes sont dotés de teneurs élevées en sucres (73-83%) : glucose, fructose et saccharose. Ils contiennent également des protéines, des lipides, des éléments minéraux et des vitamines, et représentent par conséquent un substrat de choix pour la production de nombreuses substances à forte valeur ajoutée.

La valorisation de sous-produits de dattes, de par sa richesse en sucres et son faible prix sur le marché peut être transformé par bioconversion anaérobie en présence de *Saccharomyces cerevisiae* pour obtenir de l'alcool à haut degré, substance énergétique stratégique qui peut remplacer le pétrole léger comme carburant ou au moins permettre le coupage de l'essence (5 à 10% de bioéthanol).

En outre ravitailler un véhicule avec un mélange d'éthanol E10 (éthanol à 10%) réduit les émissions de monoxyde de carbone d'environ 25% [4]. Il est considéré aussi comme une source d'énergie renouvelable, non toxique, biodégradable et plus respectueux de l'environnement. D'autre part, il est utile de signaler que l'Algérie importe entre 30 000 et 50 000 hectolitres d'alcool éthylique par an afin de couvrir ses différents besoins [5]. La production d'éthanol à partir des déchets de dattes constitue une solution intéressante sur le plan économique. Cet alcool peut remplacer avantageusement celui obtenu par voie chimique à partir des produits pétroliers.

Les noyaux comme sous-produit sont dans la plupart des pays producteurs de dattes jetés ou partiellement incorporés dans l'alimentation animale. Leur valorisation dans l'alimentation humaine reste très faiblement explorée en dehors de quelques applications traditionnelles [6]. Ils renferment des composants extractibles à valeur ajoutée élevée. Les noyaux de dattes sont aussi riches en protéines [7], fibres alimentaires, composés phénoliques, antioxydants et peuvent être utilisés pour l'amélioration de la valeur nutritionnelle des produits incorporés.

L'objet de cette thèse s'inscrit dans ce contexte et porte sur la multiplication des ressources produites d'énergie dont les rebuts de dattes et les cendre du noyau de Deglet-Nour font partie. Six variétés de dattes (Mech-Degla, Horra, Bamakhluf, Hamraya, kentichi et Degla-Beida), provenant de sites oasiens enquêtés, ont été retenues pour cette étude, en vue de l'obtention d'un additif écologique digne d'être le carburant du futur. Il s'agit précisément de produire de l'éthanol par fermentation des moûts de ces variétés de dattes. Les microorganismes utilisés pour la production de bioéthanol à partir des sucres sont des levures et la bactérie *Zymomonas* [8,9], mais la levure *Saccharomyces*

cerevisiae reste la plus adaptée et donc la plus utilisée pour la production de bioéthanol [10] et autres produits industriels comme le glycérol [11].

Les principaux objectifs sont :

- L'isolement et la caractérisation des levures du genre "*Saccharomyces cerevisiae*" cultivée sur moûts de rebut de dattes ;
- Etudes physiologique de l'adaptation et de la résistance de "*Saccharomyces cerevisiae*" isolée de rebut de dattes à différentes concentrations de l'éthanol ;
- Optimisation et modélisation des paramètres culturaux sur la croissance de "*Saccharomyces cerevisiae*" isolée de rebut de datte.
- La bio-production de l'éthanol à partir de rebut de dattes : Etude de l'effet de l'incorporation des cendres du noyau de Deglet-Nour sur le rendement de bioéthanol.

Dans ce manuscrit, nous présenterons dans le premier chapitre « **synthèse bibliographique** » des généralités sur les dattes et les palmiers dattiers, une présentation sur les biocarburants et le bioéthanol. De plus, des données de base sur la fermentation alcoolique en présence de *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi que l'effet des différents facteurs environnementaux sur la croissance des levures, et les différents modèles mathématiques du métabolisme des levures. Le second chapitre, « **matériel et méthodes** » présentera les protocoles de la caractérisation physico-chimique de la matière première, les diverses techniques de l'isolement des souches bactériennes à partir du l'extrait des dattes et les principales étapes de la production de bioéthanol par fermentation des dattes et les techniques de leur purification. Le troisième chapitre « **résultats et discussions** » comprend trois parties, chaque partie présente la synthèse des résultats expérimentaux obtenus. Enfin, une dernière partie du mémoire concerne les « **conclusions et les perspectives** » de ce travail. Nous synthétisons les principaux résultats obtenus, leur implication en termes de protection de l'environnement et les perspectives dégagées serviront à la poursuite de ce travail de recherche.

CHAPITRE 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Données sur les palmiers dattiers

1.1. Historique

Le palmier dattier est l'un des arbres fruitiers les plus anciennement cultivés. Les documents les plus anciens en Mésopotamie (Irak actuellement) montrent que sa culture se pratique depuis 3500 ans avant J.C. A la même époque, les dattiers étaient cultivés en Irak occidental, à travers l'Arabie et jusqu'en l'Afrique du Nord. Ce n'est qu'au milieu du XIX^{ème} siècle que les plantations furent établies dans les vallées chaudes de Californie et dans l'Arizona méridional. Au cours des siècles, au Maghreb, le palmier a fait l'objet de différentes plantations réparties dans des lieux disposant de quantités d'eau relativement importantes. Le palmier dattier permet une pérennité de la vie dans les régions désertiques. Ses fruits sont un excellent aliment grâce à leur effet tonique et légèrement laxatif [12].

1.2. Taxonomie

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linne en 1753. *Phoenix* dérivé de *Phoinix*, nom du dattier chez les grecs de l'antiquité qui le considéraient comme arbre des phéniciens ; *dactylifera* vient du latin *dactylis*, dérivant du grec *dactylus*, signifiant doigt (en raison de la forme du fruit), associé au mot latin *fero*, porté, en référence aux fruits.



Figure 1.1: Palmier dattier

Le genre *Phoenix dactylifera* L fait partie de la classe des Monocotylédones, d'une famille de plantes tropicales (*Palmoe* ou *Arecaceae*), la mieux connue sur le plan systématique. Elle est représentée par 200 genres et 2700 espèces réparties en six familles. La sous famille des *Coryphoideae* est elle-même subdivisée en trois tribus [13].

1.3. Systématique

La classification botanique du palmier dattier donnée par Djerbi en 1994 [15] est la suivante :

Groupe : *Spadiciflore. S* ;

Embranchement : *Angiospermes* ;

Classe : *Monocotylédones* ;

Ordre : *Palmales* ;

Famille : *Palmoe* ;

Tribu : *Phoenixées* ;

Genre : *Phoenix* ;

Espèce : *Phoenixdactyliféra* L.

Le genre *Phoenix* comporte au moins douze espèces, la plus connue est le *dactyliféra* dont les fruits « dattes » font l'objet d'un commerce international important [16]

1.4. Morphologie

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

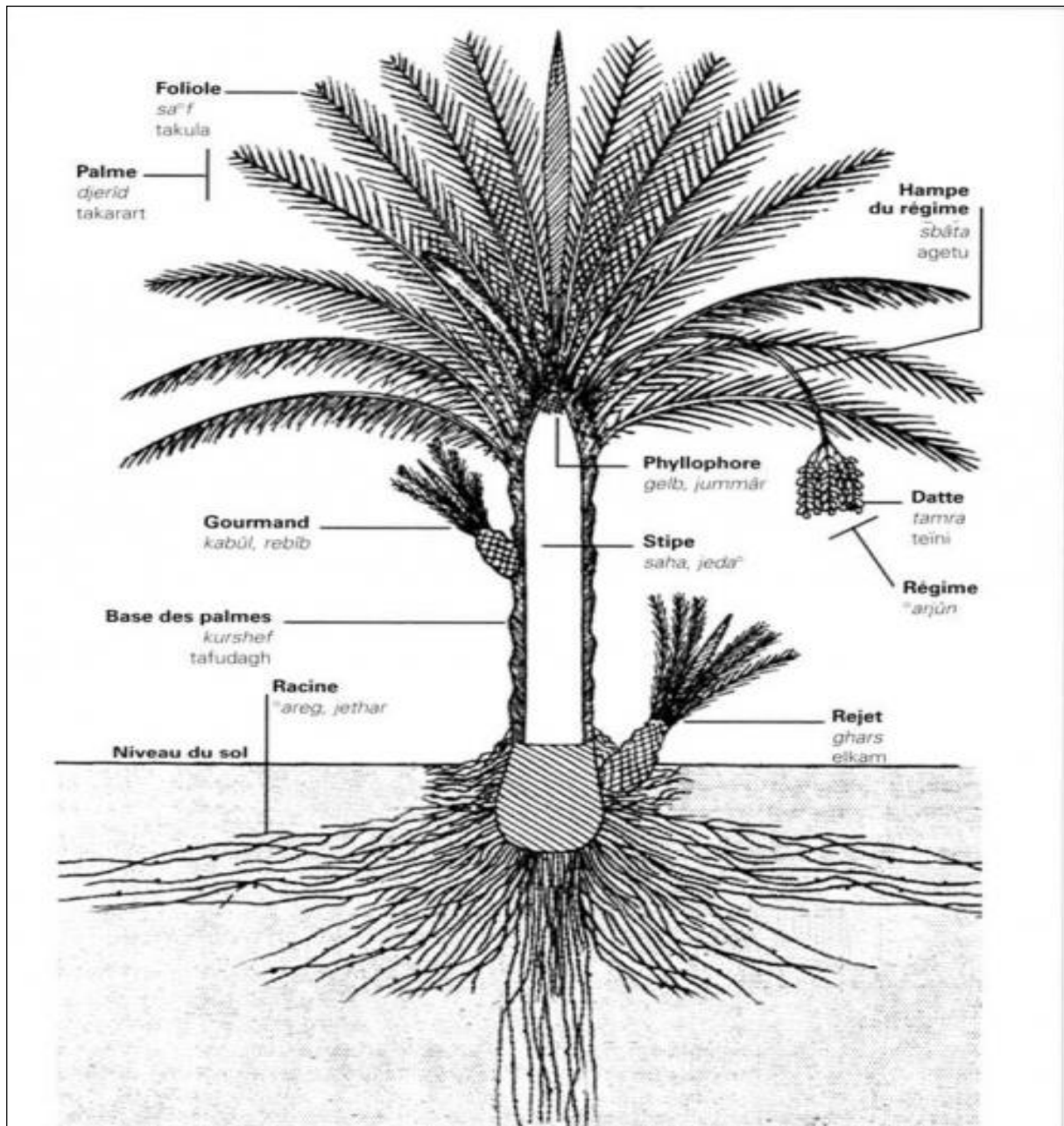


Figure 1.2 : Présentation schématique du palmier dattier [12]

1.5. Ecologie

Le palmier dattier est cultivé comme arbre fruitier dans les régions chaudes arides et semi-arides. Cet arbre peut s'adapter à de nombreuses conditions grâce à sa grande variabilité. Le dattier est une espèce thermophile, il exige un climat chaud, sec et ensoleillé. C'est un arbre qui s'adapte à tous les sols. Il est sensible à l'humidité pendant la période de pollinisation et au cours de la maturation [12,16].

1.6. Le secteur dattier

1.6.1. Le secteur dattier dans le monde

La production mondiale de dattes, d'après les statistiques de la FAO, avait atteint en 2018 843 0432,40 tonnes (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Productions annuelles mondiale de dattes en tonnes, entre (2015 – 2018) [17]

Pays	2015	2016	2017	2018
Albanie	13599,00	14106,00	12978,00 1	13423,00
Algérie	990377,00	1029596,00	1058559,00	1094700,00
Bahreïn	10886,00	10500,00	10800,00	10682,00
Bénin	1368,00	1389,00	1414,00	1439,00
Cameroun	597,00	602,00	619,00	635,00
Tchad	20580,00	20848,00	21106,00	21364,00
Chine	155037,00	154965,00	156629,00	158294,00
Colombie	57,00	57,00	43,00	33,00
Djibouti	116,00	114,00	116,00	117,00
Égypte	1684917,00	1549260,00	1542111,00	1562171,00
Iran	1032804,00	1185165,00	1202200,00	1204158,00
Iraq	602348,00	615211,00	618818,00	614584,00
Jordanie	20141,00	13401,00	25222,00	19588,00
Kenya	1106,00	1125,00	1134,00	1144,00
Koweït	94813,00	93147,00	87391,00	96656,00
Libye	178632,00	173495,00	174862,00	176229,00
Mauritanie	21000,00	21438,00	22000,00	18857,00
Mexique	7427,00	8086,00	8215,00	8946,00
Maroc	100376,00	125329,00	129562,00	111701,00
Namibie	356,00	361,00	359,00	357,00
Niger	39684,00	16444,00	17000,00	22154,00
Palestine	3484,00	3507,00	3508,00	3508,00
Oman	344690,00	355332,00	360917,00	368808,00
Pakistan	467756,00	438989,00	440606,00	471670,00
Pérou	192,00	217,00	224,00	274,40
Qatar	21491,00	20696,00	21843,00	22100,00
Arabie saoudite	1038530,00	1153009,00	1224192,00	1302859,00
Somalie	12935,00	12713,00	13000,00	13000,00
Espagne	4002,00	3741,00	4000,00	4000,00
Soudan	431000,00	432100,00	433500,00	437835,00
Swaziland	300,00	320,00	330,00	319,00
Syrie	4373,00	4013,00	3986,00	4039,00
Tunisie	174000,00	180000,00	193000,00	195000,00
Turquie	26277,00	28295,00	31765,00 3	33232,00
Émirats arabes unis	402937,00	410958,00	344714,00	345119,00
USA	35380,00	33874,00	39299,00	37240,00
Yémen	57849,00	55828,00	55181,00	54197,00
Monde	8001417,00	8168231,00	8261203,00	8430432,40

Le plus grand producteur du monde est l'Égypte avec 1562171 tonnes suivi par l'Iran avec 1204158 tonnes, l'Arabie Saoudite 1302859 tonnes et l'Algérie avec 1094700 tonnes, et d'autres pays qui ont une production considérable l'Iraq, Pakistan et le Soudan.

1.6.2. Le secteur dattier en Algérie

L'Algérie, selon les statistiques récentes disponibles, occupe une superficie évaluée à 164 000 hectares pour un nombre de palmiers estimé à plus de 18 millions d'unités et une production de dattes, toutes variétés confondues, de près de 790.000 tonnes par an. Les régions phoenicoles se situent généralement au sud de l'atlas saharien et couvrent 16 wilayas.

La production par variété de dattes est variable selon les années. Elles se situent à près de :

- ✓ 300 000 tonnes pour Deglet-Nour
- ✓ 110 000 tonnes pour Ghers et analogues
- ✓ 220 000 tonnes pour Degla Beïda et analogues

En termes d'exportation, le volume de dattes exportées est variable selon les années et se situe aux environs de 12 000 tonnes par an. La datte Deglet-Nour est exportée vers plus de 35 pays.

Du point de vue quantitatif, la production algérienne représente 10% de la production mondiale occupant ainsi la quatrième place, mais du point de vue qualitatif, elle occupe le premier rang grâce à la variété Deglet-Nour, la plus appréciée mondialement (Tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Production nationale par wilaya [18]

<i>Wilaya</i>	<i>Superficie occupée (hectare)</i>	<i>Nombre de palmiers dattiers</i>	<i>Production en quintaux</i>
Biskra	42 000	4 213 000	2 917 180
El Oued	36 200	3 730 000	2 022 870
Adrar	27 700	3 705 000	865 080
Ouargla	21 400	2 507 000	1 131 300
Béchar	13 900	1 591 000	239 240
Ghardaïa	10 500	1 241 000	470 000
Tamanrasset	7 000	689 000	108 590
Illizi	1 200	126 000	15 580
El Bayadh	920	78 000	6 810
Tebessa	810	61 000	18 000
Khenchela	750	122 000	58 900
Naâma	500	51 000	8 800
Tindouf	430	45 000	6 080
Laghouat	310	33 000	10 860
Batna	190	29 000	12 790
Djelfa	100	9 000	1 500
Total	163 910	18 203 000	7 893 580

1.7. La Datte

1.7.1. Définition

La datte est une baie, de forme généralement allongée, oblongue ou ovoïde. Elle est constituée de deux parties (Figure 1.3) :

- Une partie non comestible de la datte, formée par la graine ou le noyau, ayant une consistance dure.
- Une partie comestible, dite aussi chaire ou pulpe, comporte une enveloppe fine cellulosique, l'épicarpe. La graine est entourée par une zone interne de teinte plus claire et de texture fibreuse, l'endocarpe, réduite à une membrane parcheminée. Les deux sont séparés par le mésocarpe charnu

et fibreux dont la consistance varie selon les variétés, le climat ainsi que la période de maturation [19].

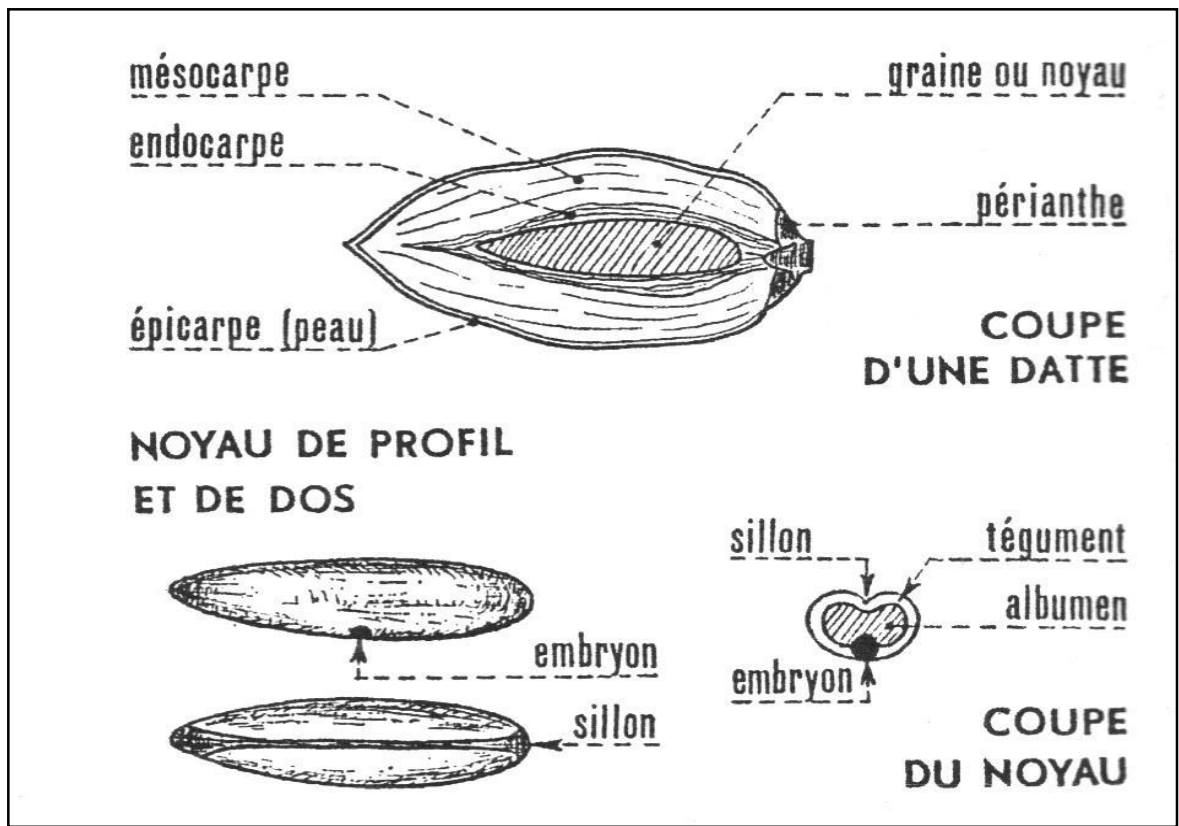


Figure 1.3 : Coupe schématique d'une datte [12].

La forme, la taille et la couleur des fruits varient selon la variété. Leurs dimensions sont très variables de 1,5 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 15 g. Leur couleur varie du blanc jaunâtre au sombre très foncé presque noir, en passant par les ambres, rouges et bruns [12].

1.7.2. Evolution physiologique de la datte

Depuis la pollinisation jusqu'à la maturation complète de la datte, on peut observer trois types d'évolution physiologique, qui sont [12]:

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

A partir de cette évolution et selon la classification Irakienne on peut classer physiologiquement toutes ces périodes en cinq stades [20].

- **Stade LOULOU ou HABABOUK :** C'est le stade qui suit immédiatement la pollinisation, il dure environ de 4 à 5 semaines. Il est appelé au Moyen orient. HABABOUK. Le fruit est de teinte blanche – jaunâtre, blanche – verdâtre ou jaune, puis elle vire au vert vif. D'un poids inférieur au gramme [12].
- **Stade KH'LAL ou KIMRI :** Le stade KH'LAL ou KIMRI au Moyen Orient est le stade le plus long, la croissance du fruit pendant cette phase est rapide. A la fin de ce stade, la datte atteint sa longueur et son poids maximaux (le poids de 5 à 12 g). Le fruit devient vert vif et de goût âpre [12].
- **Stade BSER ou KH'LAL:** Ce stade, appelé encore KH'LAL au Moyen Orient, se caractérise par une évolution lente du poids du fruit. La durée du stade BSER est environ 3 à 5 semaines, il est caractérisé aussi par l'accumulation de sucres, ce qui donne au fruit un goût sucré [21].
- **Stade MARTOUBA ou ROUTAB :** La couleur du fruit change du jaune ou du chrome vers le brun ou le marron, avec un aspect plus au moins translucide [19].
- **Stade T'MAR :** C'est le stade final de la maturation de la datte (maturation commerciale), au cours de quel le fruit perd une quantité importante d'eau [19] La couleur du fruit devient foncée chez les variétés molles et demi-molles par contre chez les variétés sèches, la couleur est claire et la pulpe est plus au moins sèche [21,22].

1.7.3. Composition chimique des dattes

Les fruits de dattes sont dotés de teneurs élevées en sucres (73-83%) [23]: glucose, fructose et saccharose [24]. Ils contiennent également des protéines, des lipides, des éléments minéraux et des vitamines [25].

La chair des dattes est composée essentiellement d'eau, des sucres réducteurs (glucose et fructose), des sucres non réducteurs (saccharose), et d'autres composants tels que les éléments minéraux, les vitamines, les enzymes, les pectines, les lipides et les protides (Figure 1.4).

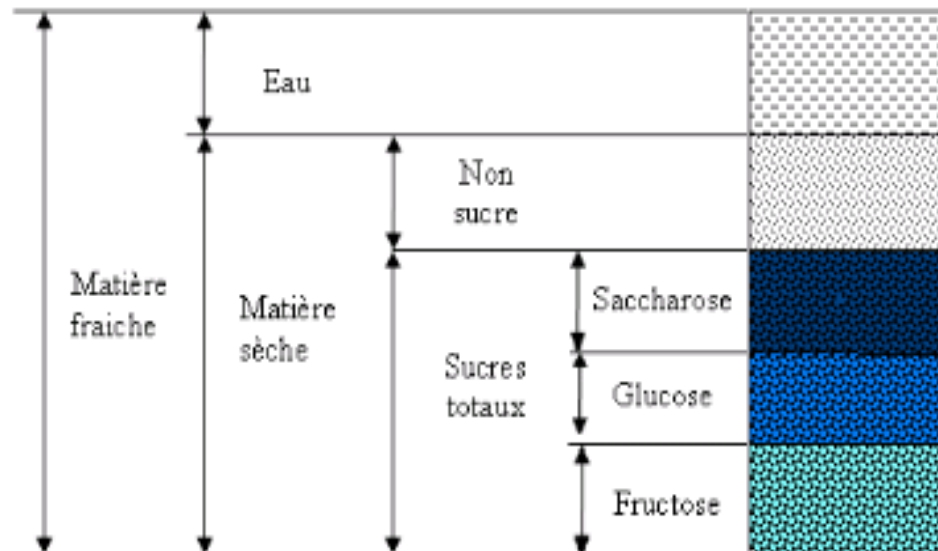


Figure 1.4: Composition biochimique globale de la datte [26]

1.7.3.1. La teneur en eau

L'eau est l'un des constituants essentiels du fruit. La teneur en eau détermine la consistance de la datte molle (30% d'eau), demi-molle (20-30% d'eau) et sèche (inférieur à 20% d'eau)], elle varie au cours des stades de développement de la datte et en fonction des variétés [27,28]. Elle a une importance fondamentale sur la stabilité microbienne et biochimique des aliments et agit sur leur conservation. La teneur en eau peut subir des variations très importantes sous l'action de différents traitements d'hydratation ou de séchage ou sous l'effet de l'absorption de l'humidité de l'air environnant.

1.7.3.2. La fraction glucidique

Les sucres représentent presque la totalité de la matière sèche soluble des dattes (presque 60 à 70% du poids total de la chair) ce qui leur confère une valeur énergétique importante (3 Kcal/Kg de pulpe). La datte contient trois sucres majeurs : le saccharose (non réducteur), le glucose et le fructose (sucres réducteurs), ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres tels que le galactose, le xylose et l'arabinose. La teneur en sucres totaux ainsi que la proportion de sucres réducteurs et de saccharose varient selon les variétés et les stades de maturation [28].

Il existe une relation étroite entre la nature des sucres et le pourcentage d'humidité des dattes. En effet, les dattes molles contiennent généralement des

taux de sucres réducteurs plus élevés que leur taux de saccharose. Le cas est inverse pour les dattes sèches [19]. Le rapport du taux de sucres totaux sur le taux d'humidité « r » dans les fruits a été défini comme indice de qualité pour la caractérisation des dattes. On distingue alors selon Munier [12] trois catégories des dattes :

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

1.7.3.3. Les pigments

Les substances colorantes des dattes, mal connues jusqu'à présent, sont variables selon les stades de maturation (couleur verte au stade *Kimri*, jaune tacheté en rose ou en rouge au stade *Khalal* et couleur brune au stade *Routab*) et les variétés. Les principaux pigments des dattes sont [19] :

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

Les membranes cellulaires des dattes sont constituées essentiellement de cellulose. Ce constituant, avec d'autres solides insolubles, représente environ 85% de la matière sèche de la datte verte. Mais, à mesure que la teneur en sucre augmente, le taux de cellulose diminue. La teneur en amidon varie selon le stade de développement et selon la variété, Bouabidi [29] et Dowson [19] avaient indiqué que les fruits, peu de temps après la pollinisation, présentaient une faible teneur en amidon qui disparaissait ensuite entièrement dans la plupart des cultivars à maturité. Cette réserve se transforme en sucres grâce à l'action des enzymes invertases.

Les pectines sont des polymères linéaires de l'aide galacturonique dont une partie des radicaux carboxyles est plus ou moins estérifiée par des radicaux méthyles. Selon leur degré d'estérification, on peut classer les pectines en pectines solubles et pectines insolubles qui sont graduellement converties en pectines solubles [29]. Dowson et Aten [19] affirment que les substances pectiques augmentent quantitativement dans les fruits jusqu'à la maturation et influencent les opérations de fabrication de sirop et de confiture de dattes.

La pulpe de datte contient des vitamines en quantité variable selon les types de dattes et leurs provenances. En général, elle contient des caroténoïdes, de la vitamine C et des vitamines du groupe B en quantité appréciable [12]. La pulpe des dattes contient une faible quantité de lipides. Elle est de l'ordre de 0,13 à 1,9% du poids total du fruit frais. Cette quantité de lipides est concentrée dans l'épicarpe de la datte, sous forme d'une couche de cires. L'évolution du taux de matière grasse dans les dattes débute par une accumulation aux premiers stades de développement suivie d'une diminution puis une stabilisation à la maturité ; à ce stade ultime de développement le pourcentage est faible [30].

Les composés aminés jouent un rôle essentiel dans les réactions de brunissement non enzymatiques (réaction de Maillard) qui interviennent lors de la conservation. Les cultivars ayant les teneurs les plus élevées en acides aminés sont soumis à un brunissement rapide lors du stockage [29]. Les teneurs des différents cultivars en acides aminés totaux sont très hétérogènes : 140,4 mg/100g MS pour la variété « *Choddak* » contre 507 mg/100g MS pour la variété « *Iemsi* » qui aurait une tendance à un brunissement rapide lors du stockage. Les teneurs en acides aminés de la « *Deglet-Nour* » et du « *Allig* » sont respectivement de 256 mg/100g MS et 204 mg/100g MS [28]. La composition en acides aminés de la pulpe de datte révèle la présence de 18 acides aminés [27].

Les enzymes jouent un rôle important dans les processus de conservation qui ont lieu pendant la formation et la maturation du fruit. La qualité des dattes, et en particulier sa qualité organoleptique (texture, goût et couleur), dépend en grande partie de leurs activités. Parmi ces enzymes, on peut citer l'invertase et les polyphénoloxydases. L'invertase est une enzyme responsable de l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose [30]. Son activité augmente au cours de la maturation. En effet, l'accumulation des sucres réducteurs est rapportée à l'accroissement de l'activité de cette enzyme. Une température élevée et une forte teneur en eau favorisent cette inversion [12]. Le polyphénoloxydase est une enzyme responsable du brunissement enzymatique des dattes.

Elle est détectée sous forme de traces avant le stade de maturation, son activité reste basse jusqu'au stade tamar où l'activité atteindra son maximum [30]

1.7.4. Les variétés de dattes

Les variétés de dattes sont très nombreuses, seulement quelques-unes ont une importance commerciale. Elles se différencient par la saveur, la consistance, la forme, la couleur, le poids et les dimensions [14,31].

En Algérie, il existe plus de 940 cultivars de dattes [32]. Les principales variétés cultivées sont:

- ***Deglet Nour*** : qui est la variété de premier choix, elle représente 47% de la production. C'est une datte excellente au goût exquis, très appréciée sur le marché national et international du fait de son aspect de sa saveur de son onctuosité.
- ***Les dattes communes*** : la production est estimée à 53% représentées par trois variétés : Ghars, Degla Beida et Mech Degla.
- ***Les variétés secondaires*** : elles comptent plus de 150 variétés dont la majorité est très peu appréciée. Les plus répandues sont : Hamraya, Tinnaceur, Tegaza, Tezerzait, et Takerbouchet (qui présente un intérêt par sa résistance au bayoudh) [33].

1.7.5. Valorisation des sous-produits de dattes

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

1.7.6. Valorisation technologique

1.7.6.1. La pâte de datte

Elle se prépare à partir de la pulpe de dattes molles et demi-molles. Une fois dénoyautées les dattes sont broyées et pétris jusqu'à obtention d'une pâte homogène. Cette dernière peut être enrichie en protéines et matières grasses afin de constituer un aliment équilibré pour les populations mal nourries. La pâte de datte, se prête bien au fourrage en couche épaisse entre deux biscuits. Elle peut être également utilisée dans la fabrication des confitures et des gelées [12].

1.7.6.2. La farine de datte

Après une légère torréfaction, les dattes sont séchées et broyées. On obtient ainsi une farine de couleur claire, d'odeur agréable, puisqu'elle est facile à transporter et à conserver. Elle est utilisée essentiellement en biscuiterie et en pâtisserie [12]. De même la poudre de noyaux de dattes est un excellent aliment pour le bétail.

1.7.6.3. Le sirop de dattes

Les dattes de qualité secondaire, trop molles ou écrasées, peuvent être utilisées pour la fabrication du sirop [34,35]. Les dattes découpées sont chauffées dans l'eau. On obtient un sirop riche qui peut être filtré et concentré sous vide jusqu'à obtention d'un produit à 65-70% de matière sèche.

Ce produit, bien que d'aspect sombre, est stable et est utilisé comme édulcorant dans de nombreuses préparations pâtisseries et peut également servir comme base à la production de boissons gazeuses [36].

1.7.6.4. Le jus de dattes

Le jus de dattes est connu depuis longtemps dans la plupart des pays producteurs de dattes. Ce jus est appelé « Roub » en Algérie et « Debs » en Irak. Seul l'Irak s'est orienté vers une production industrielle. Concernant la préparation de jus, les pulpes de datte sont finement hachées et une quantité d'eau est ajoutée [37], le mélange est ensuite incubé au bain-marie selon un couple temps-température donnée. Puis, on procède à une étape de filtration suivie d'une clarification pour éliminer les déchets et les solides insolubles.

D'après Episard [37], on peut obtenir après six à dix heures de diffusion, selon la variété, un jus titrant à environ 50% d'extrait sec soluble mesuré au réfractomètre. Le jus de datte peut être utilisé dans de nombreuses préparations alimentaires telles que les boissons gazeuses, le vinaigre, l'alcool, etc [38].

1.7.7. Valorisation biotechnologique

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

- Production de bio-polymères : Le jus de dattes (sous-produits), constitue un milieu favorable pour la production de bio-polymères, comme la gomme xanthane [39], le curdlan [40]. Le sirop des dattes est valorisé par production des caroténoïdes [41] et de PHB [42].
- Production d'acides organiques : Davati [43] et Tavakkoli [44], ont montré que le déchet des dattes constitue un bon milieu pour la production d'acide citrique (Tableau 1.3).
- Production d'antibiotiques : Des chercheurs ont réussi à produire des antibiotiques à partir des sous-produits de dattes. Abou-Zeid et al [25] ont produit d'oxytétracycline par *Streptomyces rimosus*. Ils ont trouvé que l'ajout de l'urée comme source d'azote et les cendres de noyau de dattes, comme source minérale permettent d'améliorer la production de l'antibiotique. En utilisant le sirop des dattes [45], ils ont produit de Bleomycine par *Streptomyces mobaraensis*.
- Production de biomasse : Les sous-produits de dattes peuvent servir comme substrat pour la production de levure boulangère [46].
- Production des enzymes : Des travaux ont été entrepris par des chercheurs qui ont montré qu'un substrat à base de sous-produits des dattes, constitue un milieu de culture favorable à la production des enzymes, comme le Pectinase [47], l'endopectinase [48] et l' α -amylase [49].

- Production de Biofuel : Différents types de biofuels ont été produits à partir des sous-produits de dattes, comme le dihydrogene [50], l'éthanol [51,49,52] et le butanol [53].

Tableau 1.3: Valorisation biotechnologique de sous-produit des dattes.

Produits	Substrat	Microorganismes	Références
Biopolymères			
La gomme xanthane	Jus de dattes	<i>Xanthomonas campestris</i>	Besbes et al., 2006
	Jus de dattes	<i>X. campestris</i> NRRL, B-1459	Salah et al., 2010
Poly- β -hydroxybutyrate	Sirop de Dattes	<i>Bacillus megaterium</i>	Omar et al., 2001
Curdlan	Jus de dattes	<i>Rhizobium radubacter</i> ATCC 6466	Salah et al, 2011
Carotenoide	Sirop de dattes	<i>Lactobacillus plantarum</i> QS3	Elsanhoty et al, 2012
Biofuel			
Hydrogen	Dattes pourries	<i>E. coli</i> EGY, <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824, <i>Rhodobacter capsulatus</i> DSMZ	Abd-Alla et al., 2011
Ethanol	Extrait de Datte	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 36858, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> STAR brand	Gupta and Kushwaha, (2011)
	Sous-produit de Dattes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SDB	Acourene et Amouche (2012)
	Sirop de dattes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Louhichi et al., 2013
Butanol	Sous-produit de dattes	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	Abd-Alla et El-Enany, (2012)
		<i>Bacillus subtilis</i> DSM 4451	Abd-Alla et El-Enany, (2012)
Biosurfactant	Sirop de dattes	<i>Bacillus subtilis</i> 20B	Al-Bahry et al., 2013
Acides organiques			
Acide citrique	Sous-produit de dattes	<i>Corynebacterium glutamicum</i> CECT 690 et CECT77	Davati et al., (2007)
	Sous-produit	<i>Corynebacterium</i>	Tavakkoli et al.,

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

1.8. Le Biocarburant et bioéthanol

1.8.1. Définition

Les biocarburants regroupent toutes les formes de carburants de substitution produits à partir de matériaux organiques non fossiles (biomasse) et renouvelables, comme le bois, les déchets et les alcools, qui sont brûlés pour fournir de l'énergie, les biocarburants comprennent aussi le biodiesel. Leur combustion ne produit que du CO₂ et de la vapeur d'eau et pas ou peu d'oxydes azotés et soufrés (NO_x, SO_x).

Les biocarburants peuvent être utilisés purs, ou en mélange avec des carburants fossiles (essence ou gazole). Dans le premier cas, les moteurs doivent être adaptés, comme cela a été le cas au Brésil, avec des automobiles fonctionnant uniquement avec de l'éthanol [54]. Dans le second cas, les biocarburants sont mélangés avec des carburants fossiles et ne nécessitent aucune adaptation des moteurs en dessous d'un certain seuil d'incorporation. Ils peuvent être alors distribués de façon banalisée. La directive européenne 98/70/CE sur la qualité des carburants autorise l'incorporation directe d'éthanol dans l'essence jusqu'à 5%, d'ETBE jusqu'à 15% et un maximum de 5% d'EMHV (ester méthylique d'huile végétale) dans le gazole [54].

1.8.2. Caractéristiques des biocarburants

Les principales caractéristiques des biocarburants comparées à celles des carburants d'origine fossile auxquels ils peuvent être associés, sont indiquées dans le tableau 1.4.

Tableau 1.4: Principales caractéristiques des biocarburants et comparaison avec celles de l'essence et du gazole [55]

Caractéristiques	Super-carburant	Méthanol	Ethanol	ETBE	Gazole	EMHC
Masse volumique (kg/m ³) à T=20°C	748 à 762	790	789	745	835 à 845	870 à 900
Température d'ébullition (°C)	30 à 190	64,7	78,3	72 ,8	180 à 360	-
Pression de vapeur Reid(a) (bar)	0,7 à 0,9	-	1,54	0,4	-	-
PCI massique (kJ/kg)	42836	19674	26807	36120	42335	37556
PCI volumique (kJ/L)	32020	-	21285	26910	35350	33200
Indice d'octane IOR (b)	95 à 98	122	120	118	-	-
Indice de cétane	-	-	-	-	49	49 à 54
Viscosité à 20°C (mm ² /s)	-	0,55	-	-	4,2	6,9 à 8,4

(a) La pression de vapeur Reid (PVR) est mesurée à une température de 37,8°C (100°F).

(b) Les indices d'octane et de cétane des composés oxygénés ne sont pas toujours établis avec une grande précision.

1.8.3. Le bioéthanol

Le bioéthanol est le produit de la fermentation alcoolique (ou éthanolique) des fruits, des céréales, des tubercules et des végétaux riches en sucres [56]. L'éthanol peut être produit par synthèse chimique à partir d'hydrocarbure, ou par fermentation à partir de biomasse. Seule cette deuxième façon de procéder mérite l'appellation « bioéthanol ». Sa production est plus respectueuse de l'environnement et sa combustion est « plus propre » que celle de l'essence ou du diesel. La biomasse végétale est une source d'énergie renouvelable qui consomme du CO₂ par photosynthèse. Son utilisation permet d'éviter l'émission de 50 à 80% de CO₂ selon les applications par rapport à l'équivalent d'origine fossile [57]. La production de bioéthanol dans le monde en 2003 était de 38 milliards de litres par an [58].

Le bioéthanol biocarburant existe depuis que l'automobile existe. Ainsi lorsque Henry Ford avait conçu son modèle T au début du XX^e siècle, il pensait que l'éthanol, produit à partir de matières biologiques renouvelables, serait la principale source d'énergie dans les transports. Après la première guerre mondiale et jusqu'en 1944, la consommation de bioéthanol comme carburant a été significative et comprise entre 1 million et 2 millions d'hectolitres par an, avec un pic à millions d'hectolitres en 1939 [54]. Aujourd'hui, les réserves de pétrole brut et les capacités de raffinage limitées, ainsi que l'inquiétude grandissante quant à la dégradation de l'environnement, offrent d'excellentes perspectives au bioéthanol. Il est probablement la source d'énergie alternative pour les véhicules les plus utilisés au monde [59], en raison notamment de la décision du Brésil de produire un combustible à base de canne à sucre, mais également par son utilisation en Amérique du Nord comme agent améliorant l'indice d'octane pour l'essence [60].

1.8.3.1. Avantages et inconvénients du bioéthanol

Les avantages et les inconvénients du bioéthanol peuvent être résumés dans le tableau (1.5). L'éthanol réduit les émissions de particules, notamment de particules fines qui constituent une menace pour la santé des enfants, des personnes âgées et des personnes atteintes de troubles respiratoires. Il est également utilisé à la place de benzène (produit toxique cancérigène, extrait de l'essence). L'éthanol est non toxique, soluble dans l'eau et rapidement biodégradable. La plupart des obstacles à l'incorporation du bioéthanol dans les carburants fossiles peuvent facilement être surmontés [61]. D'un point de vue écologique, le principal inconvénient des carburants additionnés de bioéthanol est la formation accrue d'acétaldéhyde.

L'acétaldéhyde est un composé très volatile (point d'ébullition = 21°C à pression atmosphérique), incolore et inflammable. Aucun effet sur la santé humaine, associé à l'inhalation ou à l'absorption de petites quantités d'acétaldéhyde, n'a été répertorié [60]. Il peut cependant contribuer à la formation de brouillard photochimique lorsqu'il réagit avec d'autres substances à base de carbone organique volatil présentes dans l'air. Toutefois, le *California Environmental Policy Committee*, dans une étude de décembre 1999 relative aux effets de l'éthanol sur la qualité de l'air, a observé que l'utilisation de l'éthanol entraînait une légère augmentation des taux d'acétaldéhyde et de nitrate de peroxyacétyle (PAN), mais que « la présence de ces composés était plus compensée par les réductions de formaldéhyde », un polluant atmosphérique toxique, beaucoup plus nocif que l'acétaldéhyde [60].

L'IARC (*International Agency for Research on Cancer*) a d'ailleurs classé le formaldéhyde comme substance cancérigène pour les humains en 2004. Lorsque la filière bioéthanol a été créée en 1992, les pétroliers français ont imposé la transformation de l'éthanol en ETBE (éthyl-tertio-butyl-éther obtenu par transformation de l'éthanol déshydraté par voie de réaction chimique avec l'isobutène), en avançant des arguments techniques dont la portée doit être relativisée et qui, en réalité, recouvrent les intérêts économiques de cette industrie. Ce «verrouillage pétrolier» est une des causes du moindre développement, en France, de la filière éthanol par rapport à la filière biodiesel (en 2003, 91 000 tonnes d'éthanol produits contre 310 000 tonnes de biodiesel)

Tableau 1.5: Avantages et inconvénients du bioéthanol [60].

Avantages	Inconvénients
Moins d'émissions de dioxyde de carbone (CO ₂) fossile que les carburants conventionnels	Son indice de cétane étant moins élevé que celui du diesel, le bioéthanol ne convient pas comme carburant propre pour les moteurs diesel conventionnels, à moins qu'un accélérateur d'ignition ne soit ajouté.
Haut indice d'octane, permettant un fonctionnement plus efficace des moteurs à allumage par étincelle	Emissions très élevées d'hydrocarbures par évaporation (environ 15% pour l'E10G), ce qui requiert un réglage de la pression de vapeur de l'essence de base à laquelle l'éthanol est ajouté.
Moins d'émissions de particules	La pression de vapeur étant basse et la chaleur latente d'évaporation de l'éthanol élevée, le démarrage peut être plus difficile dans les climats plus froids, à moins que l'éthanol ne soit mélangé à de l'essence ou qu'une autre aide au démarrage ne soit utilisée.
Moins d'émissions non réglementées de benzène et de butadiène 1-3 ; les taux de benzène diminuent à mesure que la concentration d'éthanol dans l'essence augmente.	Sa combustion entraîne une formation accrue d'acétaldéhyde, mais les émissions de formaldéhyde formique sont moindres par rapport à l'essence
Risque moins élevé de formation d'ozone que l'essence et le diesel	Sa capacité lubrifiante peu élevée peut provoquer une corrosion du moteur
Pas de teneur en soufre	Problèmes de stabilité de phase dans le mélange d'essence en cas de présence d'eau.
Biodégradable	La combustion de l'éthanol pur produit une flamme invisible qui peut provoquer des problèmes de sécurité.
Moins toxique que le biométhanol	Les véhicules E85G produisent des émissions non réglementées plus élevées (éthylène et acétaldéhyde) que les véhicules à essence.
Il a été démontré que les véhicules à un seul carburant et les véhicules tous carburants, à moteurs à démarrage par étincelle alimentés en bioéthanol, présentaient un rendement énergétique plus élevé que les moteurs à essence.	Lorsque l'éthanol non brûlé (E95D) réagit sur la surface du catalyseur, il peut s'échapper une odeur de vinaigre. Cette situation s'est améliorée avec la nouvelle génération de catalyseurs.
Rendement à indice d'octane élevé pour un coût relativement réduit.	

Le passage recommandé par l'ETBE pour l'incorporation d'éthanol dans les essences est justifié par deux arguments techniques :

- Le respect de la norme de volatilité des carburants. En effet, l'introduction directe d'éthanol conduit à un accroissement de l'élévation de la pression de vapeur, mesurée par un indice de volatilité exprimé en kilo-Pascal. Une pression de vapeur trop élevée induit des problèmes de démarrage à chaud, que redoutent les motoristes et entraîne un taux d'évaporation plus important. Celui-ci peut être à l'origine de l'émission de composés organiques volatils et d'oxyde d'azote, conduisant à la formation d'ozone. L'indice de volatilité, qui doit être respecté, varie en fonction des saisons (il est plus sévère pendant l'été) et du climat (la zone arctique, qui comprend les pays scandinaves et l'Ecosse, bénéficie d'un indice plus élevé. Au 1^{er} janvier 2000, la norme européenne a été abaissée de 70 KPa (qui restent applicable dans les pays arctiques) à 60 KPa, pour la période d'été. A noter que l'incorporation directe de 5% d'éthanol se traduirait par une augmentation de 7 KPa de la pression de vapeur, qui resterait dans les limites de la fourchette 60/70 KPa. L'ETBE permet d'abaisser la pression de vapeur à 45 KPa (donc, en dessous des normes).
- La coexistence de l'eau et de l'éthanol pur, qui pourrait conduire au phénomène dit de démixtion, c'est-à-dire à la séparation, en présence de faibles quantités d'eau, du mélange essence-éthanol. La conséquence de cette démixtion est la migration de l'éthanol vers l'eau, dont on ne peut exclure la présence en faible quantité dans le fond des cuves de distribution de carburants ou dans des réservoirs. Le mélange essence-éthanol se fait hors raffinerie car, pour les raisons évoquées, il ne peut être acheminé par pipeline et ne peut intervenir qu'au niveau du distributeur grossiste, soit au dernier stade, avant la vente à la pompe [54]. Si ces arguments méritent attention, leur portée doit néanmoins être relativisée. En effet, la réglementation européenne et française autorise l'incorporation directe d'éthanol, dans la limite d'un plafond de 5%, sous réserve bien entendu que les normes auxquelles doivent satisfaire les essences soient respectées et, notamment, la norme de volatilité.

Cette dernière peut parfaitement être respectée en mélangeant de l'éthanol, au taux de 5%, avec des lots d'essence à faible volatilité, dont certains volumes sont exportés par le raffinage français vers les Etats-Unis.

1.8.3.2. Fabrication du bioéthanol

1.8.3.2.1. Matière première

Tous les sucres fermentescibles (glucose, saccharose, etc.) peuvent être transformés en éthanol par fermentation. Ces sucres sont présents dans un état plus ou moins polymérisé dans de nombreuses espèces du monde végétal comme la betterave à sucre, la canne à sucre, le blé, le maïs, la pomme de terre, mais également dans l'herbe ou encore le bois. A titre d'exemple, si un hectare de canne à sucre produit environ 25 tonnes de sucre simples et 8 tonnes de mélasses, il produit également de 50 à 60 tonnes de biomasse non comestibles mais cependant potentiellement convertibles en éthanol [61].

Les ressources en bois des forêts norvégiennes, suédoises et finlandaises, qui pourraient servir à la production d'éthanol, sont immenses. Aujourd'hui, l'éthanol produit dans ces pays est considéré comme un sous-produit de l'industrie de transformation du bois. Ces chaînes de production combinée présentent de grands avantages économiques en ce qui concerne les coûts de production d'alcools. Dans ces trois pays, plusieurs études ont montré que les ressources de bois disponibles sont suffisamment importantes pour permettre la production d'un carburant entièrement à base d'alcool pour tout le secteur des transports, sans léser les autres utilisations de bois ou nuire aux équilibres écologiques. Certaines études confirment même que le prix des alcools carburants à base de bois peut rivaliser avec celui des combustibles fossiles, notamment si l'on ajoute à ce dernier les taux futures sur les émissions de CO₂ [59]. La matière lignocellulosique constitue une ressource abondante et bon marché, car elle ne peut pas être digérée par l'homme, et de ce fait, n'entre pas en compétition avec la nourriture. Cependant, son incapacité à être digérée rend également sa conversion en sucres fermentescibles difficile.

Les molécules de cellulose, constituant majoritairement des parois cellulaires de glucose (un monosaccharide à 6 atomes de carbone ou hexose), organisées en faisceaux cristallins. Ces molécules de cellulose sont reliées entre elles au moyen d'une autre molécule, l'hémicellulose, qui se présente quant à elle sous la forme d'une chaîne de sucres à 5 atomes de carbone ou pentose (principalement du xylose). Grâce à une réaction d'hydrolyse, la cellulose et l'hémicellulose peuvent libérer ces sucres simples (monosaccharides) qui sont ensuite convertis en éthanol par fermentation. La lignine, enfin, effectue la liaison entre les faisceaux de cellulose et confère à la plante sa structure particulière. Cette dernière n'est pas convertie en éthanol. Les proportions de chacun de ces constituants (voir tableau 1.6) peuvent varier de manière considérable selon le type de biomasse envisagé [61].

Tableau 1.6 : Proportion massique de lignine, hémicellulose et cellulose dans différents types de biomasse [61].

Biomasse	Cellulose (%)	Hémicellulose (%)	Lignine (%)
Herbe	30-50	15-40	05-20
Bagasse	40-55	25-40	05-25
Bois dur	40-50	20-30	15-30
Bois tendre	40-55	10-15	25-30
Résidus agricoles	30-40	10-40	10-30
Moyenne	40-60	20-40	10-25

1.8.3.2.2. Prétraitement

Les matières Sous-produit lignocellulosiques doivent subir un prétraitement pour être transformés 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 (H_2SO_4) dans une proportion de 0,5% à 1,5% par rapport à la matière sèche. Cet acide servira surtout pour catalyser cette réaction.

Cette technique est réalisée à des températures variant de 180 à 240°C pour une durée d'hydrolyse variant de quelques secondes à quelques minutes dans le cas de réacteurs « piston » [4]. Le rendement maximal est d'environ 50 à 60% [62]. Les hydrolysats produits en milieu acide dilué sont difficiles à fermenter, en raison de la présence en proportion importante de composés inhibiteurs : furfural, hydroxyméthylfurfural, acide acétique, etc. les conditions acides et les températures élevées conduisent généralement à la dégradation des sucres et la formation de nombreux composés inhibiteurs. Un autre inconvénient de ce procédé est lié aux réactions de réversion des sucres, se traduisant par une repolymérisation en oligosaccharides non fermentescibles. Enfin, ce type de procédé pose deux problèmes technologiques majeurs.

D'une part, l'utilisation d'acide sulfurique dilué à des températures de 180-240°C peut entraîner la corrosion des matériaux. D'autre part, le soutirage d'une matière lignocellulosique dans un réacteur continu sous pression n'est pas une opération aisée [60]. L'emploi de l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré a été étudié [64] avec une technique de recyclage des acides par des membranes. Mais la difficulté de mise en œuvre de cette technique a pénalisé fortement l'extrapolation à l'échelle industrielle. Les points forts de ce procédé sont : l'obtention de rendements 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, pour en faire une technique compétitive sur le plan économique. Par ailleurs, la mise en œuvre d'acide concentré pose le problème de la corrosion des matériaux, du contrôle strict des conditions opératoires les plus douces possible pour éviter la formation de produits de dégradation [4].

- Prétraitement biologique par hydrolyse enzymatique : L'hydrolyse enzymatique constitue une méthode spécifique, réalisée dans des conditions relativement douces de pH et de température, et permettant des rendements d'hydrolyse supérieurs à ceux obtenus à partir des procédés chimiques par hydrolyse à l'acide dilué (80 à 90%). L'hydrolyse enzymatique a fait l'objet pour cette raison de nombreux travaux de recherche ces 10 dernières années, dans le but d'optimiser la production d'enzymes et leur efficacité, mais aussi d'améliorer les étapes de prétraitement. L'objectif est avant tout d'améliorer sa rentabilité

économique, car elle constitue encore une méthode onéreuse, en raison notamment du coût élevé des enzymes et de la lenteur des réactions. Un substrat aussi complexe que la biomasse lignocellulosique ne peut être hydrolysé totalement par une seule enzyme.

Elle résulte de l'action synergique de trois types d'enzymes : les cellulases endo 1,4 β -glucanases et exo 1,4 β -glucanases, qui hydrolysent les celluloses en cellobiose, et les β -glucosidases qui hydrolysent les cellobioses en glucose [5]. Le système le plus étudié est celui de *Trichoderma reesei* qui contient deux exocellulases, CBH1 et CBH2 et au moins 4 endo-glucanases EG1, EG2, EG3 et EG5 [64].

1.8.3.2.3. Fermentation

L'étape qui suit le prétraitement est la fermentation proprement dite. Celle-ci est réalisée soit en batch soit en continu. En Amérique du nord où 11 milliards de litre d'éthanol ont été produits en 2003 [63], 38% l'ont été en mode batch. Ce mode de culture est plus facile à mettre en œuvre et à conduire, mais les productivités sont plus faibles que celles obtenues par un mode continu de culture. Les productivités en éthanol, obtenues en batch n'excédant pas les 2 à 3 g/L.h [65]. Le mode de culture en continu est un peu plus difficile à mettre en œuvre avec un risque accru de contamination bactérienne. Les productivités obtenues sont cependant beaucoup plus élevées. Bayrock et Ingledew [66] ont obtenu une productivité de 12,7 g/L.h en CSTR (Continuous Stirred Tank Reactors). Chang et al [68] avaient réussi à obtenir en CSTR avec extraction en continu de l'éthanol par un solvant une productivité de 20 g/L.h avec un titre en éthanol de 41,5 g/L. La productivité peut être augmentée en maintenant une forte concentration en biomasse dans le bioréacteur. C'est pour cette raison que de nombreux auteurs ont décidé de mettre en œuvre des bioréacteurs avec recyclage cellulaire (floculation, recyclage membranaire,...) dans lesquels il est possible de travailler avec des taux de dilution plus élevés que les vitesses spécifiques maximales de croissance des microorganismes sans que les réacteurs ne soient « lavés ».

Outre la productivité, le titre et le rendement en éthanol sont deux critères de performances importants dans la production de l'éthanol : un titre élevé en éthanol permet de réduire les coûts de purification, un rendement élevé permet de minimiser les pertes de matière première. Lors de culture en haute densité cellulaire (floculation) de *Zymomonas mobilis* et *Pichia stipitis*, Laplace et al [68] ont obtenu une productivité de 12,5 g/L.h, un taux de conversion du glucose de 90,5% par rapport au rendement théorique limite et un litre en éthanol de 76,6 g/L.

Lee et al [69] ont travaillé sur la production d'éthanol à partir de bois hydrolysé dans un bioréacteur à membrane. Les performances maximales obtenues étaient de 16,9 g/L.h pour la productivité avec titre en éthanol de 76,9 g/L et un rendement de 0,43 g d'éthanol par g se substrat. Des productivités plus élevées ont été obtenues par Groot et al [70] à l'échelle laboratoire avec un réacteur monoétagé avec recyclage membranaire de volume utile de 1,5 L. Ils ont mentionné une productivité de 55 g/L.h avec un titre en éthanol de 53 g/L et un substrat résiduel de 183 g/L. Escobar et al [71] ont mis en œuvre un bioréacteur à recyclage membranaire de 7000 L avec des résultats très encourageants (titre de 80 à 90 g/L et productivité de 3,4 g/L.h). Les autres ont eu toutefois, des problèmes de colmatage de la membrane lors de la conduite du procédé pour des concentrations en biomasse supérieures à 120 g/L.

1.8.4. Filières d'utilisation du bioéthanol

Après fermentation à l'aide de micro-organismes (levures, bactéries, etc.), l'éthanol est récupéré par distillation (éthanol hydraté à 96% vol), puis déshydraté (éthanol anhydre à 99,7% vol). Il existe différentes filières d'utilisation du bioéthanol. Il peut être par exemple transformé en ETBE par voie de réaction chimique avec l'isobutène ou en estérol après avoir été mélangé avec le biodiésel (tableau 1.7).

Tableau 1.7: Différentes filières d'utilisation du bioéthanol [61].

	Avantages	Inconvénients	Applications
Ethanol hydraté	Possibilité d'utiliser directement le bioéthanol hydraté avec un cout de production moins cher que l'éthanol anhydre.	- Les moteurs doivent être modifiés ou conçus à cet effet - Problème de fonctionnement à froid pour le moteur diesel (à cause du faible taux de cétane de l'éthanol) nécessité d'ajouter une bougie d'allumage ou un additif.	Voitures 100% éthanol au Brésil ainsi qu'en Suède avec plus de 400 bus développés par Scania (en circulation à ce jour) à partir de moteur diesel.
Ethanol anhydre en mélange avec l'essence	Mélange jusqu'à 15% sans nécessité de modification du moteur	- Cout plus élevés liés à la fabrication de l'éthanol - Augmentation de la pression de vapeur.	- Actuellement, la quasi-totalité des voitures vendues aux Etats-Unis, en Suisse ou en Suède ont une garantie des fabricants pour l'utilisation de l'éthanol jusqu'à hauteur de 10%. - Brésil : Utilisation d'un mélange à hauteur d'environ 24% dans les véhicules à essence, sans modification du moteur.
Ethanol anhydre en mélange avec le diesel	- Ethanol mélangé à hauteur de 3% sans modification du moteur ni additif - Ethanol mélangé à hauteur de 10-15% mais avec un solubilisant empêchant la démixtion.	Phase pilote, technique nouvelle.	-Mélange à 3% testé au Brésil - Mélange à 10-15% testé en Suède et au Danemark (autobus)
ETBE (éthyl-tertio-butyl-éther)	- Indice élevé d'octane - Faible pression de vapeur - Tolérance à l'eau	- La production d'ETBE nécessite des infrastructures et surtout une matière première (le naphtha) que seules les grandes raffineries pétrolières peuvent aujourd'hui s'offrir à un cout acceptable.	
Estérol (mélange bioéthanol et biodiesel)	Combine les avantages du bioéthanol et du biodiesel (moins d'émissions, réduction des gaz à effets de serre, meilleure densité énergétique que l'éthanol, prix compétitif, pas de modification du moteur)	Phase de test	En phase de test en Suède et aux USA.

1.9. La levure *Saccharomyces cerevisiae*

1.9.1. Taxonomie et morphologie

Les levures appartiennent au règne des champignons, à la division (embranchement) des *Ascomycota* (Ascomycètes), la sous-division des *Saccharomycotina*, la classe des saccharomycètes, l'ordre des *Saccharomycetales* et la famille des *Saccharomycetaceae*. Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, ayant une forme sphérique ou ovale, largement étudiées en biologie cellulaire et moléculaire. Leur état physiologique et leur morphologie peuvent varier selon les conditions de l'environnement. Lorsqu'elles se trouvent dans des conditions favorables de culture (Température, aération, pH, etc.) elles peuvent se diviser activement par bourgeonnement [72].

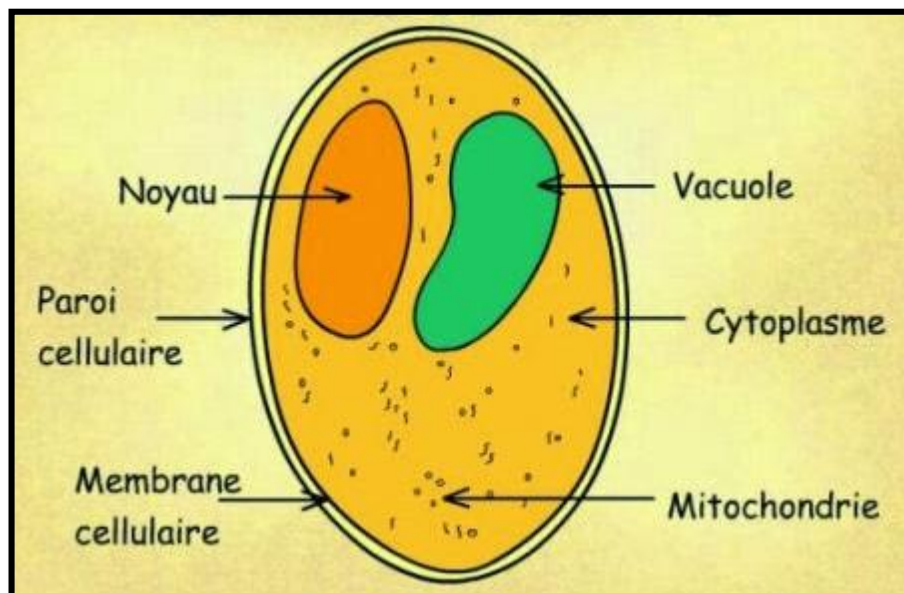


Figure 1.5 : Structure cellulaire des levures [73]

La taille d'une levure peut varier entre 1 et 9 μm en longueur et de 1 à 5 μm en largeur. Les levures sont utilisées pour la fabrication du pain depuis plus de 3000 ans. Mais ce n'est qu'entre 1857 et 1863 que Louis Pasteur démontre le rôle de la levure en tant que microorganisme responsable de la fermentation alcoolique (FA).

Cet organisme représente un système expérimental qui procure de nombreux avantages, entre autre la petite taille de son génome, ses hautes capacités de recombinaison alliées à un système génétique bien défini et la facilité à le manipuler en laboratoire. Ceci a permis à cette levure de devenir un des organismes modèles eucaryotes les mieux connus et les plus étudiés.

1.9.2. Reproduction des levures

Les levures se reproduisent selon deux modes en général :

1.9.2.1 La multiplication asexuée

Toujours présente, elle se fait essentiellement par bourgeonnement, aux extrémités des grands axes des cellules si elles sont ovoïdes ou allongées, (et rarement par scissiparité). Il peut aussi être multilatéral, ce qui est une caractéristique de *Saccharomyces* et *Debaryomyces* [74].

1.9.2.2 La reproduction sexuée

Dans un milieu défavorable (riche en acétate, pauvre en nutriments, températures extrêmes..), la cellule diploïde de levure va sporuler c'est à dire produire 4 ou 8 cellules haploïdes, nommées « ascospores » chez les Ascomycètes et « basidiospores » chez les Basidiomycètes, qui resteront en vie ralentie. Si les conditions du milieu redeviennent favorables, les spores sont libérées et vont germer, croître et commencer un nouveau cycle de multiplication végétative sous la forme haploïde ou diploïde [74].

1.9.3 Physiologie et métabolisme de la levure

La composition biochimique de *Saccharomyces cerevisiae* repose essentiellement sur les protéines, les lipides, les hydrates de carbone et les acides nucléiques [75]. *Saccharomyces cerevisiae* utilise plusieurs éléments, en faibles quantités, indispensables à son métabolisme tels que l'azote, le soufre, le phosphore, certains acides aminés, des vitamines et des oligo-éléments affectant ainsi les capacités fermentaires et la croissance de la levure [76-78].

Le phosphore : Il est assimilé préférentiellement en utilisant l'ortho phosphate sous forme d'ion monovalent. Il est impliqué dans le maintien de l'intégrité membranaire et la synthèse des lipides et des hydrates de carbone [79].

L'azote : Afin d'être assimilé par les levures, l'azote doit être présent dans le milieu de culture. Les ions ammonium, les acides aminés et certains peptides de faible poids moléculaire peuvent être incorporés dans la cellule de la levure et y être métabolisés. L'ion ammonium et le glutamate sont les composés azotés le plus facilement assimilables par la levure [79].

Le soufre : le soufre est assimilé généralement sous forme inorganique SO_4^{2-} [80]. Le comportement métabolique de la levure peut être purement oxydatif, fermentaire, ou oxydo-réductif. Il dépend de la nature de la source carbonée et les conditions de culture [80].

1.9.3.1. Métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif permet la multiplication par bourgeonnement, ce métabolisme est l'un des métabolismes les plus énergétiques, avec un rendement cellulaire important. Il se caractérise par une oxydation complète du glucose via les voies métaboliques de la glycolyse (Figure 1.6.A), du cycle de Krebs (Figure 1.6.B) et de la phosphorylation oxydative. Il nécessite la présence d'oxygène et des concentrations en limitation de substrat (150 mg/L environ) [81].

L'équation suivante présente le bilan énergétique théorique maximal de cette voie métabolique



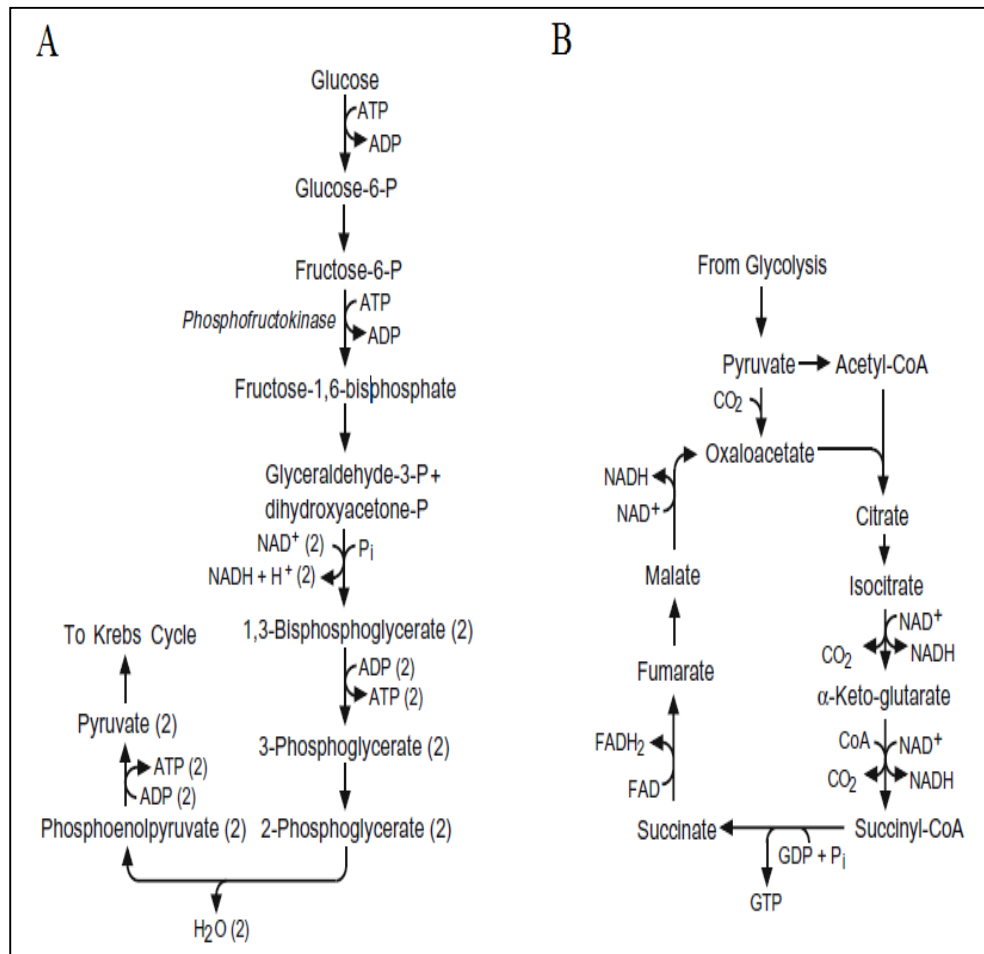


Figure 1.6: Schéma de la glycolyse (A) et du cycle de Krebs (B) [75].

1.9.3.2. Métabolisme fermentaire en anaérobiose

Ce métabolisme se caractérise généralement par un ensemble de réactions qui se produisent en absence d'oxygène comme accepteur final d'électron. Dans ces conditions, le pouvoir cellulaire à réoxyder les coenzymes réduits (NADH et FADH₂) est fortement diminué [75]. De plus, dans cette situation, la biochimie cellulaire est modifiée de telle sorte que le pyruvate est réduit en acétaldéhyde puis en éthanol (fermentation), dont la dernière étape nécessite la présence du NADH (Figure 1.7).

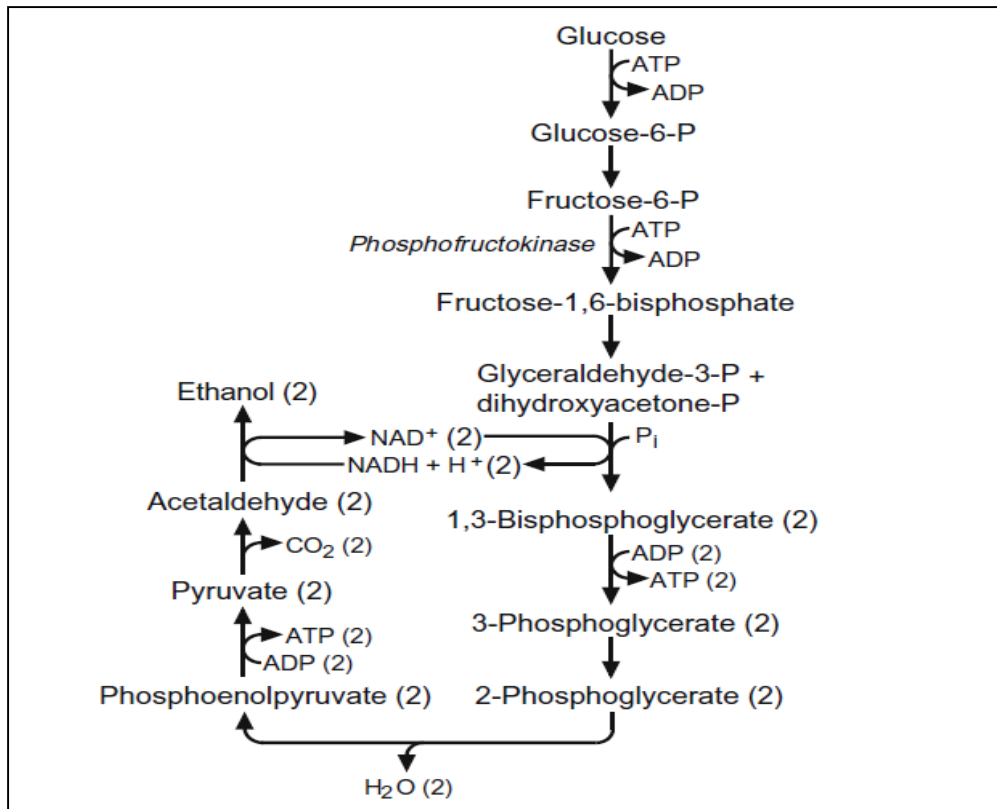
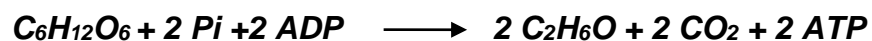


Figure 1.7: Utilisation du glucose par *S. cerevisiae* sous conditions anaérobies.

Le bilan énergétique de la transformation du glucose en éthanol s'écrit :



De plus, la formation de l'éthanol permet à la cellule de réoxyder le NADH qui a été produit durant la glycolyse. Cependant, en condition anaérobie, le cycle de Krebs n'est pas complètement fonctionnel, car l'activité de la succinate déshydrogénase nécessite la présence d'un coenzyme strictement respiratoire ; le FAD [82]. Par contre, certaines enzymes du cycle de Krebs restent toujours actives [83]. Cette portion active du cycle de Krebs (de l'oxaloacétate au succinate) génère le NADH qui sera réoxydé par la formation de glycérol à partir de la dihydroxyacétone. De plus, l'acide succinique est formé non par voie oxydative mais par la voie réductrice du cycle de Krebs en anaérobiose [83] :



1.9.3.3. Métabolisme oxydo-réductif ou Métabolisme Respiro-fermentaire

En présence d'oxygène, la levure *S. cerevisiae* a la particularité de présenter un métabolisme mixte : fermentation (production fermentaire d'éthanol) et respiration (production oxydative de biomasse). Cependant en aérobiose, le métabolisme de la levure *S. cerevisiae* est purement oxydatif lorsque l'apport en glucose est faible. Dans ces conditions, la biomasse et le CO₂ sont les seuls produits synthétisés par la levure ; le rendement en biomasse est alors maximum et égal à 0,5 g de biomasse par g de glucose [84-86].

Par contre le métabolisme cellulaire devient oxydo-réductif une fois que l'apport de glucose dépasse un certain seuil. Dans ce cas-là, les produits synthétisés sont la biomasse, le CO₂, le glycérol, l'acétate, l'éthanol. Le rendement en biomasse est fortement réduit. De plus, la NADH générée à partir de la glycolyse est ré-oxydée par la production d'éthanol (fermentation) plutôt que par les voies combinées au métabolisme oxydatif (glycolyse, cycle de krebs et phosphorylation oxydative) [75]. Cette bascule métabolique est appelée transition respiro-fermentaire ou effet Crabtree [87-89] qui est du point de vue œnologique très important car cet effet Crabtree permet de réaliser la fermentation en présence d'une faible concentration d'oxygène. Certaines levures sont fortement Crabtree positives et leur production d'éthanol dépend de la concentration en glucose ; chez certaines, comme *S. cerevisiae*, la synthèse d'éthanol débute au-delà de 2,5 g/L de glucose [90] tandis que chez d'autres, il faut 20 à 50 g/L de glucose [91]. Les levures Crabtree négatives sont les levures pour lesquelles la présence de glucose n'arrête pas la respiration. Le transport du glucose est l'un des facteurs qui distinguent les levures Crabtree positives et des Crabtree négatives [92]. En excès de glucose dans le milieu, le comportement des levures est différent :

- 1- Chez les levures Crabtree positives, le transport est facilité ce qui implique un afflux important de glucose ;
- 2- Les levures Crabtree négatives utilisent un symport-H⁺ pour réguler l'entrée du glucose [93].

1.9.4. Notion de stress chez les microorganismes

Les microorganismes, comme tous les êtres vivants, répondent naturellement aux variations des facteurs environnementaux en faisant face à ces conditions désavantageuses pour leur survie. Lorsque les conditions environnementales menacent la survie des microorganismes ou les empêchent de vivre dans des conditions optimales, les cellules sont qualifiées de « stressées » [94]. La notion de stress en biotechnologie est difficile à définir. Graumlich et Stevenson [95] définissent le stress comme une force ou une influence hostile qui tend à empêcher un système de fonctionner normalement.

Le déclenchement de mécanismes cellulaires complexes suite à un stress génère une réponse adaptative qui aboutit à un état de tolérance, et par conséquent à une survie dans des conditions qui sont normalement létales [96]. Ces variations peuvent être multiples et peuvent provoquer différentes « réponses dynamiques » à différents niveaux : macroscopique, microscopique et moléculaire chez le microorganisme, comme par exemple une modification du métabolisme cellulaire. D'autres réponses peuvent être mises en place : la modification de la capacité de croissance, de certaines fonctions physiologiques, de rendements et de productivités. Cependant, entre l'état non stressé et la mort, un certain nombre d'états physiologiques différents peuvent exister. Ces adaptations physiologiques mises en œuvre nécessitent un temps de réponse plus ou moins long qui dépend entre autre, de l'intensité et de la rapidité de la variation subie (conditions sub-létales). Le passage d'un état physiologique à un autre est conditionné par le degré de stress imposé par les conditions environnementales. Ce degré varie d'un individu à un autre [97]. Généralement, la réponse de la levure face à un stress est également mise en œuvre de façon dynamique avec une capacité ou non d'adaptation aux conditions environnementales en fonction du temps [98-101].

Lors de la présence d'éléments tels que l'éthanol ou le SO₂ dans le milieu de culture, la levure répond en essayant de prévenir la dénaturation de l'intégrité cellulaire et la perte d'activité, en réponse passive ou active. La réponse active est généralement considérée comme une modification métabolique consommant de l'énergie (modifications de la synthèse des molécules intracellulaires et/ou de la composition lipidique de la membrane plasmique, de la morphologie de la cellule

et de la composition intracellulaire). Par contre, la réponse passive dépend seulement de la vitesse de la perturbation physique entre le milieu intra et extracellulaire. Les réponses des levures aux perturbations peuvent engendrer des dommages irréversibles dans la cellule et même sa mort [102]. Dans le domaine de l'œnologie, un certain nombre de paramètres peuvent influencer le métabolisme et les capacités dynamiques des différents microorganismes du vin et spécifiquement la levure *S. cerevisiae*. Ces paramètres œnologiques peuvent influencer le comportement de *S. cerevisiae* en affectant ses capacités de croissance et de production [103-105]. Parmi ces paramètres, on note la concentration du glucose et de l'oxygène, la concentration d'éthanol et du CO₂, la biomasse et la température.

1.9.4.1. Effet du glucose et de l'oxygène

Différents effets caractérisent les comportements des levures vis-à-vis de la source de carbone et de l'oxygène : Effet Pasteur, effet Crabtree, effet Kluyver, effet Custer.

- **Effet pasteur** : cet effet correspond à une inhibition de la fermentation par la respiration et à la diminution de la vitesse spécifique de consommation de glucose en présence d'oxygène. L'Effet Pasteur est d'autant moins marqué que les levures sont sensibles au glucose par l'effet Crabtree ; Ainsi chez *Saccharomyces Cerevisiae*, l'effet Pasteur est quasiment inexistant [106]. L'Inhibition de la fermentation en aérobiose s'explique par la compétition des deux principales enzymes situées au niveau du nœud du pyruvate. La pyruvate décarboxylase qui dirige le pyruvate vers les voies fermentaires possède en effet une plus faible affinité pour son substrat que la pyruvate déshydrogénase qui elle, dirige le pyruvate vers les voies oxydatives. Ainsi pour de faibles concentrations intracellulaires en pyruvate le métabolisme oxydatif est favorisé par rapport au métabolisme réductif.
- **Effet Crabtree** : Deux définitions implicites sont données à l'effet Crabtree chez la Levure ; l'une phénoménologique, comme étant la production d'éthanol en aérobiose et l'autre mécanistique comme étant la répression de la respiration par la fermentation en condition de non-limitation en

oxygène [107]. Le niveau de sensibilité est variable suivant le type de levure considérée [88]. Ainsi *Saccharomyces cerevisiae* produit de l'éthanol au-delà de 1 g/L de glucose tandis que d'autres levures ne montrent pas de répression tant que la concentration en glucose ne dépasse pas 20 à 50 g/L [91]. Celles dont la respiration n'est pas inhibée par la présence du glucose sont dites Crabtree négatives.

- **Effet Kluyver** : Cet effet traduit la capacité de certaines levures à métaboliser certains disaccharides uniquement en aérobiose même si elles sont capables en anaérobiose de métaboliser les hexoses qui composent ces derniers. Ces disaccharides sont de plus totalement oxydés sans passage vers le métabolisme respiro-fermentaire même en condition de limitation d'oxygène [108].
- **Effet Custer** : L'Effet Custer est rencontré en particulier chez les levures du genre *Brettanomyces* qui fermentent le glucose plus rapidement en présence d'oxygène qu'en anaérobiose. Ce phénomène a été justifié [108] par le fait que la cellule peut augmenter son flux glycolytique en présence d'oxygène car elle peut réoxyder ses coenzymes réduits dans la chaîne respiratoire plus facilement.

1.9.4.2. Effet de l'éthanol

L'éthanol produit lors du métabolisme fermentaire ou oxydo-réductif est toxique pour la levure. La concentration maximale d'éthanol obtenue dépend du seuil de tolérance de la souche utilisée. Les mécanismes d'inhibition par l'éthanol ont été étudiés. Certains auteurs pensent que l'éthanol agit sur divers systèmes enzymatiques : inhibition de l'exokinase du pyruvate décarboxylase [109] et de l'alcool déshydrogénase. D'autres auteurs pensent que l'éthanol exercerait son effet inhibiteur en modifiant la structure de la membrane cytoplasmique et en augmentant sa perméabilité aux petites molécules et aux ions avec un effet de déséquilibre de charges transmembranaires qui perturberait le transport de certains composés cellulaires comme les sucres [110].

La levure peut augmenter sa tolérance à l'éthanol par une modification de la structure et de la composition de sa membrane [111]. Alfenore et al [112] ont montré que la tolérance de la levure à l'éthanol pouvait être améliorée par un apport contrôlé de vitamines.

1.9.4.3. Effet du CO₂

Le CO₂ est l'un des produits majeurs de la fermentation alcoolique puisque la formation de chaque mole d'éthanol est couplée à la formation d'une mole de CO₂. Le CO₂ est à la fois activateur et inhibiteur du métabolisme des levures.

Il existe des voies anaplastiques à faible concentration. Jones et Greenfield [113] ont montré que le rendement de conversion du substrat augmentait de 25% lors d'une croissance en aérobie sur glucose sous une pression partielle de 0,2 bar. Jones et Greenfield [113] ont montré que le taux de croissance maximal de *Saccharomyces cerevisiae* diminuait d'une pression de 0,5 bar et qu'une inhibition complète de la croissance était observée à 2,7 bar. Saez [114] a montré par contre que la croissance des levures s'arrêtait sur un moût de bière à 2,5 bars. Plusieurs explications ont été avancées pour expliquer cette inhibition. Plusieurs auteurs [115] ont envisagé que cela serait dû à l'effet exercé par le CO₂ sur la membrane plasmique. En effet, le coefficient de diffusion du CO₂ dissous à travers la membrane est élevé : 0,3 à 0,6 cm²/sec [116].

1.9.4.4. Effet de la Biomasse

De nombreux auteurs ont constaté un effet inhibiteur de la concentration en biomasse sur les cinétiques de croissance de la levure fonction de la cellule accumulée [117]. En fait, cet effet engloberait les problèmes de partage de substrats, la production de cométabolites toxiques liés à la synthèse cellulaire et l'encombrement dans le réacteur [118]. L'effet de la biomasse sur le taux de croissance peut être expliqué par une chute de la viabilité.

1.9.4.5. Effet de la température

La température agit sur les vitesses de croissance et de métabolites. Son choix est un point fondamental dans la conduite d'une fermentation. Aldiguier et al [119] ont réalisé plusieurs cultures de *Sacharomyces cerevisiae* en mode fed-batch, en condition de température contrôlée variant de 27°C à 39°C.

Le taux de croissance maximal à été obtenu à une température de 30°C alors que la vitesse spécifique de production d'éthanol maximale à été obtenue à une température de 33°C. Une température supérieure à 30°C accroît la vitesse de production d'éthanol mais augmente la sensibilité des levures à l'éthanol et diminue la viabilité.

1.9.4.6. Besoins nutritifs

Les besoins nutritifs élémentaires de la levure comprennent une source de carbone, une source d'azote, de soufre, de phosphore, différents sels minéraux et des facteurs de croissance. Les oligoéléments sont essentiels, tant sur le plan structural que catalytique. Ainsi le cuivre et le fer entrent dans la composition des cytochromes de la chaîne respiratoire. Le magnésium agit en tant qu'activateur de certains enzymes (phosphatidyl transférase et décarboxylase). L'ion potassium est indispensable à la croissance et l'ion calcium stimule la respiration et la multiplication cellulaire [118]. Les vitamines interviennent dans de nombreuses voies métaboliques en tant que précurseurs ou cofacteurs enzymatiques. Il est possible d'augmenter la tolérance à l'éthanol de *Saccharomyces cerevisiae* en utilisant une stratégie spécifique basée sur un apport séquence en vitamines [120]. Toutefois, les travaux de Winter [79] ont montré que la levure n'était plus capable d'assimiler la biotine pour une concentration en éthanol supérieure à 80 g/L.

1.10. Plans d'expériences

1.10.1. Définition d'un plan d'expérience

Le plan d'expérience est une technique qui permet de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse dans des domaines expérimentaux bien déterminés dans le but de les optimiser [120]. L'élaboration d'un plan d'expérience commence par l'extraction d'un nombre suffisant de combinaisons à partir du domaine d'étude, pour estimer avec une incertitude, à la fois minimale mais aussi homogène, les coefficients du modèle polynomiale en respectant les contraintes qui peuvent être liées à l'étude quel soit technique ou bien économique [121]. Deux familles de types de plans peuvent être distinguées. D'une part, les plans

“usuels” ont été conçus pour des applications sur des systèmes réels, pour lesquels les expériences peuvent être très coûteuses, longues et difficiles à mettre en place. D’autre part, les types plus spécifiquement utilisés pour des applications numériques, dont le but principal est de générer une distribution d’expériences remplissant de la meilleure façon le domaine expérimental [122].

1.10.2. Notion d’espace expérimental

Un expérimentateur qui lance une étude s’intéresse à une grandeur qu’il mesure à chaque essai. Cette grandeur s’appelle la **réponse**, c’est la grandeur d’intérêt. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs variables. Au lieu du terme « variable » on utilisera le mot **facteur**. La réponse dépend donc de un ou de plusieurs facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (Figure 1.8). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée **niveau**. Lorsqu’on étudie l’influence d’un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut. L’ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s’appelle le **domaine d’un facteur** [122].

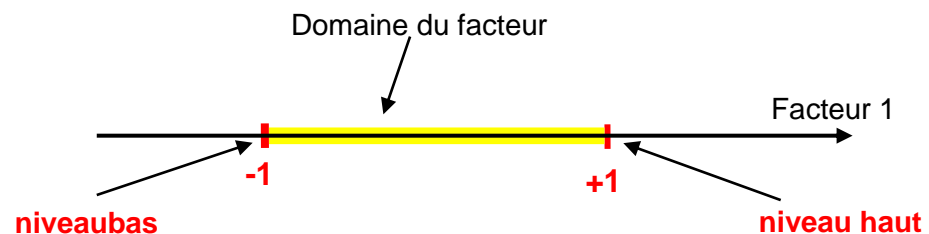


Figure 1.8 : Le niveau bas du facteur est noté par -1 et le niveau haut par +1.

Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut. Le regroupement des domaines des facteurs définit le **domaine d’étude**. Ce domaine d’étude est la zone de l’espace expérimental choisie par l’expérimentateur pour faire ses essais. Une étude, c’est-à-dire plusieurs expériences bien définies, est représentée par des points répartis dans le domaine d’étude (Figure 1.9).

Cette façon de représenter une expérimentation par des points dans un espace cartésien est une représentation géométrique de l'étude [122].

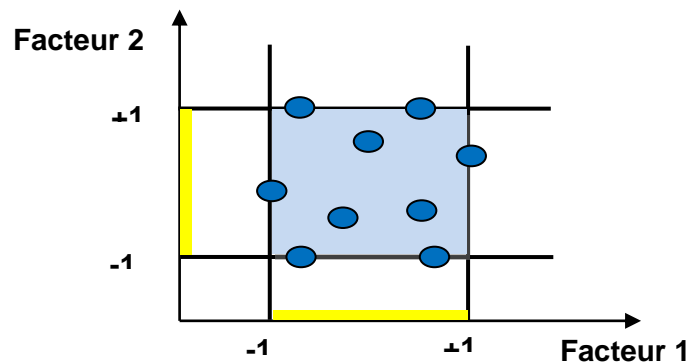


Figure 1.9: Les points expérimentaux sont disposés dans le domaine d'étude défini par l'expérimentateur.

1.10.3. Principaux avantages des plans d'expériences

Les principaux avantages de cette méthode sont :

- ✓ Diminution du nombre d'essais
- ✓ Possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs
- ✓ Détection des interactions entre facteurs
- ✓ Modélisation des réponses étudiées
- ✓ Une précision optimum des résultats

La méthode des plans d'expériences permet une interprétation rapide et sans équivoque en fournissant un modèle expérimental précis du système étudié.

1.10.4. Plan centré composite

Il est défini par une matrice composite centrée orthogonale, dans laquelle chaque ligne correspond à une expérience de ce plan. Une expérience est définie par la combinaison des niveaux des différents paramètres étudiés [122]. Les expériences relatives à une matrice composite se répartissent en trois sous-ensembles (Figure 1.10):

- Une matrice factorielle à 2 niveaux, dont les N_f expériences sont représentées par les sommets (♦) d'un cube (Figure 1.10).

- Une matrice en « étoile » dont les points représentatifs (●) des expériences sont sur les axes symétriquement par rapport à l'origine du domaine expérimental et à une distance égale à $\pm\alpha$.
- Une matrice formée des N_0 expérience (■) réalisées au centre du domaine expérimental.

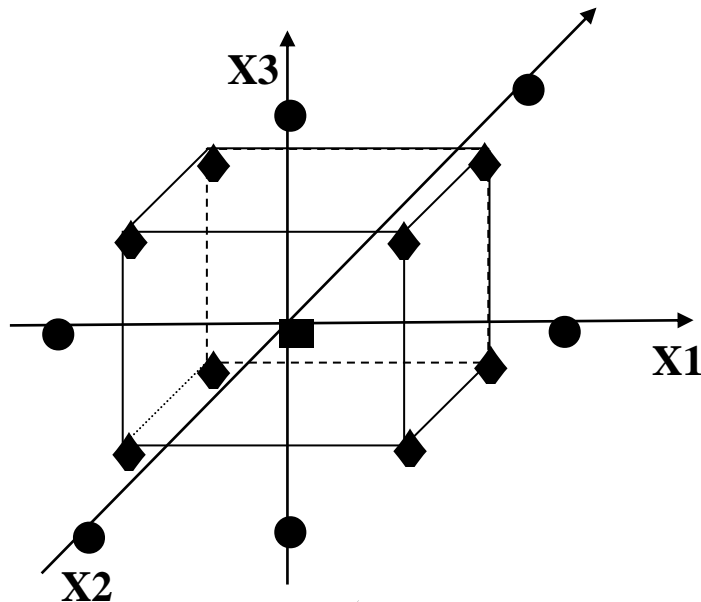


Figure 1.10 : Plan composite centré.

Les valeurs de α et de N_0 sont choisies de manière à conférer à la matrice des caractéristiques particulières telles que l'orthogonalité, l'iso-variance par rotation et la précision uniforme [123,124].

1.10.5. Modèle mathématique

Le choix de plan CCF permet la représentation des fonctions de réponse possédant des optimums. Par conséquent, le modèle suivant a été appliqué :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_{11}X_1^2 + \dots + a_{12}X_1X_2 + \dots + a_{123}X_1X_2X_3 + \dots \quad \text{(I)}$$

Avec:

Y: la valeur de la réponse calculée ; X_i : la valeur de la variable codée « i » et a_i : l'estimation ou rectangles. La validation du modèle postulé est assurée par une analyse classique de la variance.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2. Matériel

2.1. Zone d'étude

- La wilaya de Biskra est la première région phoenicicole avec 25,6% de la superficie totale, 23,1% du nombre total de palmiers dattiers, 37% de la production nationale de dattes. Elle est située dans le Nord-est de l'Algérie, elle a une superficie de 21671 Km². Elle est limitée au Nord, par la wilaya de Batna, au Sud, par les wilayas de Ouargla, d'El Oued et de Laghouat ; à l'Est, par la wilaya de Khenchela et de L'Ouest, par les wilayas de Djelfa et M'sila.

- La Wilaya d'El Oued est la deuxième région phoenicicole avec 22% de la superficie totale, 20,5% du nombre total de palmiers dattiers, 26,6% de la production nationale de dattes. Elle est située au Sud-est de l'Algérie, elle a une superficie de 44586.80 Km². Elle est limitée: au Nord, par la wilaya de Tébessa et Khenchela; au Nord-ouest, par la wilaya de Biskra; à l'Ouest, par la wilaya de Djelfa; au Sud-ouest, par la wilaya de Ouargla et à l'Est, par la Tunisie.

Ces deux wilayas totalisent à elles seules 62,6% de la production nationale des dattes [18].

- La wilaya de d'Ouargla est classée la troisième région phoenicicole avec 13% de la superficie totale, 13,8% du nombre total de palmiers dattiers, 14,3% de la production nationale de dattes. Elle est située dans la partie Sud du pays, elle a une superficie de 211980 Km². Elle est imité: au Nord, par les wilayas de Djelfa, Biskra et El Oued ; au Sud, par Illizi et Tamanrasset ; à l'Est, par la Tunisie ; à l'Ouest, par Ghardaïa.

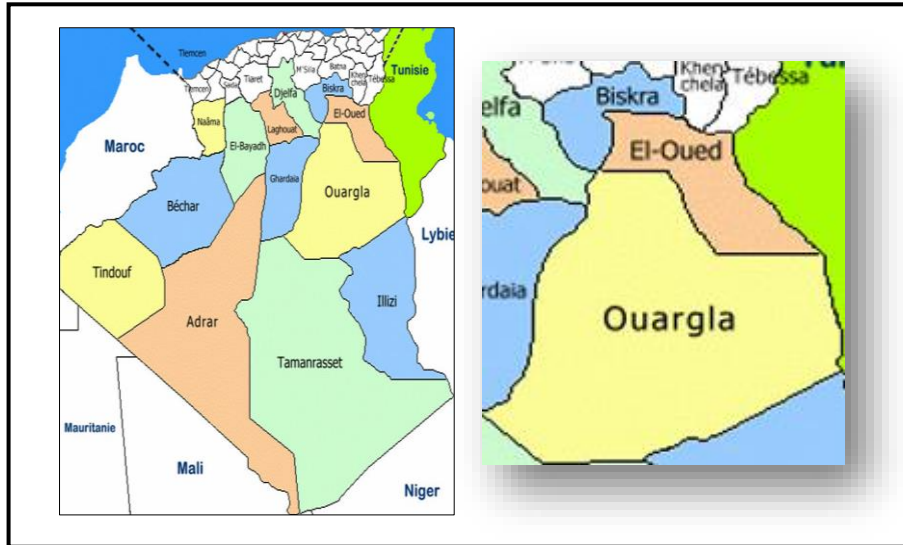


Figure 2.1: Situation géographique de la zone d'étude

2.2. Matériel végétal

Le matériel d'étude est constitué de six variétés de dattes communes et rebuts confondus récoltés à maturité à partir de palmiers dattiers (*Phoenix dactylifera*) dans les régions de Biskra, El oued et Ouargla, wilayas localisées au sud-est algérien durant la campagne phoenicicole 2011. Les dattes récoltées appartenaient aux variétés suivantes: Mech-Degla, Horra, Bamakhluf, Hamraya, kentichi et Degla-Beida, ont été conservées à 4°C (Figure 2.2).



Figure 2.2: Aspect des dattes cultivars "Mech-Degla, Horra, Bamakhluf, Hamraya, Kentichi et Degla-Beida"

Le choix se justifie par leur qualité gustative, leur abondance au niveau national et facilité de conservation (dattes sèches). Ces variétés sont classées comme sous-produits du palmier, à cause de leur faible valeur marchande. Elles sont destinées essentiellement à l'alimentation du bétail.

2.3. Matériel biologique

- Un total de 18 levures ont été isolées et identifiées à partir de déchets de dattes. Six souches de type *Sacharomyces cerevisiae* sont principalement employées pour l'inoculation des milieux de culture à une dose de 3×10^6 cellules/mL. Ces souches ont été dénommées, S1, S2, S3, S4, S5 et S6 seront issues respectivement d'isolats provenant de six moûts de dattes : Mech-Degla, Horra, Degla-Beida, Hamraya, Benmakhlouf et Kentichi.

- Une souche levurienne *Saccharomyces cerevisiae*S1 a été identifiée et sélectionnée comme la plus résistante aux stress environnementaux potentiellement agressifs [125], afin qu'elle soit exploitée dans la production du bioéthanol.

Les souches identifiées et purifiées sont conservées sur gélose *LB* inclinée à 4°C et pour permettre à la levure de garder leur vitalité, des repiquages sont effectués chaque mois.

2.4. Milieux et condition de culture

2.4.1. Milieux de culture

Les milieux qui ont été utilisés pour réaliser les différentes études sur ces souches de levures sont les suivants :

- Milieu de conservation LB (*Luria Bertani*), les souches bactériennes isolées ont été conservées à 4°C sur gélose (5 g/L Extrait de levure, 10 g/L Tryptone, 20 g/L D(+)-glucose, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar-agr).
- Milieu de Base ou d'enrichissement (4 g/L Extrait de levure, 5 g/L Peptone ; 25 g/L Glucose ; 0,55 g/L KH_2PO_4 , 0,42 g/L KCl , 0,12 g/L CaCl_2 ,0,0025 g/L FeCl_3 , 0,0025 g/L MgSO_4 , 50 mL Extrait de datte).

Le milieu préparé est conditionné dans des tubes à essais à raison de 9 mL par tube, ensuite autoclavé à 120°C pendant 20 min.

- Milieu de pré-culture *YEPD* (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) : Les souches, conservées à 4°C sur gélose *LB*, sont entretenues sur ce milieu (10 g/L Extrait de levure, 20 g/L peptone, 20 g/L Glucose). Afin d'éviter d'éventuelles par des bactéries, le milieu a été complété par 0,1 g/L de chloramphénicol. Ces milieux, avant utilisation, ont été stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 min.
- Milieu semi synthétique défini par Strehaiano (1984) utilisé pour faire des tests de résistance des levures à l'éthanol et des tests de chocs thermiques, dont la composition suivante: 50 g/L glucose extra pure, 5 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_5$; 1,0 g/L extrait de levure ; ethanol et NaCl. Différentes concentrations d'éthanol et de chlorure de sodium ont été ajoutées dans le milieu selon les besoins de la série d'expériences.
- Milieu de fermentation de type moût de dattes, il s'agit trois moûts de trois variétés de datte (Degla-Beida, Kentichi et Hamraya). L'enrichissement du milieu fermentescible par l'urée à raison de 2,4 g/L et par les cendres broyées en poudre très fin du noyau de Deglet-Nour aux taux de 0,01 g/L, 0,03 g/L, 0,06 g/L, 0,09 g/L, 1,13 g/L. Le pH du moût est ensuite ajusté à 4,5 par jus de citron.

Les sucres des moûts de dattes sont en mesure de couvrir ses besoins nutritionnels. Mais la concentration initiale en sucres fermentescibles est très importante car elle conditionne le taux d'alcool en fin de fermentation, Le moût de fermentation ne doit pas excéder une concentration en sucres supérieure à 200 g/L, pour cela le moût de datte est dilué 3 fois avec de l'eau stérile.

2.5. Méthodes

2.5.1. Isolement et purification de *Saccharomyces cerevisiae*

L'isolement est effectué à partir de l'extrait de 6 de variétés de rebuts de dattes, selon les étapes:

1) *Préparation de l'extrait de datte d'isolement*: Pour l'extrait de dattes N°1, on élimine des loges capillaires et des noyaux par: Lavage de la pulpe de la datte à l'eau froide; coupe des dattes en petits morceaux; ajout à 75 g de la pulpe 300 mL d'eau distillée; chauffage du milieu préparé à 65°C pendant 10 min dans un bain marie avec agitation; refroidissement du mélange obtenu sous un courant d'eau froide et enfin ajustement du pH (pH= 5). Pour l'extrait de dattes N°2, on élimine des loges capillaires et des noyaux par: Lavage de la pulpe de la datte à l'eau froide; coupe des dattes en petits morceaux; ajout à 62,5 g de la pulpe et 15,5 g saccharose dans 500 mL d'eau distillée. Chauffage du milieu préparé à 65°C pendant 10 min dans un bain marie avec agitation; refroidissement du mélange obtenu sous un courant d'eau froide et enfin ajustement du pH (pH = 5).

2) *Répartition d'extraits de dattes d'isolement*: L'extrait de dattes est réparti dans huit erlenmeyers: 1) : 50 mL extrait N°1; 2) : 50 mL extrait N°1; 3) : 25 mL de extrait N°1+25 mL solution de saccharose 6%; 4) : 50 mL extrait N°1 + 25 mL solution de saccharose 6%; 5) : 50 mL extrait N°1(chauffée 30 min à 70°C; 6) : 50 mL extrait N°2 (chauffée 30 min à 70°C); 7) : 50 mL extrait N°2; 8) : 50 mL extrait N°1(chauffée 30 min à 70°C); -Incubation les erlenmeyers à la température ambiante 30°C.

3) *Identification*:L'identification nécessite la réalisation des étapes suivantes:

- Préparation du milieu de base (milieu d'enrichissement);
- Le milieu préparé est conditionné dans des tubes à essais à raison de 9 mL par tube, ensuite autoclave à 120°C pendant 20 min;
- Les cinq tubes du milieu d'enrichissement sontensemencés par la culture positive puis, portés à l'incubation à 30°C, les observations de l'aspect des cultures se font après 48 heures d'incubation;

- Ensemencement en stries à la surface de la gélose Sabouraud chloramphénicol à l'aide d'une anse stérile trempée dans chacun des tubes positifs, ensuite incubation à 30°C pendant 48 heures.
- Transfert des colonies caractéristiques (blanchâtres non pigmentés) du milieu solide vers milieu liquide (milieu de base), ensuite incubation à 30°C pendant 48 heures.
- Après cette étape, la culture estensemencée sur le même milieu utilisé pour la croissance en milieu liquide, mais gélosé à 2 % qui est WLN modifié.

La préparation du milieu gélose WLN modifié :

- 100 mL milieu de base ;
- 22 mg vert de bromocrésolé ;
- 2 agar.

4) *Purification* : Cette opération se réalise selon les étapes:

- Transfert des colonies caractéristiques (vertes, lisses et bombées) du WLN vers des tubes contenant le milieu de base (d'enrichissement) ; ensuite, incubation à 30°C pendant 48 heures.
- La purification est effectuée par l'ensemencement en stries à la surface de la gélose Sabouraud chloramphénicol, incubation à 30°C pendant 48 heures.

Les boîtes de pétri montrant une croissance bactérienne comprise entre 30 et 300 colonies ont été utilisées pour dénombrer les microorganismes contenus dans les différents échantillons utilisés. Les colonies bien isolées, ont subi une coloration au bleu de méthylène, puis observées au microscope (l'objectif x40), pour vérifier la morphologie et l'homogénéité des cellules.

2.5.2. L'identification des levures par galerie AUXACOLOR

Pour la détermination de l'espèce, l'étude du profil de la fermentation des sucres sur une galerie *AUXACOLOR* (Bio-Rad, lot 1C0152, France) a été réalisée [126]. La galerie comprend : un témoin négatif pour faciliter la lecture des résultats d'assimilation. Et 13 tests d'assimilation comportant les sucres suivants : glucose (GLU) témoin positif, maltose (MAL), cellobiose (CEL), saccharose (SAC), trehalose (TRE), galactose (GAL), adonitol (ADO), lactose (LAC), melezitose (MEL), raffinose (RAF), xylose (XYL), inositol (INO), arabinose (ARA). Chaque

sucre est deshydraté en présence d'un milieu de base et d'un indicateur de pH : le pourpre de bromocrésol. La croissance d'une levure se traduit par le virage de l'indicateur du bleu au jaune et par l'apparition d'un trouble dans la cupule.

- 1 test enzymatique de détection de l'activité N-acétyl-galactosaminidase (hexosaminidase: HEX.). Une réaction positive se traduit par une coloration jaune de la cupule ; un test négatif reste incolore.
- 1 test phénoloxydase (POX.) permettant de détecter l'activité phénoloxidasique de *Cryptococcus neoformans* associé à un test de détection de l'activité proline-arylamidase (PRO.).

2.5.3. Conservation des souches pures obtenues

- Conservation à courte durée: Les souches pures ont été repiquées sur milieu (LB) solide et conservées à + 4°C. La composition de milieu LB (g/L) est : 10g de peptone, 5g d'extrait de levure et 10g de NaCl.

- Conservation à longue durée: A partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance, les souches sont conservées dans du bouillon *LB* en présence de 25% de glycérol à - 80°C.

2.6. Préparation et caractérisation de jus de dattes

La préparation de jus de dattes a été réalisée selon la méthode de trempage inspirée de la méthode décrite par Guigou et Perez [127], mettant en œuvre une température d'extraction de 65°C pour une durée totale d'extraction de 2 heures. Une fois les dattes lavées, dénoyautées et découpées, 3 litres d'eau distillée ont été ajoutés pour chaque kilogramme de dattes pesé. La concentration initiale en sucres fermentescibles est très importante car elle conditionne le taux d'alcool enfin de fermentation, Le moût de fermentation ne doit pas excéder une concentration en sucres supérieure à 300 g/L. Le mélange dattes-eau est maintenu, sous agitation continue, à la température de traitement à l'aide d'un bain-marie. Le moût de datte doit centrifuger à 5000 tours/min pendant 30 minutes afin de séparer les débris cellulosesques, alors que le surnageant est utilisé comme source de carbone pour la bio-production d'éthanol. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes afin de réduire la charge microbienne et

diminuer ainsi la compétition entre celle-ci et *Saccharomyces cerevisiae*, sans provoquer les dégradations thermiques des sucres (Figure 2.3).



Figure 2.3 : Extrait de trois variétés de rebut dattes utilisées pour la production du bioéthanol.

2.7. Préparation des cendres du noyau de datte de Deglet-Nour

La variété Deglet-Nour est dénoyauté manuellement et les noyaux macérés dans l'eau ordinaire pendant 24 heures, puis abondamment rincés afin d'éliminer le maximum d'impuretés et enfin séchés à l'air libre pendant quelques heures [128]. Les noyaux pulvérisés au moyen d'un broyeur ont donné un mélange homogène très fin, ensuite incinéré dans une atmosphère oxydante à une température de 900°C à l'aide d'un four à moufle de type (Nabertherm B180, Germany) jusqu'à combustion complète de la matière organique. Les cendres du noyau de la variété Deglet-Nour sont utilisées pour l'enrichissement du mout en minéraux.

2.8. Mise en évidence du pouvoir fermentaire des souches sélectionnées

2.8.1. Condition de culture des tests de résistance des levures à l'éthanol

2.8.1.1. Préparation de l'inoculum

La souche entretenue sur milieu gélosé incliné doit être réactivé sur milieu de pré-culture identique aux milieux de culture. A cet effet, nous prélevons à l'aide d'une anse stérile des colonies de la levure que nous ensemençons dans un

erlenmeyer de 25 mL contenant 15 mL de milieu *YPD* liquide (pré-culture) qui dure 35 heures à 30°C sous agitation (250 rpm).

Après incubation à 30°C, le contenu de chaque erlenmeyer est transféré dans un autre erlenmeyer bafflé de 250 mL contenant 135 mL de milieu semi-synthétique de Strehaino durant 35 heures à 30°C et sous agitation. Dans les mêmes conditions de multiplication que les différents milieux à étudier.

2.8.1.2 Culture en mode batch

La culture est conduite dans des erlenmeyers de 300 mL, plongées dans un Bain-marie afin de maintenir la température fixe. L'agitation est fixée à 250 tours/min. Les solutions ont été inoculées avec la pré-culture de la souche testée à une concentration de 3×10^6 cellules/mL puis scellés par des bouchons en silicone pour assurer l'anaérobiose [129]. L'échappement du CO₂ est rendu possible par l'installation d'une tuyauterie en plastique stérile, trempée dans de l'eau et traversant les bouchons. Puis le processus de multiplication des levures est déclenché. Pour suivre l'évolution de la biomasse microbienne, on procède à toutes les 2 heures à des prélèvements de 1 à 2 mL en vue de compter le nombre de cellules viables après une coloration au bleu de méthylène.

2.8.2. Condition de culture des tests de l'effet des paramètres cultureux sur la croissance des souches de levures isolées

2.8.2.1. Préparation de l'inoculum

Les expériences ont été réalisées à 30°C dans des Erlenmeyer de contenance 1L, de volume utile 800 mL. La préparation de l'inoculum se fait dans le même milieu (milieu de Strehaino), en 2 étapes: La première permet de stabiliser la souche vis-à-vis du milieu et la deuxième est utilisée pour ensemercer le milieu à étudier à 3×10^6 cellules/mL en fin de phase de croissance. La température d'incubation a été fixée à 30°C et l'agitation d'ordre 250 rpm.

2.8.1.2. Culture en mode batch

La culture est conduite dans des Erlenmeyers de 300 mL, plongées dans un Bain-marie afin de maintenir la température fixe. Les solutions ont été inoculées avec la pré-culture de la souche testée à une concentration de 3×10^6

cellules/mL puis scellés par des bouchons en silicone pour assurer l'anaérobiose. L'échappement du CO₂ est rendu possible par l'installation d'une tuyauterie en plastique stérile, trempée dans de l'eau et traversant les bouchons. Puis le processus de multiplication des levures est déclenché. Pour suivre l'évolution de la biomasse microbienne, on procède à toutes les 2 heures à des prélèvements de 1 à 2 mL en vue de compter le nombre de cellules viables après une coloration au bleu de méthylène.

2.8.3. Condition de culture des tests de production du bioéthanol

2.8.3.1. Préparation de l'inoculum

Les fermentations alcooliques menées par les différentes souches de levure *S. cerevisiae* se font en 3 étapes de 24 heures chacune (tubes, pré-culture et levain). La première étape consiste à réactiver les levures dans un milieu YEPD liquide. On obtient ainsi notre pré-levain. La deuxième étape consiste à transférer le contenu de chaque tube dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 45 mL de milieu YEPD. Cet erlenmeyer est incubé 24 heures à 30°C sous agitation. Après incubation, 15 mL sont transférés dans un autre erlenmeyer de 500 mL contenant 135 mL de milieu levain. Le levain est utilisé pour ensemercer le milieu d'étude à 3×10^6 cellules/mL au début de la fermentation alcoolique. Ces 3 étapes se font à une température d'incubation d'ordre 30°C et sous une vitesse d'agitation 250 rpm.

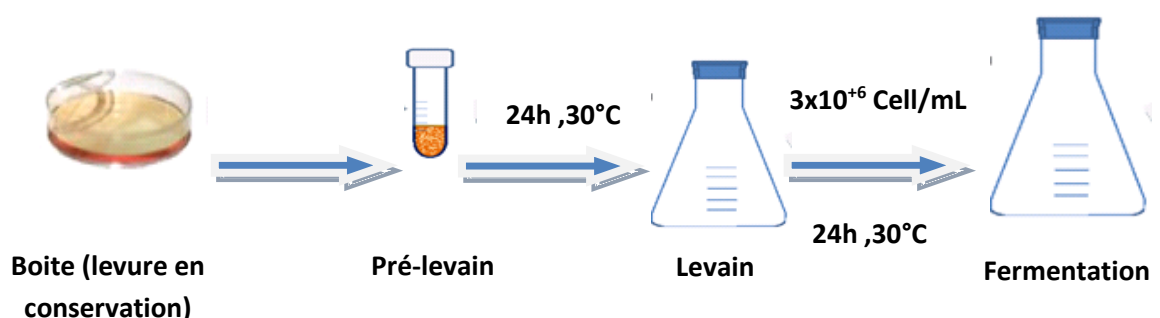


Figure 2.4 : Préparation de l'inoculum.

2.8.4. Culture en mode batch

La fermentation en batch (discontinue) est réalisée dans des erlenmeyers d'une capacité de 1L, contenant 300mL de milieu de culture, ces erlenmeyers sont

ensemencés stérilement par un volume bien déterminé de pré-culture (3×10^6 cellules/ml). Les erlenmeyers sont fermées par un bouchon d'ouate doublé de papier aluminium resserré après chaque prélèvement.

L'agitation est fixée à 250 rpm, La température est de 30°C et pH initial de moût et ajusté à 4,5 par jus de citron. La sortie de gaz est assurée par des tuyaux en caoutchouc dont le bout est trempé dans l'eau afin de visualiser le dégagement du CO₂. Six (06) lots de milieu à base de sirop de trois variétés de dattes étudiées, pour chaque type de milieu on a réalisé trois expériences pour assurer le suivi de la fermentation alcoolique jusqu'à consommation totale des sucres ou arrêt de consommation qui correspond en fait à la fin de la fermentation (54 lots en total). La croissance de la levure a été contrôlée en réalisant trois prélèvements par jour.

2.9. Technique et méthode analytique

Toutes les analyses ont été effectuées en trois (03) essais.

2.9.1. Caractérisation physique de la datte

Les caractéristiques morphologiques sont été effectuées sur 10 dattes prélevées au hasard sur lesquelles sont déterminées :

- 1- Les dimensions de la datte entière et de son noyau (longueur et largeur) au moyen d'un pied à coulisse.
- 2- Le poids de la datte entière, de sa pulpe et de son noyau au moyen d'une balance analytique à la précision de $\pm 0,0001$ de marque SCALTEC

2.9.2. Analyse physico-chimique de la datte et des moûts (jus de dattes)

2.9.2.1. Détermination de la teneur en eau (NF V 05-108, 1970)

○ **Principe**

La teneur en eau est déterminée dans une étuve à 105 °C par dessiccation de 10 g de dattes ou de jus durant 18 heures.

▪ **Mode opératoire**

- * Sécher des capsules vides à l'étuve durant 15 mn à 103 ± 2 °C ;
- * Tarer les capsules après refroidissement dans un dessiccateur ;

* Peser dans chaque capsule 5 g d'échantillon à une précision de $\pm 0,001$ g, et les placer dans l'étuve réglée à 103 ± 2 °C:

* Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans le dessiccateur, et après refroidissement, les peser. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (en réduisant la durée de séchage à 30 min). La teneur en eau est égale à la perte de masse subie dans les conditions de la mesure.

➤ **Expression des résultats**

$$H\% = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \dots\dots\dots 2.1$$

Soit :

H% : Teneur en eau ou humidité ;

M_i : Masse initiale « avant dessiccation » « Matière fraîche + capsule » ;

M_f : Masse finale « après dessiccation » « Matière sèche+ capsule » ;

La teneur en matière sèche est calculée selon la relation suivante :

$$\text{Matière sèche}\% = 100\% - \% \text{Humidité} \dots\dots\dots 2.2$$

- La détermination du pH, sucres réducteurs et sucres totaux ont été déterminés sur un extrait de datte. Les autres composants (protéines, cendres et éléments minéraux) ont été déterminés sur la pulpe de datte.

2.9.2.2. Détermination du pH (NF V 05-101, 1974)

○ **Principe**

La détermination du pH est essentielle pour le contrôle du goût, avant et au cours de l'évolution de biomasse. Sa variation, nous renseigne sur l'activité métabolique de la microflore.

▪ **Mode opératoire**

- Placer la datte ou/et les goûts de datte dans un bécher ;
- Procéder à la détermination du pH en prenant soins que l'électrode soit complètement immergée dans la solution.

La détermination du pH s'effectue dans nos conditions par une lecture directe à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné de type EUTECH INSTRUMENTS pH 510.

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

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique décrite par la norme française (NF V05-101 1974).

○ **Principe**

Le titrage de l'acidité se fait avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) de 0,1N en présence de quelques gouttes de phénolphaléine comme indicateur.

▪ **Mode opératoire**

Prélever 25 mL du jus de datte et les verser dans une fiole jaugée de 250 mL. Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée puis agiter (dilution).

Prélever un volume $V = 25$ mL de la solution préparée, puis ajouter 0,25 à 0,5 mL de phénophtaléine.

Doser cette solution à l'aide d'une solution de soude de concentration 0,1N et repérer le volume équivalent au moment du virage de l'indicateur coloré. (Coloration rose). L'acidité titrable, exprimée en milliéquivalent, pour 100g de dattes est obtenue en tenant compte de la dilution.

➤ **Expression des résultats**

$$[\text{Acide tartrique}] \text{ g/L} = \frac{250}{25} \times \frac{V_1}{10} \times \frac{10}{V_0} = 10 \times \frac{V_1}{V_0} \dots\dots\dots 2.3$$

Soit :

V_0 : le volume, en millilitre, de la prise d'essai

V_1 : volume, en millilitre, de la solution d'hydroxyde de sodium 0,1N utilisée.

Il est également possible d'exprimer conventionnellement l'acidité titrable en grammes d'acides pour 100g de dattes, en multipliant par le facteur correspondant à l'acide.

Tableau 2.1 : Facteurs de correction correspondant aux divers acides (NF V 05-101, 1974)

Nom de l'acide	Facteur de correction
Acide malique	0,067
Acide tartrique	0,045
Acide citrique monohydrate	0,070
Acide sulfurique	0,049
Acide acétique	0,060
Acide lactique	0,090

À titrer, 0,07505 est le facteur pour 0,1 N de NaOH, V_2 : volume de NaOH équivalent à 1,0 % de l'acide donné dans l'échantillon et M_m est la masse molaire de l'acide tartrique.

2.9.2.4. Détermination de la teneur en sucre totaux (Méthode du Dubois)

○ Principe

Les sucres totaux sont d'abord extraits avec de l'eau distillée. Ils forment une coloration jaune-rouge avec le phénol et l'acide sulfurique dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration des sucres [130].

▪ Mode opératoire

Cette méthode consiste à préparer une gamme étalon à partir d'une solution de glucose à 0,05%.

- Extraire les sucres de la datte suit : 10g de la matière fraîche dans 100mL d'eau distillé.
- Introduire dans des tubes à essais 2 mL de d'extrait de datte.
- Ajouter à la gamme étalon et les tubes à essais : 0,05 mL d'une solution de phénol à 80% et 3 mL d'acide sulfurique concentré.
- Agiter lentement et légèrement

- Laisser la réaction se faire pendant 10 min à une température de 25 à 30°C (apparition de la couleur jaune-rouge) puis stopper la réaction par un courant d'eau froide,
- La lecture de l'absorbance est faite à 490 nm.

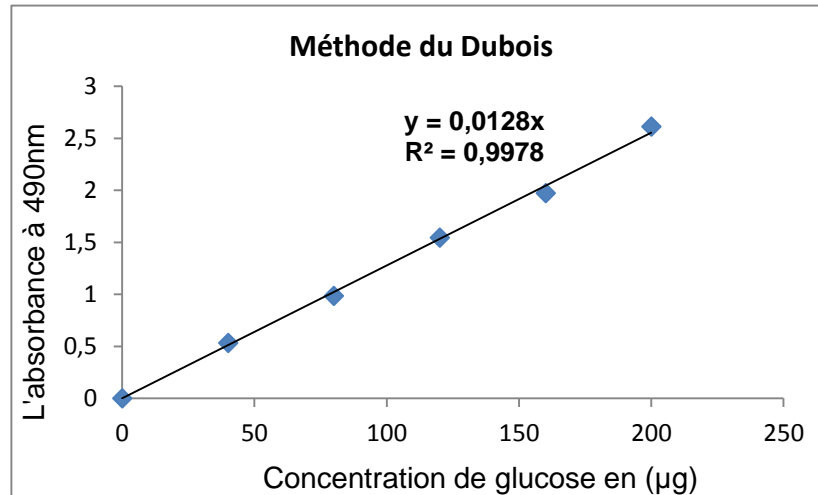


Figure 2.5 : Courbe étalon du glucose (Méthode du Dubois).

2.9.2.5. Détermination de la teneur en sucre réducteurs

○ Principe

Cette méthode basée sur la réduction de la liqueur de Fehling par les sucres réducteurs contenus dans l'échantillon [131].

Condition de dosage : L'échantillon doit être privé de toutes les autres matières réductrices ; et dilué d'une façon que la quantité des sucres soit inférieure à 5 g/L.

▪ Mode opératoire

Dans une première étape, étalonner la liqueur de Fehling à l'aide d'une solution de glucose à 5 %. Ensuite, par comparaison, on détermine la quantité des sucres contenue dans l'extrait de datte.

Etalonnage

- Introduire dans un erlenmeyer :
 - 10 mL de solution de Fehling A (voir dans l'annexe le mode de préparation) ;
 - 10 mL de solution de Fehling B. (voir dans l'annexe le mode de préparation) ;
 - 30 mL d'eau distillée ;

- Verser en très petites quantités, la solution de glucose à 5% contenu dans une burette graduée, jusqu'à la décoloration complète de la liqueur de Fehling et la formation d'un précipité Cu_2O rouge.

Dosage

- Remplacer la solution de glucose par l'extrait préparé et dilué;
- Introduire dans un erlenmeyer :
 - 10 mL de solution de Fehling A ;
 - 10 mL de la solution de Fehling B ;
 - 30 mL d'eau distillée ;
- Opérer comme précédemment.

➤ Expression des résultats

$$R = \frac{5 \times N}{N'} \times f \dots\dots\dots 2.4$$

Soit :

R : La quantité des sucres réducteurs en g/litres ;

N : Le nombre de mL de solution de glucose à 5 % utilisée ;

N' : Le nombre de mL de filtrat utilisé pour la décoloration de la liqueur de Fehling ;

f : Le facteur de dilution.

2.9.2.6. Détermination de la teneur en Saccharose

La teneur en saccharose est obtenue par la différence entre la teneur en sucres totaux et les sucres réducteurs présents dans l'échantillon [132].

$$\text{Saccharose} = (\text{Sucres totaux} - \text{Sucres réducteurs}) \times 0,95 \dots\dots\dots 2.5$$

2.9.2.7. Détermination de la teneur en cendres (NF V 05-113, 1972)

○ Principe

La teneur en cendres est déterminée par incinération d'un gramme de datte ou de jus dans un four à moufle à une température de 600 °C durant 3 heures.

▪ Mode opératoire

Peser 0,5 à 1g de matière sèche dans une capsule préalablement tarée ;
 Faire passer la capsule au four à température de 500°C pendant 5 heures ;
 Après refroidissement retirer la capsule ;

➤ **Expression des résultats**

$$MO (\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \dots\dots\dots 2.6$$

Soit :

MO% : teneur en matière organique ;

Mi : masse initiale « avant incinération » ;

Mf : masse finale « après incinération » ;

La teneur en cendre est égale à :

$$Cendre (\%) = [100\% - MO (\%)] \dots\dots\dots 2.7$$

2.9.2.8. Dosage des éléments minéraux

La détermination des éléments minéraux de moûts de dattes étudiées et les cendres du noyau de Deglet-Nour s'effectuent par l'analyse XRF (La spectroscopie par fluorescence X).

2.9.2.9. Détermination de la teneur en protéines (Méthode de Kjeldhal)

○ **Principe**

Le principe de la méthode est basé sur la transformation de l'azote organique en sulfate d'ammonium sous l'action de l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur et dosé après déplacement en milieu alcalin et distillation sous forme d'ammonium [131].

Réactifs

- Acide sulfurique pur ;
- Sulfate de cuivre et de potassium (comme catalyseurs) ;
- Acide borique à 4% ;

- Indicateur coloré (mélange de bleu méthylène et rouge méthylène) ;
 - Soude NaOH 4N ;
 - Acide sulfurique pour la titration à 0,05N.
- **Mode opératoire**
- Avant de procéder au dosage de l'azote total, l'échantillon doit subir une minéralisation. Pour cela, introduire dans un matras de minéralisation 0,2 g d'échantillon, ajoutez une pincée des catalyseurs (sulfate de cuivre et sulfate de potassium) ;
 - Ajouter 15 mL d'acide sulfurique pur ;
 - Nous utilisons un chauffage progressif ; d'abord une attaque au froid pendant 15mn jusqu'à l'apparition de vapeur blanche d'anhydride sulfurique ; puis le chauffage et rendu plus énergique (attaque à chaud) pendant 4 à 5 heures ;
 - Après décoloration complète, la solution est refroidie et complétée à 100 mL avec de l'eau distillée ;
 - La solution minéralisée, à laquelle nous ajoutons 20 mL de soude, est distillée ;
 - Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique contenant l'indicateur coloré. L'excès d'ammoniac est alors dosé par l'acide sulfurique 0,05N.

La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante :

$$N\% = \frac{\left(\frac{V}{V'}\right) \times (N - N') \times 0,05 \times 1,4}{P} \dots\dots\dots 2.8$$

Soit :

V : Le volume de la solution minéralisée (mL);

V' : Le volume de la solution de la soude ajoutée (mL);

N : La quantité d'acide sulfurique lue après titration (mL) avec l'acide sulfurique de normalité 0,05 N;

N' : Le volume de l'acide sulfurique dépensé dans le titrage du témoin (mL) ;

P : Poids de la prise d'échantillon 1 g.

2.9.3. Analyses microbiologiques

Nous effectuons la recherche et le dénombrement des levures et moisissures. Dans le cas des produits solides, comme dans notre cas (la pulpe de datte), on introduit aseptiquement 25 g de produit à analyser (broyat de dattes) dans un flacon stérile contenant au préalable 225 mL de dilution (homogénéiser manuellement). Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond donc à la dilution 1/10.

A partir des dilutions décimales 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} : a) Porter aseptiquement 1 mL dans trois boîtes vides préparées et numérotées à cet usage ; b) On ajoute environ 20 mL de gélose OGA fondu puis refroidi à 45°C ; c) Faire ensuite des mouvements paillasse ; d) L'incubation se fait à 25°C pendant 5 jours et la lecture doit se faire sous forme d'un suivi journalier, au bout du 5 jours.

2.9.4. Analyse de la biomasse

Le suivi de l'évolution de la biomasse a été étudié en milieu liquide par trois méthodes différentes. Ces méthodes apportent des informations complémentaires et leur combinaison augmente la fiabilité de nos résultats. Le suivi de la biomasse a été effectué tout au long des fermentations.

2.9.4.1. Spectrophotométrie (turbidimétrie)

L'évolution de la concentration cellulaire est mesurée par spectrophotométrie (modèle CHIMADZU UV-1700) à 620 nm [129], dans une cuve de 2 mm de trajet optique. Comme la densité optique évolue très vite, nous avons préféré diluer nos échantillons au 1/20 de façon à obtenir des densités optiques dans la zone linéaire du spectrophotomètre utilisé ($DO < 0,8$).

2.9.4.2. Méthode gravimétrique (poids sec)

La biomasse sèche, exprimé en g/L est déterminée par une méthode gravimétrique. Cette technique permet une estimation de la biomasse totale. Elle consiste à centrifuger un volume connu de suspension cellulaire, soit 100 mL de milieu de fermentation sont centrifugés à 3500 tours/minutes pendant 15 minutes, une centrifugeuse type Hettich universelle 2S.

Le culot est centrifugé à chaque lavage et le culot est pesé pour déterminer le poids de biomasse en matière fraîche puis séché dans une étuve Universelle,

UNE 400 type Memmert à 45 °C jusqu'au poids constant pour déterminer le poids de biomasse en matière sèche [132]. Cette méthode est utilisée en parallèle de la mesure turbidimétrique pour obtenir une corrélation DO/Concentration en biomasse (poids-sec) afin d'éviter le recours systématique à cette technique longue et peu précise dans les faibles valeurs de biomasse.

2.9.4.3. Numération cellulaire de la population totale

La biomasse peut également être quantifiée par comptage au microscope du nombre de microorganismes contenus dans un volume donné. Cette numération s'effectue à l'aide d'une cellule de Malassez sous microscope optique à l'objectif x40. La totalité de la cellule est composée de 100 rectangles d'un volume de 1 mm³, chacun d'eux est divisé en 20 petits carreaux. La figure 2.6 donne le schéma de la cellule de Malassez [133,134].

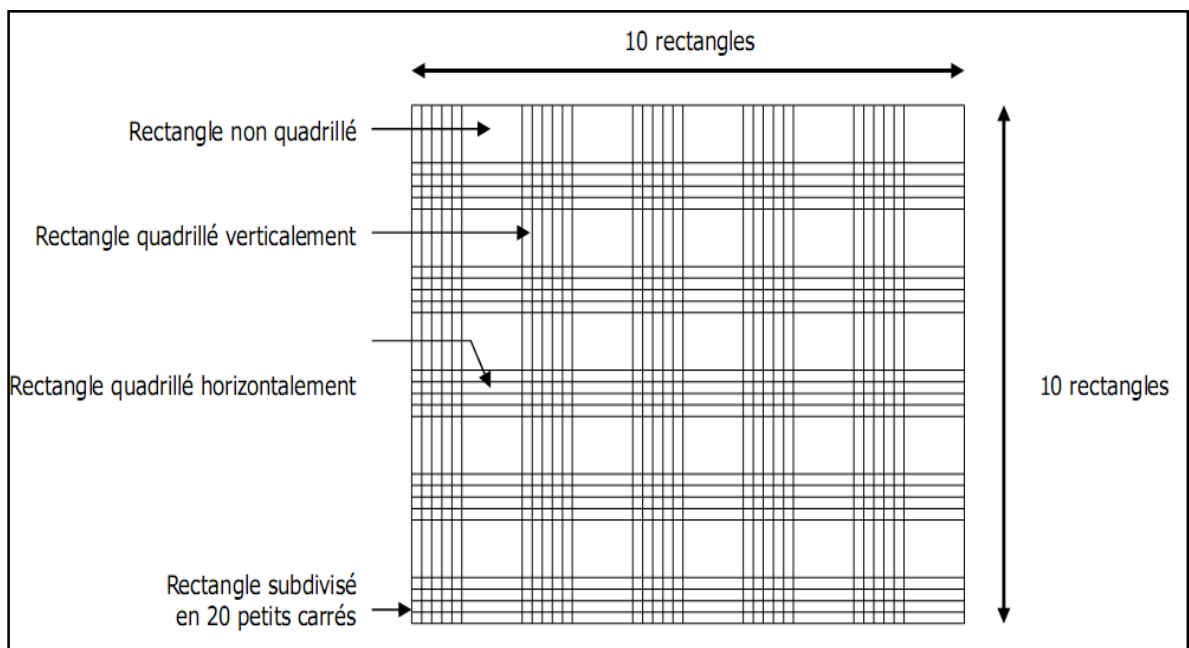


Figure 2.6 : La chambre de comptage de la cellule de Malassez.

Pour dénombrer les cellules, on place une lamelle de verre sur la cellule de Malassez, appelée lame de Malassez sur laquelle on dépose entre 10 et 15 µL de cellules en suspension. Après avoir attendu quelques minutes pour que les cellules sédimentent, on peut compter le nombre de cellules dans 10 rectangles (quadrillés).

Le volume d'un rectangle quadrillé étant de 0,01 µL, en comptant 10 rectangles, il suffit alors de multiplier le résultat par 10 000 pour obtenir le nombre

de cellules par mL. Par exemple, si 30 cellules sont observables sur 10 rectangles, on obtient un total de 300 000 cellules par mL.

2.9.4.4. Détermination du nombre de cellule et de la viabilité

Le principe de la réaction de marquage repose sur le fait que le Bleu de méthylène pénètre par diffusion dans toutes les cellules et est réduit en une forme non colorée dans le cytoplasme si les cellules sont actives. Les cellules actives apparaissent incolores tandis que les cellules mortes se colorent en bleu [133].

Le pourcentage de viabilité est calculé comme le rapport entre le nombre de cellules actives et le nombre total de cellules, en utilisant la formule suivante :

$$\mathbf{Viabilité\ (\%)} = \frac{\mathbf{Nombre\ de\ cellule\ actives}}{\mathbf{(Nombre\ de\ cellules\ actives+Nombre\ de\ cellules\ mortes)}} \dots\dots\dots 2.9$$

$$\mathbf{Nombre\ total\ de\ cellules/mL} = \frac{\mathbf{Nombre\ de\ cellules\ comptés}}{\mathbf{Nombre\ de\ carreaux\ comptés}} \times \mathbf{f} \times \mathbf{250\ 000} \dots\dots\dots 2.10$$

f : Le facteur de dilution.

La détermination de la concentration cellulaire (en nombre de cellules par millilitre) est réalisée par comptage sur la cellule de Malassez, après coloration au Bleu de méthylène. La chambre de comptage est couverte par une lamelle fixée et remplie par capillarité à l'aide d'une pipette pasteur. Le comptage est ensuite réalisé sous microscope à l'objectif x40, de façon à ne compter que les cellules contenues dans les 25 rectangles subdivisés en 20 petits carrés. Pour la détermination de la viabilité cellulaire, un volume de suspension cellulaire est mélangé à un volume de solution de bleu de méthylène. Après 5 minutes de réaction à température ambiante, le mélange est introduit dans la cellule de Malassez. Les cellules de levure sont alors comptées au microscope optique (grossissement 40x10).

Les levures se répartissent sur la lame de manière aléatoire. Les règles de comptage appliquées sont les suivantes: pour des cellules chevauchant les lignes de quadrillage, seules les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure et

la ligne verticale droite sont comptées. Lorsque les cellules sont bourgeonnantes, si la taille de la cellule fille est supérieure ou égale à la moitié de la taille de la cellule mère, la cellule fille compte comme une cellule. Le nombre de cellules doit être compris entre 150 et 300 pour que l'erreur effectuée sur le comptage soit inférieure à 10%.

2.9.4.5. Etalements sur milieu solide

On définit les cellules viables, comme les cellules capables de se dupliquer. Cette fraction de la population est déterminée par étalement sur milieu solide. Les dilutions sont réalisées avec de l'eau physiologique. Un échantillon est prélevé stérilement au cours de la fermentation et dilué successivement au dixième jusqu'à atteindre le niveau de dilution permettant d'obtenir au mieux une cellule par millilitre de suspension. 1 mL des deux décades précédentes ainsi que celle de cette dernière dilution sont alors étalés sur milieu gélose. Chaque dilution est étalée sur 3 boîtes différentes afin de faire la moyenne de résultats. Après 48 heures d'incubation à 30°C le nombre de colonies est compté sur chaque boîte et pour chaque dilution. Cette méthode permet de quantifier les cellules viables, capables de former colonies.

2.9.5. Etude des paramètres de fermentation

Pour un bon contrôle de la fermentation 3 paramètres ont été étudiés au cours de la fermentation l'analyse de la biomasse, l'analyse des sucres réducteurs et l'analyse de l'éthanol.

2.9.5.1. Dosage des sucres résiduels

Après centrifugation, on récupère 10 ml de moût, on ajoute 1 ml d'acétate basique de plomb à 10 %. On filtre sur filtre en l'aidant avec une trompe à vide, puis on ajoute entre 0,1 et 0,2 g de carbonate de calcium. On filtre une deuxième fois et on s'assure de l'absence définitive du plomb. On récupère 5 mL du filtrat à qui on ajoute 0,5 mL d'acide chlorhydrique concentré et on porte au bain marie à 70°C durant 30 minutes. Après refroidissement, on dose les sucres totaux résiduels par la méthode de Bertrand.

2.9.5.2. Analyse d'éthanol par CPG

Sept solutions contenant 0,5 mL de solutions de: 0, 1, 1.5, 2.3, 3, 3.5 et 4 g/L d'éthanol, 0,1 mL de dioxanne 1% et 0,5 mL de la solution saturée de $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ sont préparées et agitées au vortex [135]. 300 μL de la phase gazeuse sont ensuite placées dans le chromatographe. La vitesse de la phase mobile est réglée à une pression de 40 KPa. Ensuite une solution de 0,5 ml de l'échantillon mélangée à 0,1 mL de dioxanne et 0,5 mL de solution de sel saturée. La solution est alors mesurée. Le but du dioxanne est d'avoir une référence. Le rapport des aires entre celle de l'éthanol et celle du dioxanne nous permet de faire une droite d'étalonnage qui nous permettra de déterminer la concentration de l'éthanol dans cette dernière.

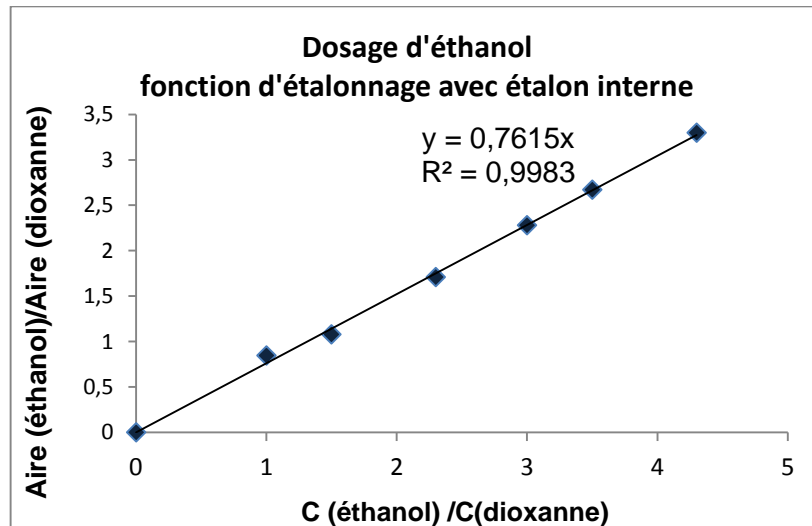


Figure 2.7 : Courbe d'étalonnage de dosage de l'éthanol avec étalon interne

2.9.6. Distillation fractionnée

Avant la distillation, une étape est essentielle, celle-ci est la filtration du mélange afin d'enlever la couche de levure présente au fond du contenant. La distillation consiste à séparer d'un mélange deux liquides volatiles qui sont complètement miscibles. En ce qui concerne l'éthanol et l'eau, le mélange ne devait pas être chauffé à plus de 90 °C, car l'eau a un point d'ébullition de 100°C et l'éthanol à un point d'ébullition de 78 °C (Handbook, 1991-1992).

La distillation s'est effectuée à plusieurs reprises, car à chaque fois, il y avait une petite quantité d'éthanol recueilli. Chaque distillation était d'une durée approximative de 120 minutes.

2.9.7. Vérification de la pureté

L'indice de réfraction est une bonne manière de vérifier la concentration d'alcool des échantillons recueillis. Le tableau 2 (Annexe) a été construit à partir des indices de réfraction à différents pourcentages d'éthanol afin de déterminer le pourcentage d'éthanol obtenu à la suite de la distillation.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Isolement et caractérisation de *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur moût de rebut de dattes: Etudes physiologique de l'adaptation et de la résistance à l'éthanol

3.1.1. Introduction

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a une place prédominante parmi les organismes de production industrielle grâce à sa tolérance aux pH bas, aux hautes concentrations d'éthanol et à sa capacité de croître en milieu anaérobie [136]. Dans le but de produire un bioéthanol à base de moût issu de déchets de datte on a besoin d'un microorganisme plus résistance à la concentration initiale en l'éthanol, et par la suite constituer une banque de souches performante à cette production. D'abord, Cette partie avait porté sur l'isolement et la caractérisation des levures de type *S. cerevisiae* à partir des dattes classées comme sous-produits du palmier. Ensuite, on applique une méthode de sélection de la souche la plus performante basée sur une étude physiologique de l'adaptation et de la résistance à l'éthanol en différentes concentrations (8 %, 10 %, 12 %, 14 %, 16 % et 18 %) v/v sur un milieu de culture semi-synthétique liquide et solide par voie anaérobie (fermentation).

3.1.2 Caractéristiques physiques et morphologiques des dattes

Le tableau (3.1) résume les caractéristiques physiques et morphologiques de six variétés de dattes étudiées. Les dattes choisies sont en majorité des variétés sèches de couleur marron (Mech-Degla, Horra, Degla-Beida, et Kentichi) par contre les variétés Hamraya et Benmakhoulouf ont une consistance demi-molle et une couleur noire pour la première et marron pour la deuxième.

Tableau 3.1 : Caractéristiques physiques et morphologiques des dattes

Paramètres	Kentichi	Horra	Degla-Beida	Hamraya	Mech-Degla	BamakhluF
Couleur	Marron	Marron	Jaune pale	Noir	Marron	Marron
Consistance	Sèche	Sèche	Sèche	Demi-molle	Sèche	Demi-molle
Poids de la datte (g)	07,27±0,55	02,63±0,60	05,25±0,46	11,24±1,94	07,55±0,80	10,16±1,54
Poids de la pulpe (g)	06,23±0,72	01,98±0,49	04,55±0,59	9,18±1,81	06,13±0,97	08,99±1,74
Poids du noyau (g)	00,79±0,20	00,65±0,11	00,98±0,08	01,17±0,13	01,41±0,28	01,17±0,11
Longueur de la datte (mm)	40,52±0,61	27,03±0,26	36,84±0,53	33,00±0,63	40,43±1,60	41,36±0,92
Largeur da la datte (mm)	18,76±0,69	13,31±0,95	15,64±1,33	22,21±0,76	16,43±2,85	21,41±2,68
Longueur du noyau (mm)	21,69±0,02	17,45±0,67	22,14±0,44	20,65±0,42	26,04±1,79	24,71±0,83
Largeur du noyau (mm)	07,80±0,43	06,65±0,41	08,02±0,22	08,67±0,32	09,04±0,61	07,89±0,15
Ratio longueur/largeur	0,86±0,88	2,03±0,27	2,35±0,39	1,48±0,83	2,46±0,56	1,93±0,34
Rapport noyau/datte (%)	10,87±0,36	24,71±0,18	18,67±0,17	10,41±0,07	18,68±0,35	11,52±0,07
Rapport pulpe/datte (%)	86,67±1,31	75,29±0,82	86,67±1,28	81,96±0,93	81,19±1,21	88,48±1,13

Le poids moyen de la datte entière pour les six variétés de dattes varie entre 2,63 et 11,24 g, tandis que celui de la pulpe entre 1,98 et 9,18 g, la longueur et la largeur moyenne varient respectivement entre 27,03 - 41,36 mm et 13,31 - 22,21 mm. Les poids de la datte entière et de la pulpe sont élevés pour la variété Hamraya ; le poids le plus faible est constaté dans le cas de Horra. La valeur maximale de la longueur, concerne la variété BamakhluF et la plus faible valeur revient aux dattes de la variété Horra. La largeur des dattes du cultivar Hamraya est élevée par rapport aux cinq autres variétés. Les poids, la largeur et la longueur du noyau de Mech-Degla sont nettement supérieurs à ceux des cultivars étudiés.

Le calcul de ratios pulpe/noyau, longueur /largeur a été effectué. Le rapport pulpe/noyau le plus élevé revient au cultivar Mech-Degla et le plus faible à Horra. Pour ce qui est du ratio longueur/largeur, la valeur maximale appartient aux dattes de la variété Mech-Degla et la minimale à Kentichi. Selon les critères de qualité des dattes, plus le rapport noyau/datte est faible, plus la qualité du fruit est élevée [137], il doit être compris entre 10 et 15 %. Ce rapport se situe entre 10,87 et 11,52 % pour les cultivars Kentichi, Hamraya et BamakhluF et entre 18,67 et 24,71 % pour Horra, Degla-Beida et Mech-Degla.

On conclut que les trois dernières variétés ne sont pas de bonne qualité. La détermination d'un autre rapport inversement corrélé au rapport cité précédemment permet également de caractériser les dattes. Il s'agit du rapport pulpe/datte. Etant donné que la meilleure datte est celle dont ce rapport est plus élevée. La valeur obtenue du rapport pulpe/datte de la variété Mech-degla 81,19% est différent de celle trouvés par Amillal-Chibane [138], cette dernière a signalé pour la même variété un rapport de 82,77 %. Par contre les variétés Bamakhluf, Degla-Beida et kentichi semblent les meilleures avec des rapports 88,48 %, 86,67 et 86,67 % respectivement.

La figure 3.1 illustre les pourcentages (en poids) de la pulpe et du noyau dans la datte entière pour chaque variété étudiée.

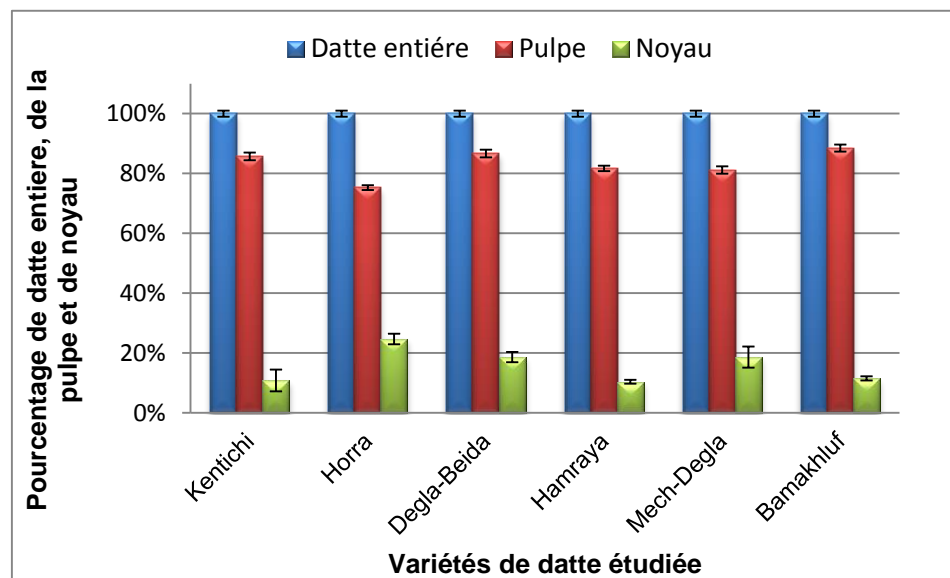


Figure 3.1 : Les pourcentages de la pulpe et du noyau dans la datte entière pour chaque variété étudiée.

3.1.3. Caractérisation physico-chimique de la pulpe et de la solution mère de moût des six variétés étudiées

Le tableau suivant regroupe les caractéristiques physiques de six cultivars étudiées :

Tableau 3.2 : Résultats des caractéristiques physico-chimiques de la pulpe et le moût de six variétés de rebut de datte.

Paramètres		Matière sèche (%)	Humidité (%)	pH	Cendres (%)	Sucres totaux (%)	Sucres réducteurs(%)	Saccharose (%)	Acidité titrable (%)	Protéines (%)
Kentichi	pulpe	82,27±0,24	14,81±1,24	5,95±0,01	1,99±0,33	72,35±0,23	21,63±0,31	47,78±0,25	0,29±0,10	2,51±0,35
	moût	11,28±0,56	88,72±0,02	5,06±0,03	1,17±0,01	29,93±1,23	15,63±0,34	22,39±0,45	0,68±0,74	0,24±0,16
Horra	pulpe	82,65±0,44	13,64±1,70	5,81±0,31	1,89±0,09	78,64±1,11	29,76±1,32	50,01±1,89	0,29±0,01	2,61±0,41
	moût	15,71±0,53	84,29±0,98	5,10±0,09	1,09±0,11	16,13±1,16	13,72±1,09	21,76±1,11	0,33±0,21	1,01±0,32
Degla- Beida	pulpe	81,64±0,14	14,55±1,54	5,4±0,45	2,18±0,17	74,00±1,31	48,86±0,14	10,24±1,07	0,24±0,06	2,25±0,09
	moût	16,67±0,91	83,33±0,43	5,32±0,74	0,96±0,21	20,53±0,86	16,5 1±0,07	2,54±1,76	0,21±0,11	1,44±0,21
Hamraya	pulpe	84,45±0,12	15,81±0,68	5,87±0,02	2,74±0,15	78,36±0,58	21,15±1,48	19,13±1,07	1,41±0,02	2,28±0,14
	moût	16,89±0,53	70,11±0,21	5,20±0,01	1,48±0,34	26,49±0,95	23,20±0,06	0,91±0,07	1,06±0,23	1,14±0,07
Mech-Degla	pulpe	83,02±0,18	15,00±1,17	5,74±0,35	2,01±0,17	73,41±0,97	20,15±1,09	51,75±0,56	0,23±0,04	2,48±0,11
	moût	11,6±1,25	74,4±0,14	5,14±0,42	1,29±0,09	15,64±0,74	20,80±0,19	41,65±1,05	0,67±0,14	1,09±0,31
Bamakhluf	pulpe	86,15±0,57	14,57±0,36	5,81±0,43	2,23±0,21	66,01±0,10	50,81±1,91	11,16±1,09	1,65±0,23	2,64±0,47
	moût	13,54±0,95	70,46±0,35	5,17±0,75	1,32±0,17	23,8±0,19	23,51±1,05	0,14±0,06	0,22±0,31	0,82±0,16

Les analyses physico-chimiques sont effectuées sur la pulpe des dattes Hamraya, Bamakhluf, Degla-Beida, Mech-degla, Kentichi et Horra. Les résultats obtenus (Tableau 3.2), montrent que les teneurs en matière sèche des dattes utilisées dans notre étude sont plus ou moins proche les unes des autres. 86,15 % pour Bamakhluf, 84,45 % pour Hamraya et entre 81,64 et 83,02 % pour les quatre autres cultivars. Concernant la teneur en matière sèche de moût des dattes étudiées, les moûts de Hamraya et de Degla-Beida présentent les teneurs les plus élevées de 16,89 % et 16,67 %, alors que Horra et Bamakhluf ont respectivement 15,71 % et 13,54 %, la teneur la plus faible enregistrée est de 11,28 %, celle de moût de Kentichi. D'une manière générale les taux de matière sèche dans les différents moûts de datte étudiés sont très importants.

La teneur en eau des dattes utilisées dans notre expérience est comprise entre 8,08 % et 15,80 %. D'après ces résultats, les dattes étudiées sont des variétés sèches car elles présentent des teneurs en eau < 26 % [139]. Cette faible teneur en eau permet une bonne conservation du produit pendant une longue période de stockage à la température ambiante.

Le pH est un autre paramètre déterminant l'aptitude à la conservation des aliments. Il constitue l'un des principaux obstacles que la flore microbienne doit franchir pour assurer sa prolifération [140]. Ainsi, un pH de l'ordre de 3 à 6 est très favorable au développement des levures et moisissures et parallèlement freine le développement des bactéries à l'exception des acidophiles. Le pH de six variétés de dattes étudiées (pulpe et extrait de datte) est légèrement acide, il est entre 5,74 et 5,95 pour la pulpe et entre 5,06 et 5,32 pour les moûts avec une acidité comprise entre 0,21 et 1,06. Comparant les pH de nos variétés à ceux de quelques variétés de datte irakiennes et égyptiennes, nous pouvons conclure que nos résultats se rapprochent, pour les variétés Lulu 6,5 pour la variété Shahla 6,2 et Bushibul 5,40, Khalas de 5,68 et Bunaam 5,72 [141].

Le taux de cendres représente la quantité totale en sels minéraux présents dans le fruit. De nombreux auteurs dont Saafi [142], Fethi et El-Kohtani [143]; Lambiote [144] et Favier [145] affirment que la datte renferme une teneur en cendre comprise entre 1,5 et 4 %, alors que le taux de cendres des dattes de cette

étude, semble moyens soit Hamraya (2.74 %), Bamakhluf (2,23 %), Degla-Beida (2,18), Mech-degla (2,01), Kentichi (1,99) et Horra (1,89 %) ne peut pas couvrir les besoins de la levure. L'enrichissement de ce milieu de culture par les éléments minéraux est par conséquent indispensable. Amellal-Chibane [138] a travaillé sur quelques variétés Algériennes, a trouvé des teneurs comprises entre 1,99 et 2,13%. Les variétés Saoudiennes et Irakiennes renferment [26] des teneurs en cendre plus élevées, comprises entre 2 et 4 %. Concernant la variation de taux de cendre entre les moûts est nettement visible malgré qu'elles ont été filtrées.

Les sucres sont les constituants prédominants de la datte. Ils sont également responsables de la douceur de l'aliment [146-148]. La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété considérée, du climat et du stade de maturation. Néanmoins, tous s'accordent à dire que les teneurs en sucres totaux des dattes sont de l'ordre de 60 à 80 % [149]. Généralement, la valeur trouvée montre la richesse de la datte en sucres totaux, ce qui constitue un substrat favorable à la multiplication des levures. D'après les résultats donnés, la teneur en sucres dans la pulpe est plus importante que celle des moûts à base de dattes. Nous constatons la richesse des six variétés de dattes testées en sucres totaux, varient entre 64,0 et 78,64 % du poids frais. La variété Horra est la plus riche en sucre avec une teneur de 78,64 % et la variété Degla-Beida est la moins sucrée 64 %. Nos résultats se rapprochent toutefois de ceux trouvés par Siboukeur [149] puisqu'ils sont compris entre 60 et 80 %. Les moûts de dattes présentent des teneurs en sucres totaux comprise entre 15,64 et 29,93 % du poids frais, avec un taux des sucres réducteurs varient entre 13,72 et 23,51 %, et un taux de saccharose varient entre 0,91 et 41,65 %. Ces résultats sont comparables aux résultats de Ould el Hadj [150] qui a obtenu un taux des sucres totaux de 66,5 % pour les pulpes de rebuts et écarts de tris de dattes sèches et 16,64 % pour la solution mère de moût.

La quantité de protéines dans les dattes de la variété Bamakhluf et Horra est plus élevées (2,64 % et 2,61 %) respectivement, par rapport aux quatre autres cultivars. Ces résultats sont comparables aux résultats bibliographiques qui situent le taux de protéines dans la fourchette de 2 à 2,5 % du poids frais de la datte [20,151].

Les tables de composition de FAO donnent de teneurs très proches de nos résultats, oscillant entre 2,4 et 3 %. Ces teneurs bien que faibles, ne sont pas

négligeables comme compléments ou suppléments protéiques. Plus encor, selon de nombreux auteurs [20, 27, 28, 145], les protéines des dattes sont qualitativement bien équilibrées car leur composition correspond à celle dont l'organisme a besoin.

3.1.4. Caractérisation et identification des isolats de levure.

Des cultures pures des levures ont été caractérisées morphologiquement et biochimiquement. Quinze colonies de cultures fraîches d'isolats de levure ont été observées pour la texture, la couleur, la surface, l'aptitude et la marge. La morphologie cellulaire a été déterminée en prenant une partie de la colonie de levure dans des gouttes de bleu de méthylène une lame de verre propre. Les lames ont été examinées au microscope en utilisant l'objectif x40 [152] les propriétés biochimiques déterminées comprennent : la fermentation du sucre.

3.1.4.1. Caractéristiques culturelles

3.1.4.1.1 Croissance sur milieu liquide

L'examen des cultures après 24 heures d'incubation à 30°C a donné l'apparition d'un dépôt au fond des tubes, ce qui présente une culture positive (Figure 3.2).

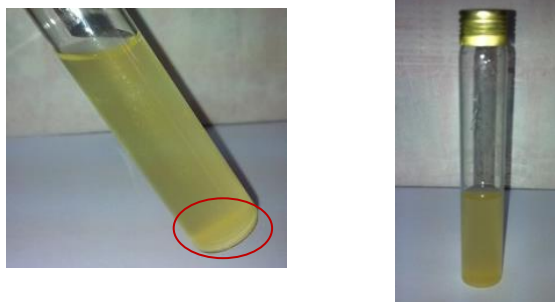


Figure 3.2: Aspect culturelle de *S. cerevisiae*.

3.1.4.1.2 Croissance sur milieu solide

- **Milieu solide type WLN** (Figure 3.3 a) : utilisé pour séparer *S. cerevisiae* des souches sauvages. Les aspects des colonies sur WLN après 72 heures d'incubation à 25 °C sont :
 - Couleur : vertes, brillantes.
 - Forme : rondes, lisses et bombées.
- **Milieu solide type Sabouraud chlorophinicol** (Figure 3.3 c) :

Après 48 heures d'incubation à 30 ± 2 °C, l'observation macroscopique des colonies montre la présence d'un seul type de colonies présentant les caractéristiques suivantes :

- **Couleur** : crèmes, brillantes.
- **Forme** : bombées et lisses.
- Absence de pigmentation.

De plus, une odeur de levure de brasserie ou de boulanger.

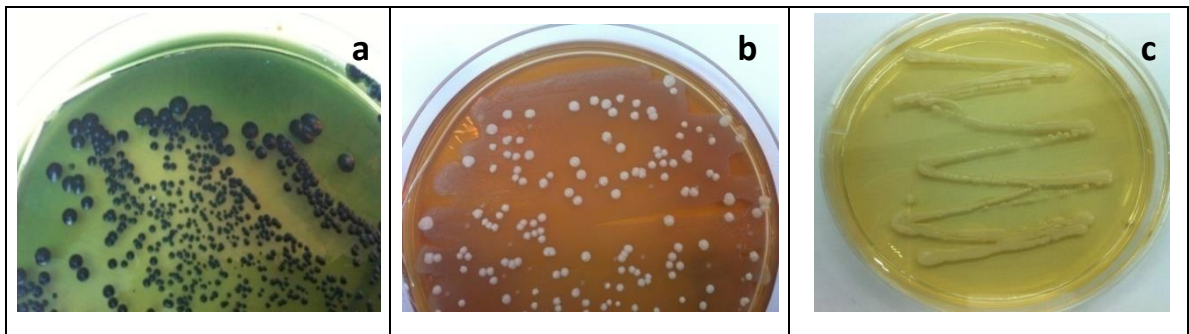


Figure 3.3: Aspect culturale de *S. cerevisiae* isolée sur milieu solide, a: gélose WLN modifiée, b: gélose WLN, c: milieu Sabouraud chlorophinicol.

3.1.4.2. Caractéristiques physiologiques

3.1.4.2.1. Fermentation des sucres

L'étude de la fermentation à l'aide de la microplaque AUXACOLOR des treize sucres testés a été effectuée. La première lecture a été achevée à 24 heures et la lecture définitive à 48 heures (Figure 3.4). Après 48 heures d'incubation à 30°C la lecture nous a conduits à identifier deux espèces des levures la *S. cerevisiae* et la levure pathogène chez l'homme *Candida albicans*.

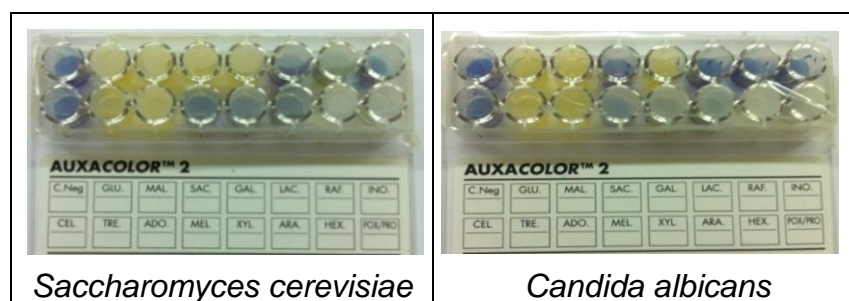


Figure 3.4 : La lecture définitive après 48 heures d'incubation à 30°C.

3.1.4.3. Caractéristiques morphologiques

Après 24 heures d'incubation à 30°C sur milieu YEPD liquide sans éthanol, l'observation microscopique de six souches bactériennes isolées montre la présence de cellules de forme ovoïde avec des bourgeonnements (Figure 3.5)

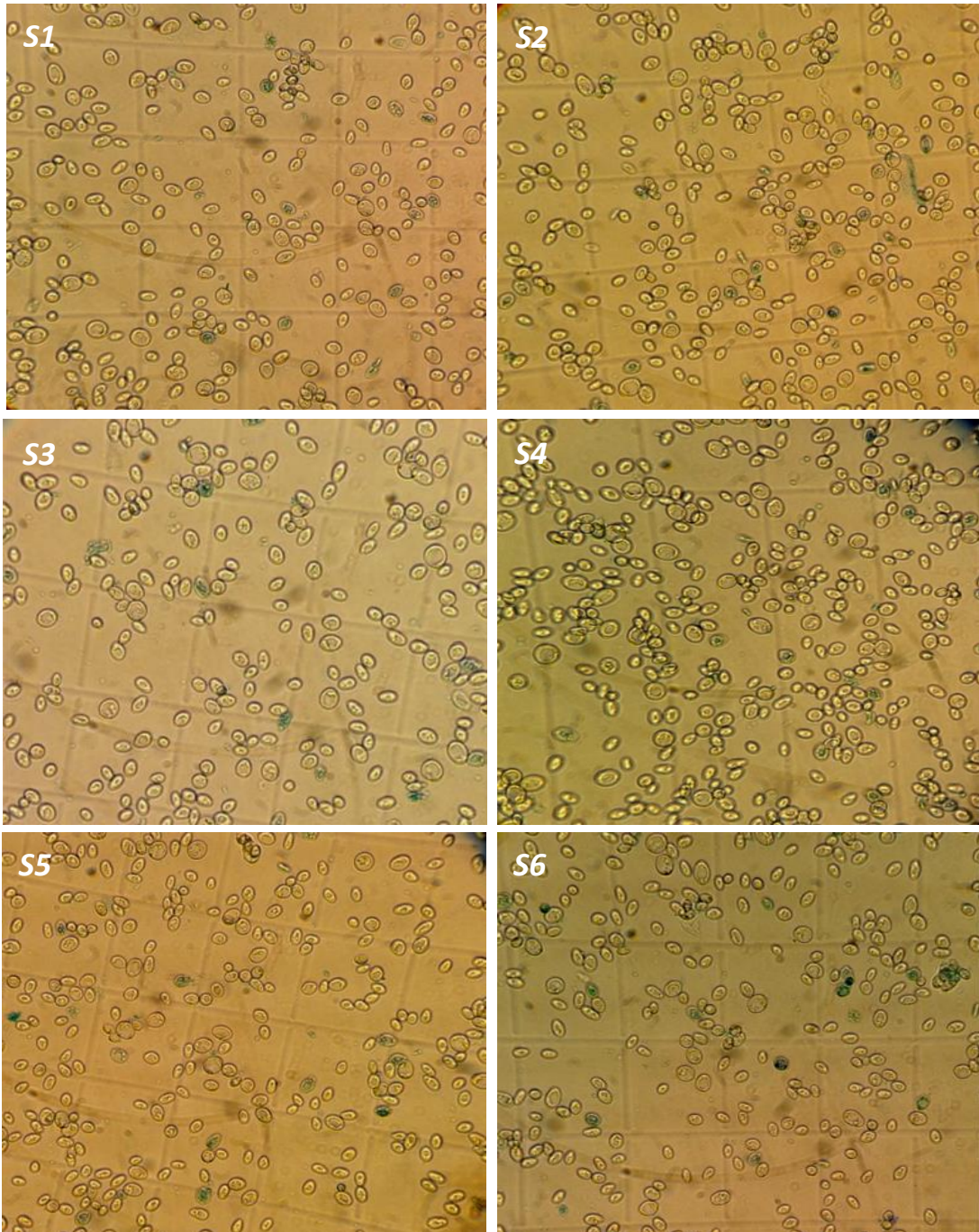


Figure 3.5: Aspect microscopique des cellules de six souches après une culture de 24 heures sur YEPD liquide à 30°C et pH=4.

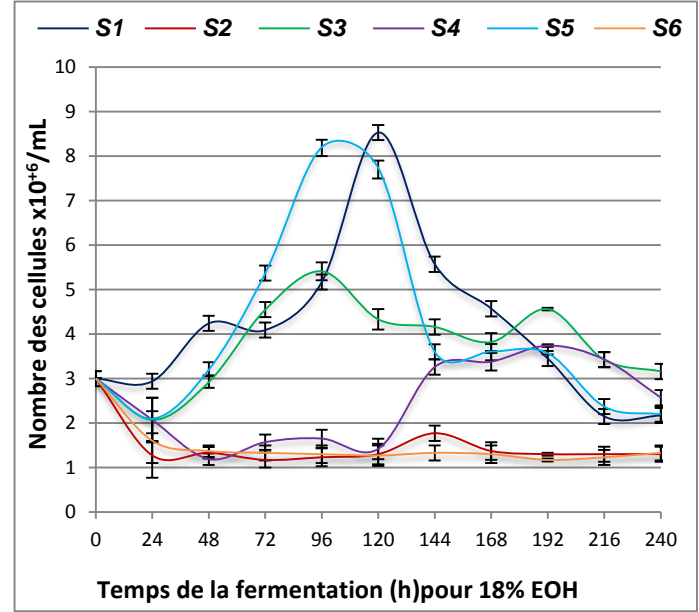
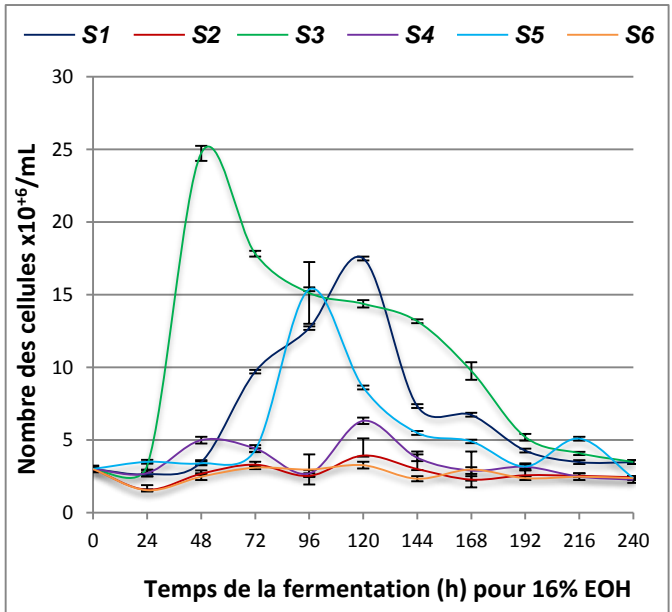
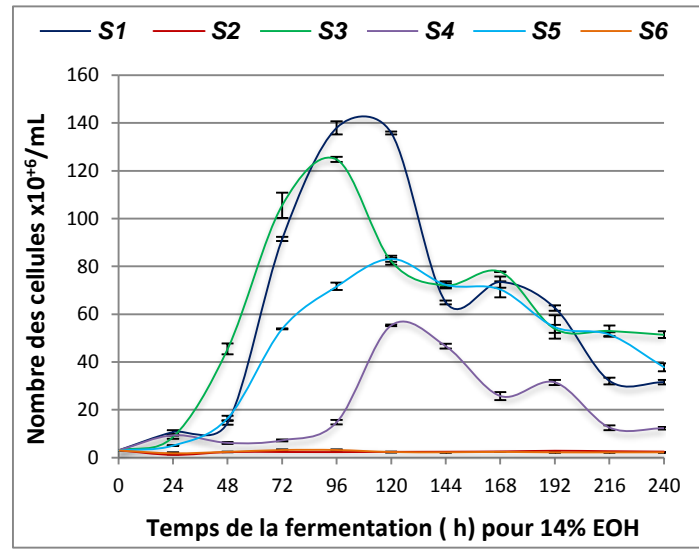
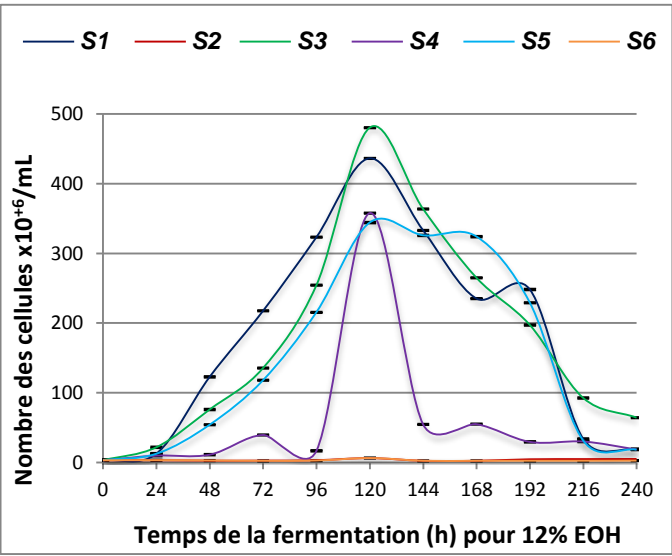
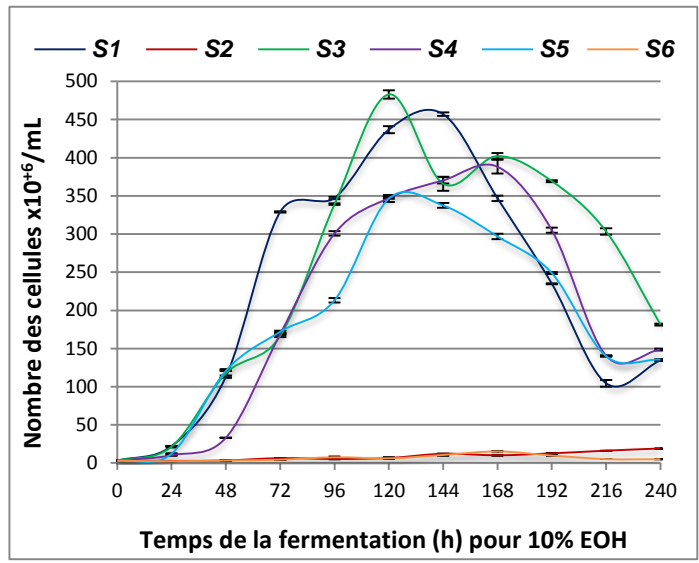
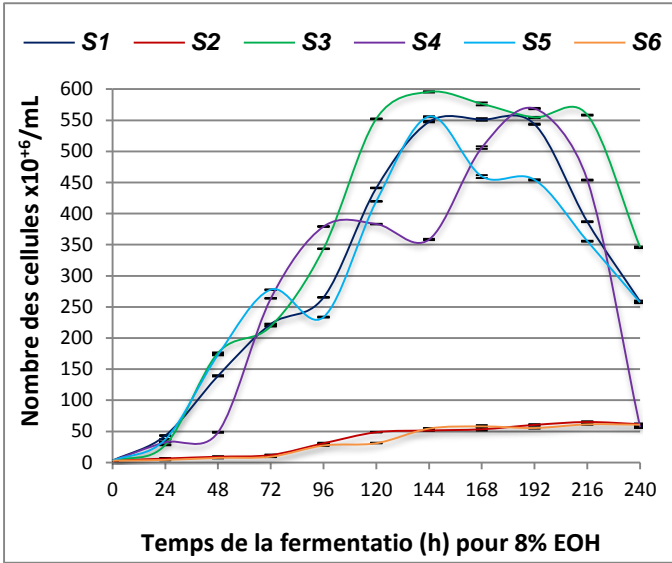
Ces éléments montrent respectivement qu'il s'agit de levures et qu'elles sont dans une dynamique de croissance. Concernant le test de l'aptitude à la filamentation, les cellules des souches observées au microscope après sept jours d'incubation se présentent groupées en plusieurs associations cellulaires sous forme de chaîne faisant montrer aussi une structure filamenteuse, ce qui présente une structure pseudomycélienne.

3.1.5. Étude de la Résistance des souches *Saccharomyces cerevisiae* à la concentration initiale en éthanol

Bien que l'éthanol soit le produit final de la fermentation, il devient un facteur de stress important en s'accumulant dans le milieu. Il est connu comme un inhibiteur de la croissance des microorganismes. Une fois produit par les levures, il diffuse à travers la membrane plasmique, inhibe la croissance [153], diminue la viabilité des cellules, affectant considérablement les fonctions et les propriétés physico-chimiques de la membrane plasmique et réduit ainsi le rendement en éthanol [154], ce qui impacte sérieusement les entreprises industrielle.

L'impact de ce stress sur nos souches a été étudié sur milieu semi-synthétique ou ont choisi les conditions idéales (température 30°C et pH 4) de croissance de chaque levure isolée, puis on refait la fermentation sur le même milieu de culture, sauf à chaque fois on ajoute l'éthanol absolu (Merck, Allemagne) en différentes concentrations.

La figure (3.6) présente l'évolution de la population totale de six souches pures de *Saccharomyces cerevisiae* pour chaque fermentation réalisée en fonction du temps.



Figures 3.6 : Profil cinétique de croissance des levures à différents teneurs en éthanol.

L'évolution cinétique de la population totale de six souches étudiées pour les six teneurs en éthanol est présentée par la figure (3.6), où les levures S1, S3, S4 et S5 présentent une cinétique classique de croissance microbienne avec ces 4 phases lorsqu'on passe de 8 % à 10 % d'éthanol. Des variations de vitesse sont toutefois observées entre les souches pour une même concentration en éthanol. L'influence de l'éthanol n'est pas la même pour toutes les souches testées, leur effet est cependant plus ou moins marqué selon l'origine des souches utilisées.

Les populations maximales obtenues en phase stationnaire diminuent, les vitesses spécifiques maximales diminuent également et les durées de fermentation augmentent lorsqu'on passe de 8 % à 18 % en éthanol. On constate que les souches S1 et S3 sont les moins sensibles au stress de l'éthanol puisque même à 14 % d'éthanol la population maximale est de 137 millions de cellules/mL pour la souche S1 et de 124 millions de cellules/mL pour S3, et la population finale est encore significative même pour des teneurs en éthanol d'ordre 16 % et 18 %. Une teneur de 12 % d'éthanol affaiblit la croissance de S4, tandis qu'une teneur de 16 % arrête la multiplication des cellules de cette dernière, surtout pendant les premières heures de fermentation.

Ainsi, au-delà d'une teneur de 14 % en éthanol la souche S4 est devenue incapable de se développer, par contre la souche S5 présente une cinétique remarquable. Les deux autres levures S6 et S2 sont totalement inhibées à partir d'une teneur en éthanol de 10 %.

Dans les systèmes biologiques, l'éthanol affecte le taux des réactions biochimiques, l'activité des enzymes extracellulaires et le temps de génération [155], ce qui influe significativement sur la croissance des levures. Cependant, à des teneurs élevées en éthanol les souches se comportent différemment, il existe donc une certaine variabilité entre les souches puisqu'elles ont une sensibilité plus ou moins prononcée à la teneur initiale en éthanol.

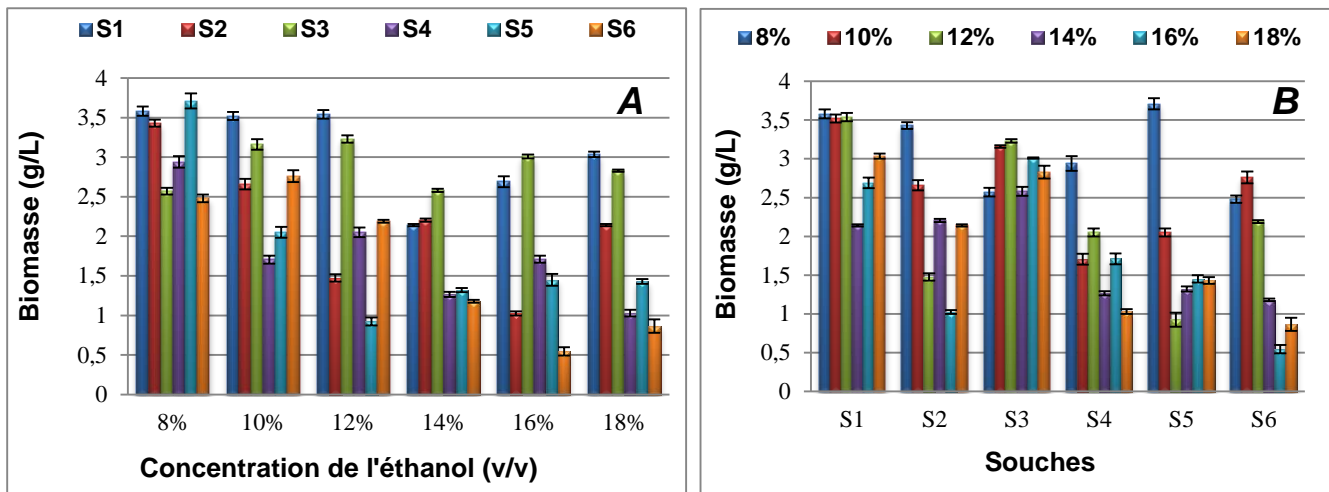


Figure 3.7 : Comparaison de la concentration de biomasse maximale en fonction de différents teneurs en éthanol pour six souches de *S. cerevisiae* (A) et en fonction de différents souches pour six teneurs en éthanol (B).

La meilleure productivité de la biomasse a été obtenue à 8 %, 10 % et 12 % d'éthanol pour la souche S1, suivie par S3 et enfin par la souche S2 (Figure 3.7). Contrairement pour souches S6, S5 et S4, la quantité de biomasse obtenue est très faible au-delà de 12 % d'éthanol. On conclut que les deux souches S1 et S3 sont les plus productives en différents teneurs en éthanol par rapport aux autres souches.

Tableau 3.3: Comparaison des taux spécifiques de croissance maximum (μ_{max}) pour les six souches en fonction du temps de latence à différentes concentrations en éthanol.

Souche	Concentration d'éthanol (v/v)					
	8%	10%	12%	14%	16%	18%
S1	0,02149	0,0243	0,0413	0,0330	0,0186	0,0186
S2	0	0	0	0	0	0
S3	0,0327	0,0130	0,0225	0,0303	0,0367	0,0133
S4	0,0306	0,0294	0	0	0	0
S5	0,0299	0,0409	0,0265	0,0209	0,0216	0,0174
S6	0,0265	0	0	0	0	0

La figure (3.8) illustre le pourcentage de viabilité à différents teneurs en éthanol pour 6 souches de *S. cerevisiae*

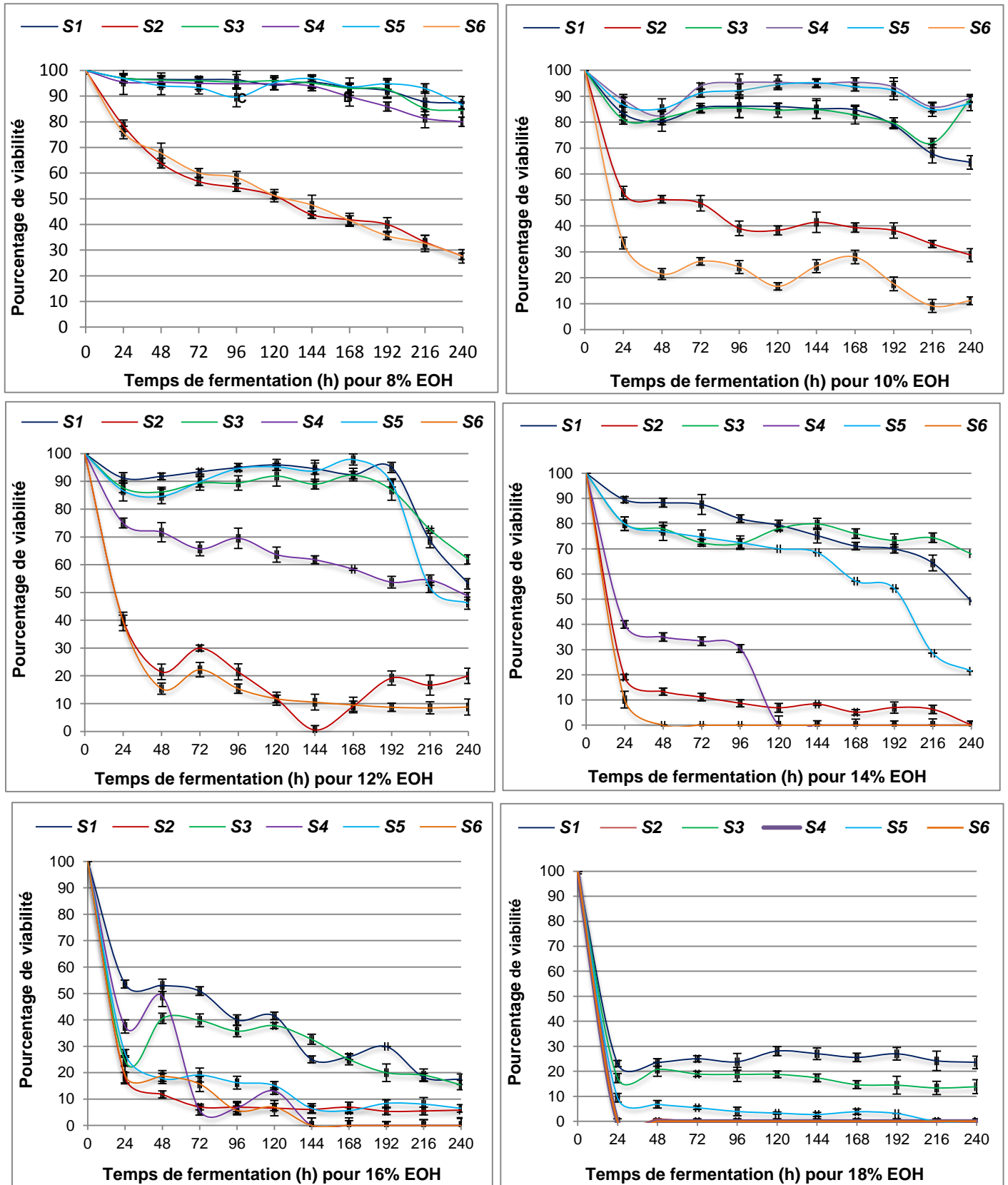


Figure 3.8 : Pourcentage de viabilité à différentes teneurs en éthanol pour six souches de *S. Cerevisiae*.

La figure (3.8) montre clairement que l'effet inhibiteur de l'éthanol diffère d'une souche à une autre. Si nous nous attachons maintenant au pourcentage de viabilité, on peut noter, que plus la teneur en éthanol augmente, le taux de viabilité est faible. Le stress de l'éthanol influe sur la production en biomasse, la viabilité cellulaire et les différents types de production. Cette mortalité élevée observée à partir de 16 % d'éthanol pour les souches S2, S4, S5 et S6.

Il a été démontré que même à des faibles concentrations en éthanol, comprise entre 4 et 6 % (v/v), il y a formation de protéine de choc thermique indiquant un stress important subi par la levure [156]. Ainsi, les effets inhibiteurs apparaissent sur la production d'éthanol à partir de concentrations comprises entre 10 et 13% (v/v) [157].

Cependant d'autres travaux ont montré qu'à une concentration critique en éthanol (20 à 40 g/L), la levure cesse de croître, ce qui est influencé par plusieurs facteurs [158]. Pour la production de l'éthanol, la concentration inhibitrice peut aller jusqu'à 20 % (v/v) en présence de *S. cerevisiae* dans le milieu de culture [159].

3.1.6. Cinétique de consommation du glucose

La figure (3.9) présente les profils de consommation du glucose lorsque nous avons fait varier la teneur en éthanol pour six souches pure testées.

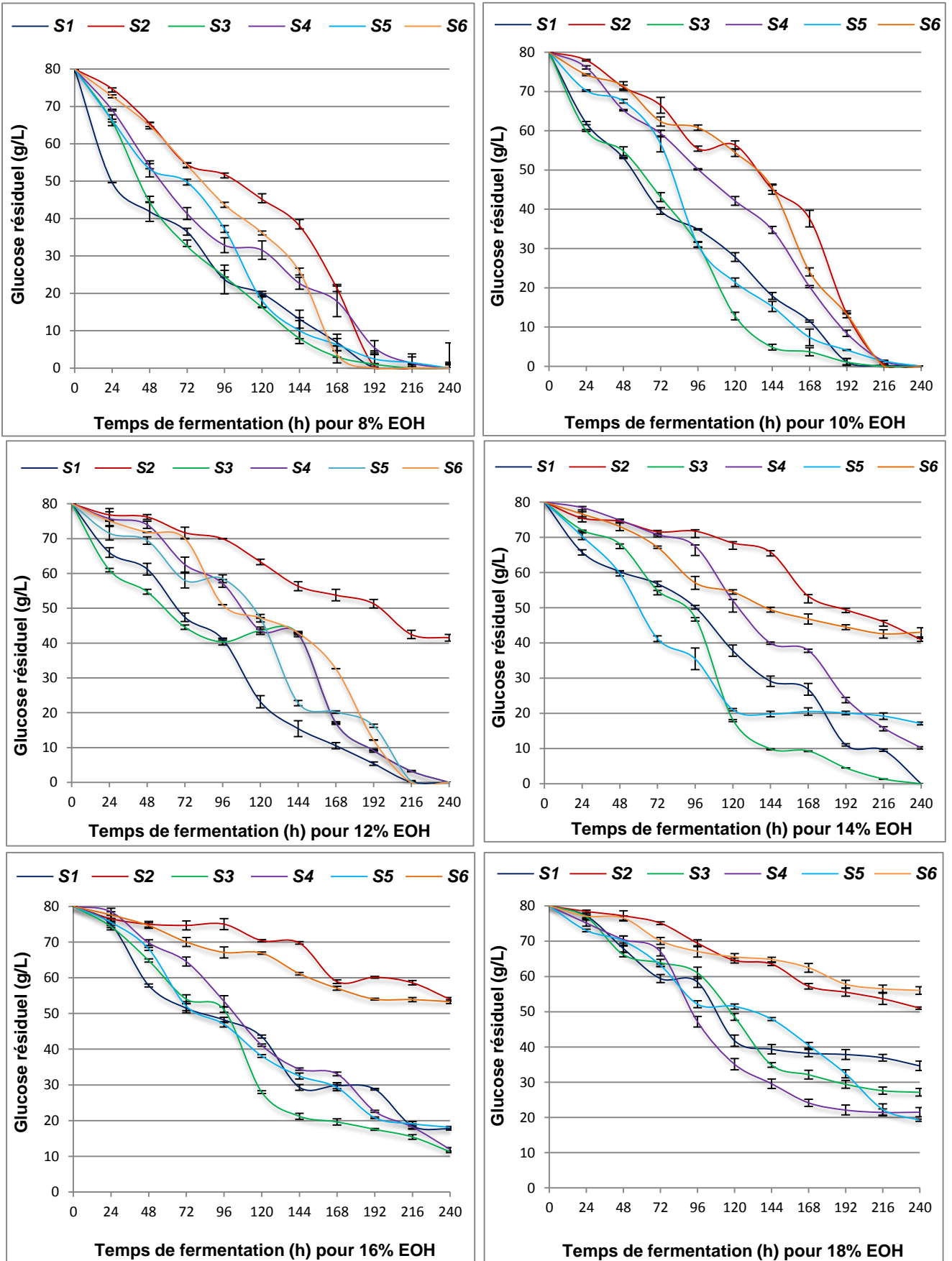


Figure 3.9 : Variation de la concentration de glucose au cours de la fermentation à différentes teneurs en éthanol pour six souches de *S. cerevisiae*.

La cinétique de consommation de glucose qui constitue une source de carbone et d'énergie entrant dans la composition du milieu de culture montre une dégradation remarquable de ce dernier après 24 heures de fermentation. D'après la figure (3.9) on distingue la consommation complète du glucose par toutes les souches à des concentrations en éthanol comprises entre 8 et 12 %, sauf la souche S2 qui a été incapable de le consommer.

A 14 % d'éthanol, le glucose n'a pas été consommé totalement par les levures, cela peut être dû à l'arrêt de la croissance du *S. cerevisiae* par accumulation des substances toxiques [160], ce qui indique qu'à des concentrations élevées, les acides gras en particulier l'acide octanoïque et l'acide décanoïque, formés par les levures à la concentration de quelques milligrammes par litre, deviennent toxiques pour cette dernière, ainsi l'effet du glucose et de l'alcool dans le milieu devient inhibiteur.

Tableau 3.4 : Concentration de glucose résiduel (g/L) à différentes teneurs en éthanol pour six levures de *S. cerevisiae*

Souche	Concentration de glucose résiduel					
	8%	10%	12%	14%	16%	18%
S1	0	0	0	0	17,69±0,84	35,19±1,37
S2	0	0	41,58±1,54	41,33±1,09	54,32±0,41	53,29±0,98
S3	0	0	0	0	11,54±0,98	28,51±0,66
S4	0	0	0	10,52±0,17	12,17±1,03	21,15±1,07
S5	0	0	0	17,34±1,24	18,35±1,22	19,57±0,95
S6	0	0	0	43,50±1,12	53,60±0,64	57,11±0,11

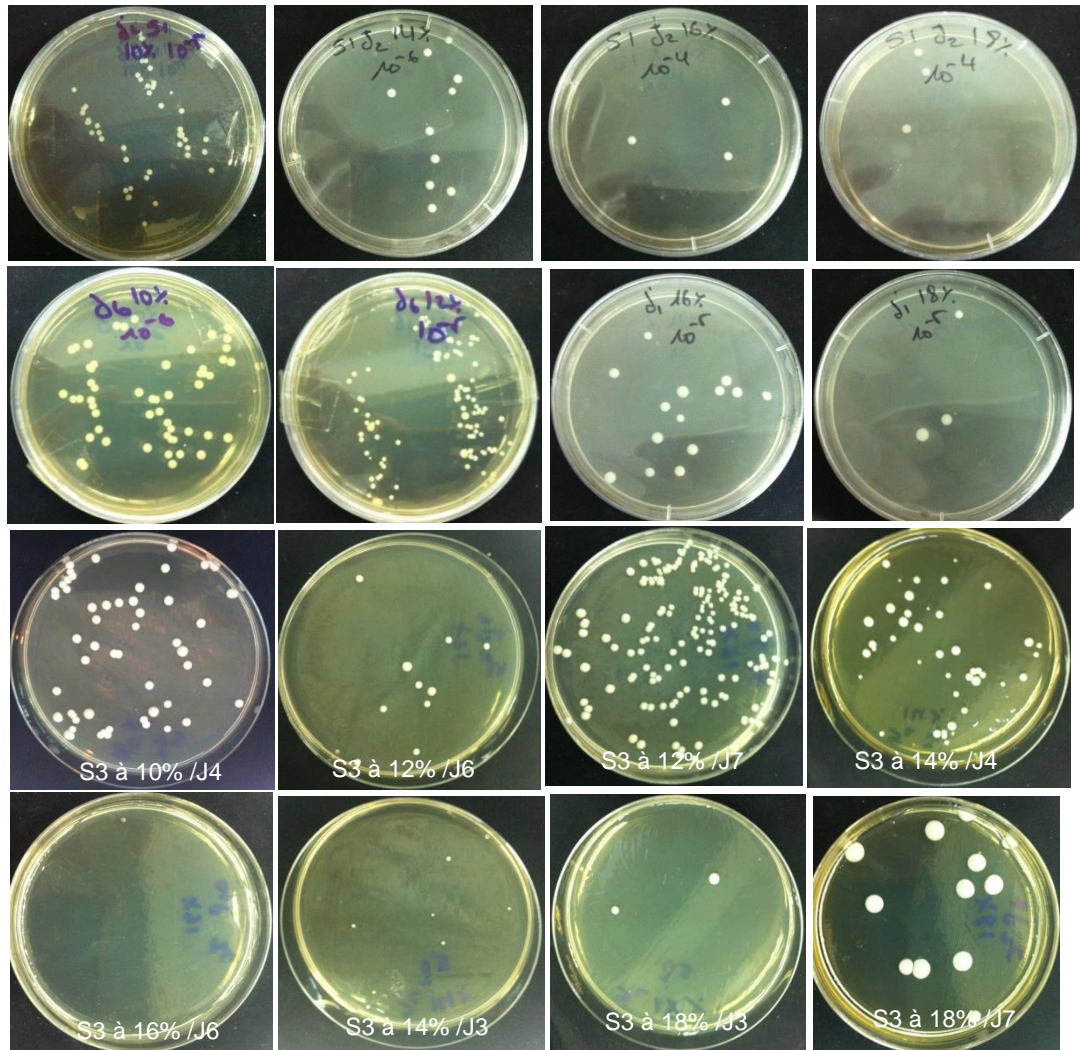


Figure 3.10: Croissance de *Saccharomyces cerevisiae* (S1 et S3) dans des milieux de culture de pourcentage différents d'éthanol à 30 °C.

3.2. Optimisation et modélisation des paramètres environnementaux sur la croissance de "*saccharomyces cerevisiae*" isolée de rebut de datte

3.2.1. Introduction

Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux effets de différents facteurs environnementaux sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*, deux souches (S1 et S3) qui ont été isolées localement à partir de l'extrait de dattes *Mech-Degla* et *Degla-Beida* respectivement. En s'appuyant sur la méthodologie des plans d'expérience pour étudier l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance des levures, tel que le pH, température, concentration initiale en éthanol et salinité. Les valeurs des paramètres du modèle de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* sont fixées à partir des résultats du plan d'expérience et le recueil des données a été effectué selon un plan composite centré, de manière à étudier les effets linéaires, sur les effets quadratiques et les interactions entre facteurs.

3.2.2. Matrice d'expérience

En fonction des paramètres à étudier et de leurs limites de variation, le logiciel Modde 6 a déterminé les expériences à réaliser. Les variables d'étude considérées sont la concentration initiale en éthanol, la salinité, la température et le pH. Les conditions opératoires testées sont: Une concentration initiale de l'éthanol varié de 3 % à 14 % (v/v) ; 20 à 38 °C pour la température; de 3 à 6 pour le pH et de 2 à 6 % pour le NaCl.

A partir des variables d'étude, on peut donc déduire la matrice d'expériences suivante (Tableau 3.5):

Tableau 3.5: Définition des différents niveaux des variables de la matrice d'expériences d'un plan Composite Centré.

N° expérience	N° ordre expérience	Niveaux				Niveaux réelles			
		(X ₁)	(X ₂)	(X ₃)	(X ₄)	Ethanol (X ₁)	Température (X ₂)	pH (X ₃)	NaCl (X ₄)
1	13	-1	-1	-1	-1	3	20	3	2
2	3	+1	-1	-1	-1	14	20	3	2
3	16	-1	+1	-1	-1	3	38	3	2
4	14	+1	+1	-1	-1	14	38	3	2
5	20	-1	-1	+1	-1	3	20	6	2
6	19	+1	-1	+1	-1	14	20	6	2
7	23	-1	+1	+1	-1	3	38	6	2
8	2	+1	+1	+1	-1	14	38	6	2
9	5	-1	-1	-1	+1	3	20	3	6
10	11	+1	-1	-1	+1	14	20	3	6
11	6	-1	+1	-1	+1	3	38	3	6
12	15	+1	+1	-1	+1	14	38	3	6
13	22	-1	-1	+1	+1	3	20	6	6
14	26	+1	-1	+1	+1	14	20	6	6
15	8	-1	+1	+1	+1	3	38	6	6
16	4	+1	+1	+1	+1	14	38	6	6
17	1	-1	0	0	0	3	29	4,5	4
18	17	+1	0	0	0	14	29	4,5	4
19	24	0	-1	0	0	8,5	20	4,5	4
20	10	0	+1	0	0	8,5	38	4,5	4
21	25	0	0	-1	0	8,5	29	3	4
22	18	0	0	+1	0	8,5	29	6	4
23	12	0	0	0	-1	8,5	29	4,5	2
24	27	0	0	0	+1	8,5	29	4,5	6
25	9	0	0	0	0	8,5	29	4,5	4
26	7	0	0	0	0	8,5	29	4,5	4
27	21	0	0	0	0	8,5	29	4,5	4

Nous avons choisi de suivre comme variables de réponse: La concentration de biomasse maximale (X_{max}); la vitesse de croissance maximale (μ_{max}) et le temps de latence (λ), nous avons choisi de définir ce temps de latence comme le temps où on atteint une biomasse deux fois plus importante que la biomasse initiale (λ temps pour lequel $X=2X_0$).

Le plan généré par le logiciel Modde 6 est de type Composite Centré (CCF-Central Composite Face-centered). On a retenu pour notre étude le même plan d'expérience pour les deux souches S1 et S3. L'expérience correspondant à chaque point du plan expérimental a été réalisée 3 fois.

Pour chacune, la courbe $\log DO = f(\text{temps})$ a été tracée grâce au logiciel Excel; le taux de croissance μ (h^{-1}), le temps de latence λ (h), et la biomasse maximale (X_{\max}) ont été déterminés graphiquement. Le tableau (3.6) résume les résultats expérimentaux pour chaque combinaison éthanol, température, pH et NaCl.

Tableau 3.6: Présentation des paramètres de croissance pour chaque expérience sur les milieux synthétiques des deux souches (S1, S3).

N° expérience	<i>La souche S1</i>			<i>La souche S3</i>		
	X_{\max} (g/l)	μ_{\max} (h^{-1})	Latence λ (h)	X_{\max} (g/l)	μ_{\max} (h^{-1})	Latence λ (h)
1	3,73	0,039	52	3,88	0,031	52
2	2,48	0,025	56	2,62	0,038	56
3	3,95	0,039	56	2,72	0,036	56
4	2,11	0,021	72	1,96	0,025	72
5	3,32	0,038	32	3,25	0,036	32
6	2,49	0,027	78	3,32	0,032	78
7	2,95	0,036	48	2,89	0,042	48
8	2,24	0,028	120	2,61	0,027	120
9	3,54	0,057	30	3,47	0,042	30
10	1,55	0,015	76	1,62	0,024	81
11	2,63	0,055	48	2,52	0,047	48
12	0,67	0,016	128	0,33	0,017	128
13	2,87	0,046	52	2,53	0,038	52
14	1,72	0,012	152	0,62	0,015	152
15	2,01	0,043	72	2,12	0,046	72
16	0,85	0,013	196	0,91	0,016	196
17	3,72	0,048	24	4,54	0,053	24
18	2,62	0,022	97	2,75	0,031	97
19	3,54	0,032	32	4,12	0,033	32
20	3,12	0,027	52	3,28	0,028	53
21	2,62	0,025	49	2,85	0,025	48
22	2,29	0,021	72	2,33	0,029	72
23	3,83	0,027	26	3,73	0,028	27
24	2,92	0,032	52	3,56	0,023	52
25	3,52	0,03	30,5	3,67	0,034	30
26	3,61	0,028	30,5	3,69	0,035	30
27	3,59	0,028	30,5	3,74	0,034	30

27 expériences au total et 3 répétitions du point central ont été réalisées pour chaque souche (S1 et S3). La répétition du point central permet l'estimation de la variance expérimentale. L'ensemble de ces expériences va nous permettre de connaître l'impact de chaque variable d'étude sur la croissance de la levure ainsi que leurs éventuelles interactions.

D'après le formalisme du plan d'expériences, les différentes valeurs des variables de réponses « y » ont été assimilées à un modèle polynomial du 2^{ème} degré.

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{44}X_4^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{14}X_1X_4 + a_{23}X_2X_3 + a_{24}X_2X_4 + a_{34}X_3X_4 + a_{123}X_1X_2X_3 + a_{124}X_1X_2X_4 + a_{134}X_1X_3X_4 + a_{234}X_2X_3X_4 + a_{1234}X_1X_2X_3X_4 \dots \dots \dots (II)$$

Les réponses générées par le premier logiciel (Modde 6.0) pour l'ensemble des 27 essais, ont été traitées informatiquement par un second logiciel Statgraphics Centurion Version 18.0.09. La détermination des différents coefficients a_i du modèle polynomial (Equation II) s'est fait par une régression multilinéaire multi-variables. Les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart-type, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée dans chaque cas et les différences ont été considérées significatives à $p < 0,05$.

Les résultats générés par ce logiciel, pour chaque essai du plan d'expérience exécuté, sont présentés sur les figures (3.11, 3.12 et 3.13) regroupent deux graphique de Pareto pour chaque souches montrant les effets du chaque paramètres et les tableaux (3.7, 3.8 et 3.9) de l'analyse de variance. De même, le modèle mathématique correspondant est établi après un calcul matriciel.

3.2.3. Evaluation de l'effet combiné des quatre facteurs sur la concentration de la biomasse maximale (X_{max}) des deux souches (S1 et S3)

La figure (3.11) présente les résultats obtenus de l'effet des interactions combinées des quatre facteurs physico-chimiques sur la densité cellulaire maximale (X_{max}) exprimé en (g/L).

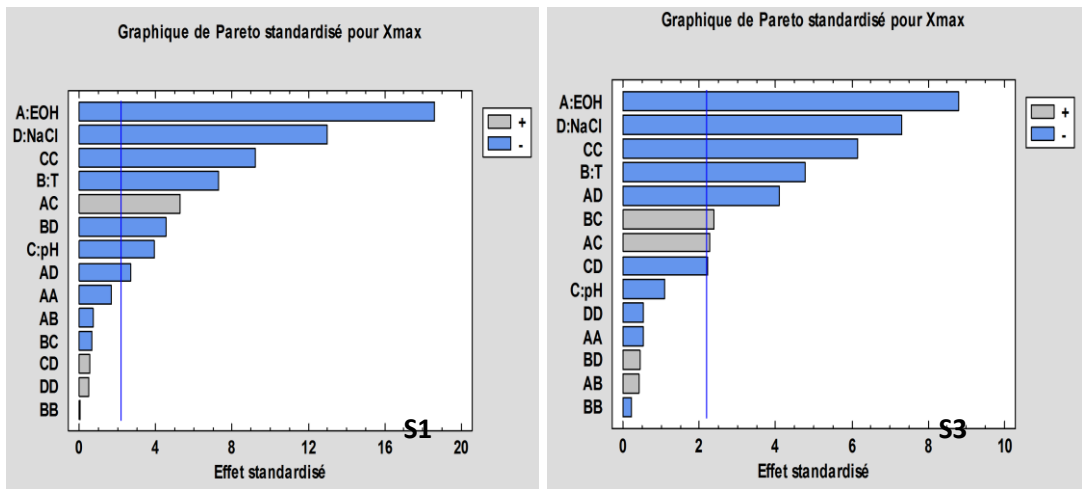


Figure 3.11 : Diagramme de Pareto pour X_{max} de S1 et S3 maximale.

Tableau 3.7 : Effet des paramètres environnementaux sur la concentration de biomasse maximale.

Facteur	La souche S1				La souche S3			
	Ecart-type	DDL	F	Proba.	Ecart-type	DDL	F	Proba.
A:EOH	7,15 E -2	1	347,19	0,0000	0,141422	1	77,15	0,0000
B:T	7,15 E -2	1	53,58	0,0000	0,141422	1	22,89	0,0004
C:pH	7,15 E -2	1	15,58	0,0019	0,141422	1	1,19	0,2962
D:NaCl	7,15 E -2	1	167,98	0,0000	0,141422	1	53,39	0,0000
AA	1,89 E -1	1	2,72	0,1247	0,374168	1	0,27	0,6107
AB	7,58 E -2	1	0,55	0,4725	0,150001	1	0,18	0,6784
AC	7,58 E -2	1	27,65	0,0002	0,150001	1	5,18	0,0421
AD	7,58 E -2	1	7,22	0,0198	0,150001	1	16,88	0,0015
BB	1,89 E -1	1	0,00	0,9679	0,374168	1	0,05	0,8230
BC	7,58 E -2	1	0,46	0,5120	0,150001	1	5,72	0,0340
BD	7,58 E -2	1	20,55	0,0007	0,150001	1	0,20	0,6666
CC	1,89 E -1	1	84,82	0,0000	0,374168	1	37,97	0,0000
CD	7,58 E -2	1	0,30	0,5964	0,150001	1	4,88	0,0474
DD	1,89 E -1	1	0,27	0,6146	0,374168	1	0,27	0,6107
Erreur totale		12				12		
R²			0,9865				0,9619	

L'analyse de variance porte sur 14 facteurs pour les deux souches S1 et S3; donc les deux modèles initiaux ont une équation polynômiale à 14 termes (II.1) et (II.2).

$$\begin{aligned}
 X_{\max}(\mathbf{S1}) = & -2,10798 - 0,0886065 x_1 + 0,0197069 x_2 + 3,2125 x_3 - 0,00475063 x_4 - \\
 & 0,0051607 x_1^2 - 0,000568182 x_1 x_2 + 0,0241667 x_1 x_3 - 0,00926136 x_1 x_4 + \\
 & 0,000048011 x_2^2 - 0,00189815 x_2 x_3 - 0,00954861 x_2 x_4 - 0,38716 x_3^2 + 0,006875 \\
 & x_3 x_4 + 0,0122222 x_4^2 \dots\dots\dots(\text{II.1})
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 X_{\max}(\mathbf{S3}) = & -3,44909 - 0,0576768 x_1 - 0,0795879 x_2 + 4,21934 x_3 + 0,370388 x_4 - \\
 & 0,00323232 x_1^2 + 0,000643939 x_1 x_2 + 0,0206818 x_1 x_3 - 0,0280114 x_1 x_4 - \\
 & 0,000528121 x_2^2 + 0,013287 x_2 x_3 + 0,00184028 x_2 x_4 - 0,512346 x_3^2 - 0,0552083 \\
 & x_3 x_4 - 0,0244444 x_4^2 \dots\dots\dots(\text{II.2})
 \end{aligned}$$

Mais pour affiner le modèle, seuls sont pris en compte les facteurs à effets significatifs. Dans ce cas, 8 effets ont des probabilités inférieures à 0,05 pour S1 et S3, ce qui indique qu'ils sont significativement différents de zéro au niveau de confiance de 95,0 %. On obtient alors 8 facteurs significatifs sur le taux de

croissance des deux souches, on peut alors décrire l'influence de ces différents facteurs par les deux modèles simplifiés suivants:

$$X_{\max} (S1) = - 2,10798 - 0,0886065 x_1 + 0,0197069 x_2 + 3,2125 x_3 - 0,00475063 x_4 + 0,0241667 x_1 x_3 - 0,00926136 x_1 x_4 - 0,00954861 x_2 x_4 - 0,38716 x_3^2 \dots \dots \dots (II.3)$$

$$X_{\max} (S3) = -3,44909 - 0,0576768 x_1 - 0,0795879 x_2 + 0,370388 x_4 + 0,0206818 x_1 x_3 - 0,0280114 x_1 x_4 + 0,013287 x_2 x_3 - 0,512346 x_3^2 - 0,0552083 x_3 x_4 \dots \dots \dots (II.4)$$

Avec : x_1 : [EOH], x_2 : T, x_3 : pH et x_4 : [NaCl]

La figure (3.11) indique que 4 termes linéaires (éthanol, température, NaCl, pH), 1 terme quadratique [pH^2] et 3 interactions [EOH-pH], [EOH-NaCl], [T-NaCl] sont significatifs sur la biomasse maximale de la souche (S1) et 3 termes linéaires (éthanol, température, NaCl), 1 terme quadratique [pH^2] et 4 interactions [EOH-pH], [EOH-NaCl], [T-pH], [pH-NaCl] sont significatifs sur la biomasse maximale de (S3). Les valeurs du test F nous révèlent de plus que l'éthanol est le facteur prépondérant parmi ceux étudiés. D'autre part, les coefficients de détermination obtenus $R^2(S1) = 0,9865$ et $R^2(S3) = 0,9619$ signifient que 98,65% de la variation de la biomasse de S1 et 96,19% de la variation de la biomasse de S3 sont attribuées aux variables indépendantes étudiés.

3.2.4. Evaluation de l'effet combiné des quatre facteurs sur la vitesse de croissance maximale (μ_{\max}) des deux souches

Les résultats générés par Statgraphics, pour chaque essai du plan d'expérience exécuté, sont donnés dans la figure (3.12). Les deux modèles polynomiaux peuvent être transcrits sous forme de diagramme de Pareto qui représente visuellement l'influence de chacun des paramètres sur la variable de réponse (μ_{\max}).

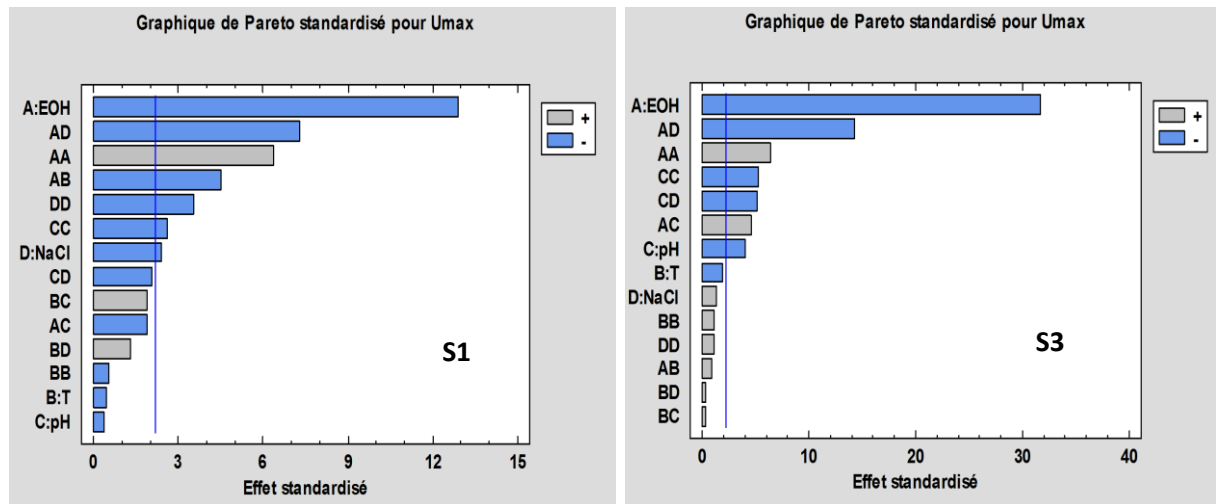


Figure 3.12 : Diagramme de Pareto pour μ_{\max} de S1 et S3

Tableau 3.8 : Effet des paramètres environnementaux sur le taux spécifique maximal de croissance (μ_{\max}).

Facteur	La souche S1				La souche S3			
	Ecart-type	DDL	F	Proba.	Ecart-type	DDL	F	Proba.
A:EOH	9,92 E -4	1	1007,1	0,0000	1,26 E -3	1	165,88	0,0000
B:T	8,09 E -4	1	3,45	0,0878	1,26 E -3	1	0,19	0,6670
C:pH	8,09 E -4	1	16,02	0,0018	1,26 E -3	1	0,12	0,7303
D:NaCl	8,09 E -4	1	1,66	0,2225	1,26 E -3	1	5,67	0,0346
AA	1,09 E -3	1	41,11	0,0000	3,33 E -3	1	40,70	0,0000
AB	5,99 E -4	1	0,83	0,3809	1,34 E -3	1	20,17	0,0007
AC	5,99 E -4	1	20,69	0,0007	1,34 E -3	1	3,50	0,0859
AD	5,99 E -4	1	203,14	0,0000	1,34 E -3	1	53,26	0,0000
BB	2,06 E -3	1	1,13	0,3089	3,33 E -3	1	0,27	0,6109
BC	8,24 E -4	1	0,09	0,7669	1,34 E -3	1	3,50	0,0859
BD	8,24 E -4	1	0,09	0,7669	1,34 E -3	1	1,72	0,2147
CC	2,06 E -3	1	27,66	0,0002	3,33 E -3	1	6,88	0,0223
CD	8,24 E -4	1	26,58	0,0002	1,34 E -3	1	4,24	0,0619
DD	2,06 E -3	1	1,13	0,3089	3,33 E -3	1	12,41	0,0042
Erreur totale	0,18917	12				12		
R²			0,9912				0,9622	

Comme pour X_{\max} la figure (3.11) indique que 2 termes linéaires (éthanol, pH), 2 termes quadratiques $[EOH^2]$, $[pH^2]$ et 3 interactions $[EOH-pH]$, $[EOH-NaCl]$, $[pH-NaCl]$ sont significatifs sur le taux de la croissance maximal de la souche (S1) et 2 termes linéaires (éthanol, NaCl), 3 termes quadratiques $[EOH^2]$, $[pH^2]$,

[NaCl²] et 2 interactions [EOH-T], [EOH-NaCl] sont significatifs sur le taux de la croissance maximal de (S3). Toutefois, ces interactions statistiquement sont à la limite du seuil de signification et ont un effet moins important que la concentration en éthanol. On peut écrire l'influence de ces différents facteurs avec les modèles polynomiale simplifiés suivants:

$$\mu_{\max} (S1) = + 0,01801 - 0,00505 x_1 + 0,02123 x_3 + 0,00022 x^2_1 + 0,00023 x_1x_3 - 0,00053 x_1x_4 - 0,00240 x^2_3 - 0,00071 x_3x_4 \dots\dots\dots(II.5)$$

$$\mu_{\max} (S3) = - 0,0233392 - 0,0032363 x_1 + 0,0154106 x_4 + 0,000351393 x^2_1 - 0,0000606061 x_1 x_2 - 0,000443182 x_1x_4 - 0,00194239 x^2_3 - 0,00146759 x^2_4 \dots\dots\dots(II.6)$$

3.2.5. Evaluation de l'effet combiné des quatre facteurs sur la phase de latence (λ) des deux souches

En examinant les diagrammes de Pareto présentant les interactions des quatre facteurs étudiés sur la durée de la phase de latence des deux souches, nous avons constaté que 4 termes linéaires (éthanol, température, NaCl, pH), 2 termes quadratiques [EOH²], [pH²] et 4 interactions [EOH-T], [EOH-pH], [EOH-NaCl], [pH-NaCl] sont significatifs positivement sur le taux de croissance des deux souches (S1 et S3).

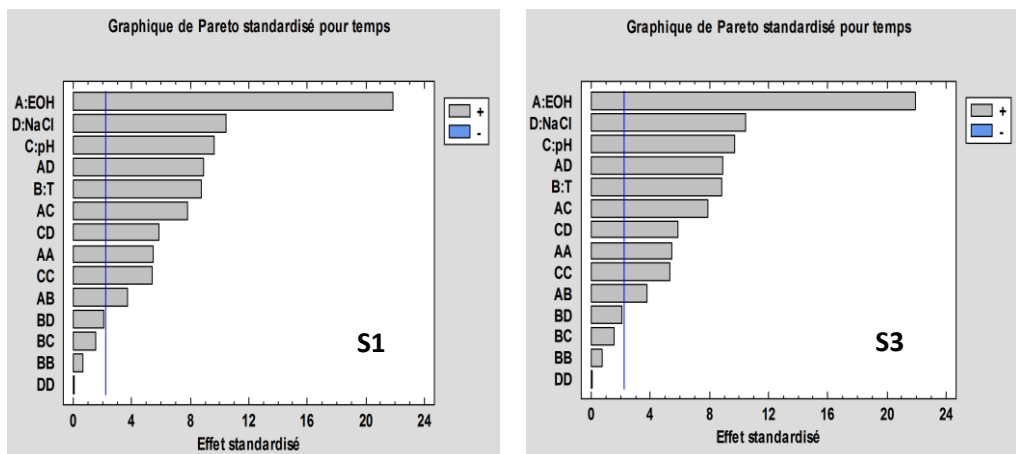


Figure 3.13 : Diagrammes de Pareto pour le temps de latence (λ) de S1 et S3

Tableau 3.9 : Effet des paramètres environnementaux sur la phase de latence (λ).

<i>Facteur</i>	<i>La souche S1</i>				<i>La souche S3</i>			
	<i>Ecart-type</i>	<i>DDL</i>	<i>F</i>	<i>Proba.</i>	<i>Ecart-type</i>	<i>DDL</i>	<i>F</i>	<i>Proba.</i>
A:EOH	2,87927	1	477,07	0,0000	2,86501	1	481,83	0,0000
B:T	2,87927	1	77,11	0,0000	2,86501	1	78,19	0,0000
C:pH	2,87927	1	93,45	0,0000	2,86501	1	94,76	0,0000
D:NaCl	2,87927	1	108,56	0,0000	2,86501	1	109,65	0,0000
AA	7,61782	1	29,63	0,0001	7,58011	1	29,95	0,0001
AB	3,05392	1	13,87	0,0029	3,03881	1	14,01	0,0028
AC	3,05392	1	61,12	0,0000	3,03881	1	61,73	0,0000
AD	3,05392	1	78,89	0,0000	3,03881	1	79,68	0,0000
BB	7,61782	1	0,43	0,5226	7,58011	1	0,52	0,4835
BC	3,05392	1	2,29	0,1558	3,03881	1	2,32	0,1539
BD	3,05392	1	4,36	0,0588	3,03881	1	4,40	0,0578
CC	7,61782	1	28,92	0,0002	7,58011	1	28,52	0,0002
CD	3,05392	1	34,26	0,0001	3,03881	1	34,60	0,0001
DD	7,61782	1	0,00	0,9453	7,58011	1	0,00	0,9466
Erreur totale		12				12		
R²	0,9901				0,9902			

Les valeurs du test F nous révèlent de plus que l'éthanol est le facteur prépondérant parmi ceux étudiés. On peut alors écrire l'influence de ces différents facteurs sur S1 et S3 avec Les modèles polynomiaux simplifiés suivant:

$$\lambda (S1) = 356,388 - 20,7099 x_1 - 2,84727 x_2 - 101,839 x_3 - 20,9884 x_4 + 0,685399 x_1^2 + 0,114899 x_1 x_2 + 1,44697 x_1 x_3 + 1,23295 x_1 x_4 + 9,1037 x_2^2 + 2,97917 x_3 x_4 \dots \dots \dots (II.7)$$

$$\lambda (S3) = 356,496 - 20,714 x_1 - 3,01091 x_2 - 100,85 x_3 - 21,0033 x_4 + 0,685644 x_1^2 + 0,114899 x_1 x_2 + 1,44697 x_1 x_3 + 1,23295 x_1 x_4 + 8,99588 x_2^2 + 2,97917 x_1 x_4 \dots \dots \dots (II.8)$$

La méthode utilisée dans cette étude consiste à déterminer les paramètres de croissance directement à partir de la courbe de croissance. Le coefficient de détermination (R^2) exprime le pourcentage d'explication des valeurs expérimentales par le modèle polynomial.

Au vu des résultats obtenus, nous avons des valeurs de R^2 entre 0,96 et 0,99 pour les différents modèles. Ceci signifie que les modèles polynomiaux identifiés à partir du plan d'expériences permettent de bien prédire les valeurs des variables de réponses dans le domaine exploré et indique les justesses et fiabilité des modèle choisis ($R^2 > 0,9$) [161].

En effet, pour le développement d'une population *Saccharomyces cerevisiae*, l'éthanol et la concentration en NaCl ont un effet très important, l'interaction de ces deux facteurs est également importante. D'autre part, à une concentration critique en éthanol et en NaCl la croissance est complètement inhibée pendant toute la culture ce qui conduit à une diminution de quantité de biomasse formée. L'effet de l'éthanol sur la synthèse de biomasse peut être expliqué par la consommation de substrat pour l'énergie de maintenance, cette énergie est dépensée pour assurer les fonctions de motilité, les régulations ATPasiques pour le maintien du potentiel transmembranaire, les flux de relargage d'excès de substrat [162] [163].

D'autre part, le pH est un facteur prépondérant affectant la densité cellulaire maximale des deux souches. En effet, notre étude a montré que les souches étudiées poussent convenablement à des pH allant de 4,5 à 6; par contre à pH=3 la croissance est complètement inhibée. Concernant les valeurs de la biomasse maximales des deux souches, la souche S1 prend une valeur maximale de ($X_{max} \geq 4,3866$ g/L) et de ($X_{max} \geq 4,7308$ g/L) pour la souche S3 dans une zone optimale des quatre facteurs: $3 \% \leq \text{EOH} \leq 8,5 \%$; $28 \text{ }^\circ\text{C} \leq T \leq 33,3 \text{ }^\circ\text{C}$; $3,71 \leq \text{pH} \leq 4,94$ et $3 \% \leq [\text{NaCl}] \leq 5,66 \%$, de part et d'autre de cette zone, la croissance se ralentit.

Le taux spécifique maximum de croissance des deux souches étudiées est favorisé par un degré alcoolique faible, d'autre part nous avons observé un effet légèrement positif pour le pH. La sensibilité du taux de croissance des deux souches vis-à-vis de la concentration en chlorure de sodium est différente, car la souche S1 montre une meilleure aptitude à la croissance en présence d'une concentration plus importante dans le milieu (5,994 %) par rapport à la souche S3 (4,614 %) qui nécessite un ajustement de ce facteur. L'effet des interactions conjuguées [EOH-T], [T-pH] et [T-NaCl] sur la vitesse de la croissance maximale est quasi nulle.

Ces résultats sont presque valables pour les deux souches. Par contre, les autres interactions sont statistiquement à la limite du seuil de signification et ont un effet moins important que la concentration en éthanol. Le taux de croissance maximum atteint son optimum ($\mu_{\max} = 0,0584 \text{ heures}^{-1}$) pour S1 et ($\mu_{\max} = 0,0538 \text{ heures}^{-1}$) pour S3 à une concentration d'éthanol d'ordre 3% et une température comprise entre [27 °C - 31,5 °C], pH entre [3,71 - 4,88] et concentration en chlorure de sodium entre [3 % - 4,61 %] dans le milieu.

La phase de latence est une phase d'adaptation des cellules de bactéries à leur environnement. Sa durée dépend en premier lieu de la physiologie des souches et leurs aptitudes à s'adapter aux conditions de culture. Le diagramme de Pareto montre que la durée de la phase de latence des deux souches est affectée principalement par les quatre facteurs à la fois (l'éthanol, pH, température et concentration en NaCl), ils ont un effet très significatif (positif) selon le test de **F**.

Une augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu, fait que les deux souches vont être soumises à une variation de l'osmolarité qui va affecter leur métabolisme et leur physiologie entière et conduit à un ralentissement de leur activités cellulaires et par conséquent un ralentissement de leurs aptitudes d'adaptation au milieu. Le temps de latence sera plus long.

Des études sur l'effet de la température d'incubation ont montré qu'une augmentation de ce paramètre favorise la croissance des micro-organismes par l'augmentation de la fluidité de membrane et donc l'augmentation du système de transport des protéines [155]. Par contre, la baisse de température entraîne des modifications physiologiques importantes, tout d'abord une diminution de la fluidité membranaire, une stabilisation des structures secondaires des acides nucléiques, ainsi qu'une diminution de l'efficacité de la réplication, de la transcription et un ralentissement du métabolisme, ce qui va prolonger le temps de latence [164]. On peut en conclure, que ces facteurs augmentent le temps de latence nécessaire au fonctionnement des composés du milieu, à l'utilisation des substrats dans le cytoplasme bactérien et par conséquent un ralentissement du métabolisme, ce qui va prolonger la durée nécessaire à l'adaptation au milieu (λ optimum des deux souches est au voisinage de 199 heures). De plus, les interactions de ces facteurs est également importante.

3.3. La bio-production de l'éthanol à partir de déchets de dattes : Effet de l'incorporation des cendres du noyau de Deglet-Nour sur le rendement

3.3.1. Introduction

Dans le but de produire un additif écologique digne d'être le carburant du futur à partir de trois sirops fermentescibles à base de déchets de dattes, il s'agit de la variété Kentichi, Hamraya et Degla-Beida. Les trois variétés choisies représentent directement, au manque d'eau d'irrigation et à la mauvaise qualité ou l'indisponibilité du pollen.

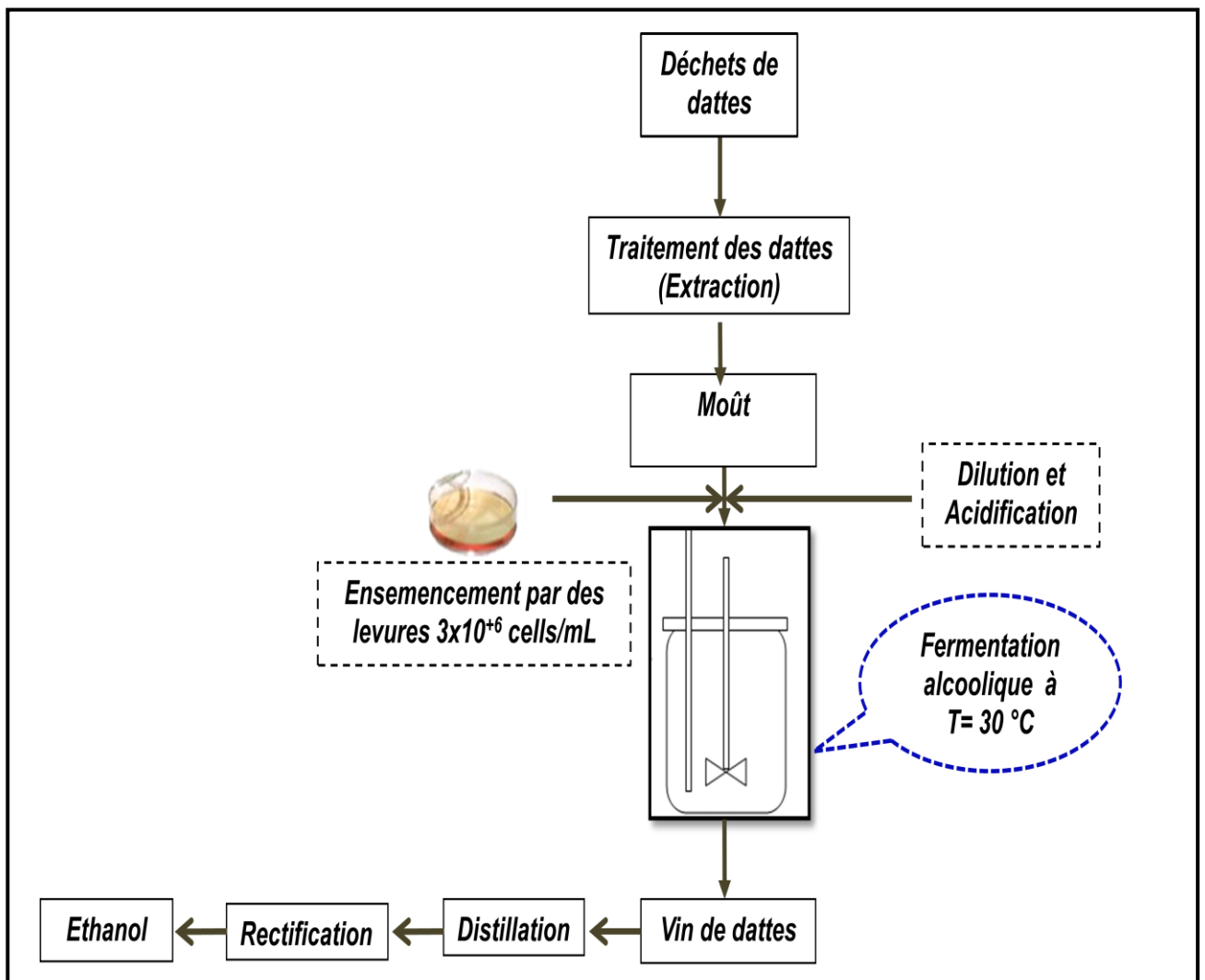


Figure 3.14 : Diagramme de production de l'éthanol

En effet, ces dattes sont riches en sucres (60 à 80 %). Cette richesse pourrait être utilisée en biotechnologie comme substrat de fermentation par les levures pour la production de l'éthanol. Toutefois, les fortes teneurs en sucres induisent une pression osmotique très importante qui peut inhiber l'action de certains

microorganismes [129]. De nombreux auteurs, affirment que le moût de datte est pauvre en azote et en éléments nutritif ce qui limite la biotransformations, l'enrichissement de ce milieu de culture par les éléments minéraux est par conséquent indispensable. L'utilisation des cendres du noyau de Deglet-Nour broyés en poudre très fin aux taux de 0,01 g/L, 0,03 g/L, 0,06 g/L, 0,09 g/L, 1,13 g/L et semble une solution intéressante.

Tableau 3.10: Composition minérale de cendre du noyau de Déglet-Nour.

Eléments minéraux	K	Ca	Mg	P	Na	Zn	Cu	Fe	Mn
<i>teneur (mg/100g de cendre)</i>	125,60	395,19	46,66	183,27	46,65	4,24	8,49	1,85	0,22

Les teneurs en Calcium et en Magnésium du noyau de Deglet-Nour 395,19 g/100g et 46,66 mg/100g respectivement sont supérieures à celles trouvées par Abdul [165], soit 38,8 mg/100g et 51,7 mg/100g pour la même variété. Par contre le potassium présente une teneur de 125,6 mg/100 g, cette valeur est faible que celle rapportée par le même chercheur (soit 229 mg/100g) pour la variété Deglet-Nour.

La cendre de noyau présente une teneur en phosphore d'ordre 183,27 mg/100g. Cette valeur est plus importante que celle rapportée par Platat et al en 2014 [166], soit 2 mg/100g pour la variété Khalas.

La teneur en fer (1,85 mg/100g) est comparable à celles de trouvées pour deux variétés de dattes tunisiennes (Deglet-Nour et Allig) qui sont de 2,3mg/100g et 2,21mg/100g respectivement [167].

Les teneurs en zinc, cuivre et manganèse présentent des valeurs non négligeable soit 4,24 mg/100g, 8,49 mg/100g et 0,22 mg/100g respectivement.

En générale, les résultats obtenus montrent que la composition minérale des cendres du noyau de la variété de datte Deglet-Nour est très intéressante pour enrichis les milieux de cultures à base des moûts de dattes étudiées.

3.3.2. Pouvoir fermentaire de la levure sélectionnée

Durant la fermentation alcoolique, les sucres fermentescibles contenus dans le fruit sont convertis en éthanol et en gaz carbonique par l'action des microorganismes, principalement des levures. Dans cette partie on s'intéresse à l'effet de l'enrichissement des milieux de culture en cendres de noyaux de Deglet-Nour sur le rendement de la bio-production de l'éthanol. Trois paramètres essentiels qui nous renseignent réellement sur l'évolution de la fermentation alcoolique sont l'évolution de la biomasse, l'assimilation des sucres et la production d'alcool.

3.3.2.1. Evolution de la biomasse

Au cours des fermentations dans les conditions expérimentales précisées précédemment, les concentrations en sucres résiduels, en l'éthanol ont été quantifiées (Figure 3.15).

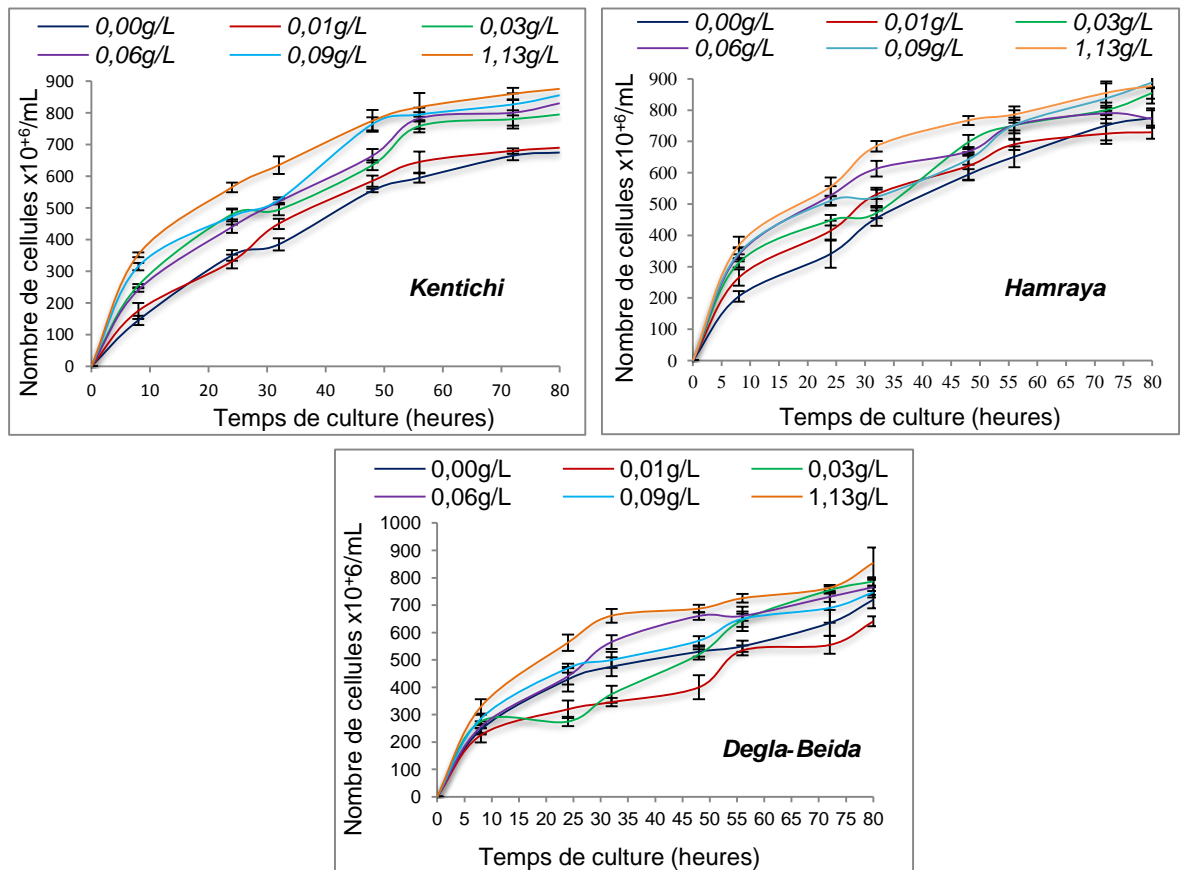


Figure 3.15: Cinétique de la croissance de *S. cerevisiae* sur moûts de dattes.

Les courbes de croissance portées sur la figure (3.15) montrent qu'une augmentation de pourcentage de la matière minérale a un effet positif sur la vitesse de croissance. La fermentation sur sirop à base de dattes nous a permis de définir les différentes phases des courbes de croissance, notons qu'aucune des croissances observées ne présente de phase de latence.

La figure montre aussi que la production de la biomasse augmente au fur et à mesure que la teneur en sucres diminue. Une meilleure production de la biomasse a été observé dans les milieux à base de moûts de Kentichi et Hamraya, elle atteint $6,9 \times 10^8$ cell/mL, $7,95 \times 10^8$ cell/mL, $8,31 \times 10^8$ cell/mL, $8,56 \times 10^8$ cell/mL et $8,76 \times 10^8$ cel/mL pour le milieu à base de Kentichi enrichis avec de 0,01 g/L, 0,03 g/L, 0,06 g/L, 0,09 g/L et 1,13 g/L respectivement.

On constate que l'enrichissement de milieux de culture en concentration croissante de centre de noyaux de dattes rendre la levure plus active. Pour le moût à base de Hamraya une biomasse maximale de $8,89 \times 10^8$ cell/ml et $8,77 \times 10^8$ cell/ml a été enregistré à 0,09 et 1,13 g/l de cendre respectivement. La production la moins importante est enregistrée avec les témoins des trois variétés Kentichi, Hamraya et Degla-Beida $6,75 \times 10^8$ cell/ml, $6,75 \times 10^8$ cell/ml et $6,2 \times 10^8$ cell/ml respectivement

3.3.2.2. Production de bioéthanol et l'assimilation des sucres totaux

Les résultats concernant l'évolution de la concentration de bioéthanol des trois variétés étudiées sont présentés dans la figure (3.16).

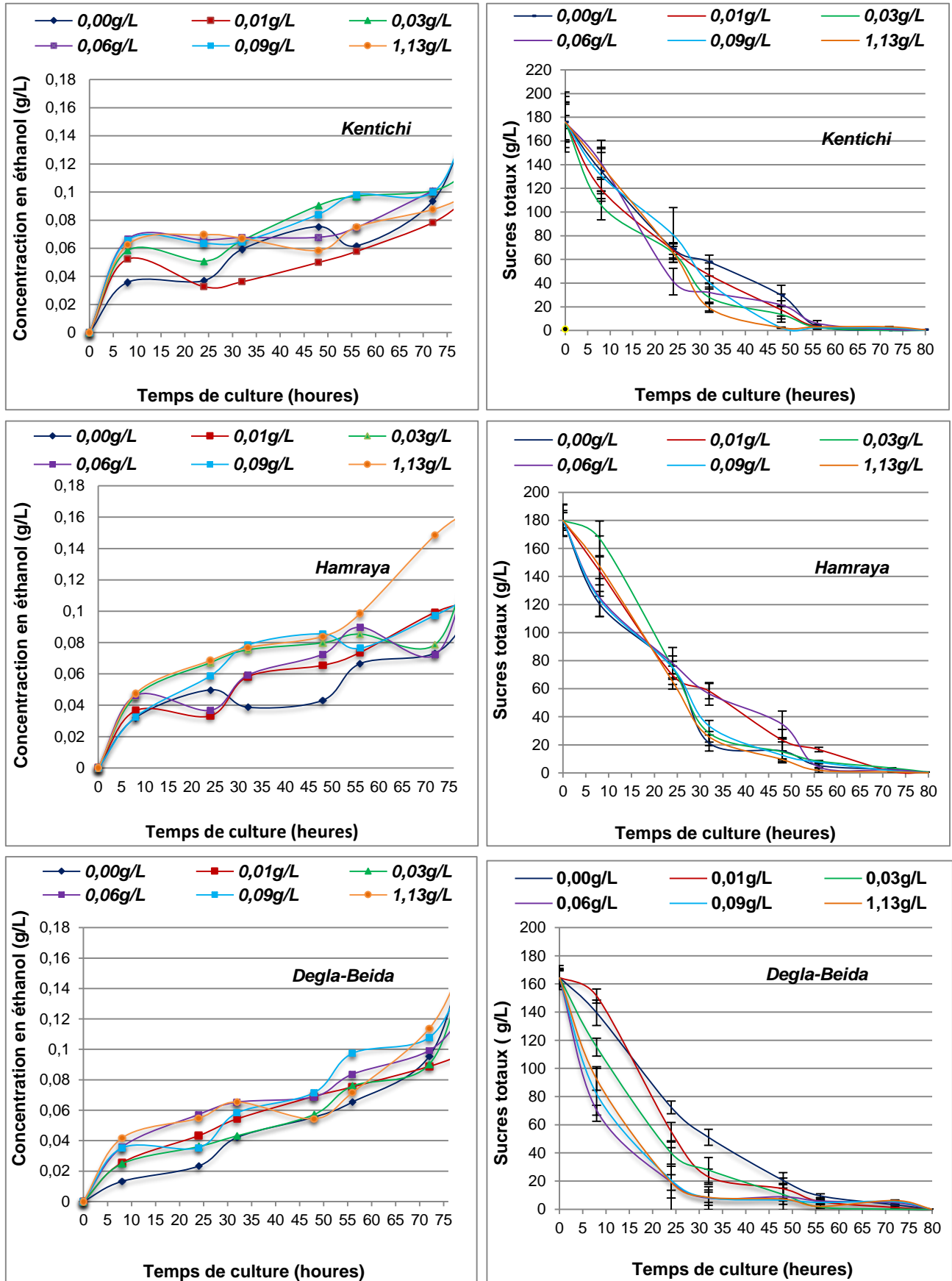


Figure 3.16: Concentration de l'éthanol en fonction de temps de fermentation

On n'observe que la concentration finale en bioéthanol se diffère selon le pourcentage des cendres incorporé dans le milieu de culture. Le processus microbien fait intervenir la consommation de substrat et la formation de biomasse et du produit ainsi qu'un dégagement de chaleur. La concentration de glucose démunie de façon rapide au cours de 24 heures, les courbes d'assimilation des sucres totaux ont une allure décroissante comme le montre la figure (3.16), suivi par augmentation de la concentration de bioéthanol. La consommation des sucres totaux dans les cinq lots de milieux enrichis (0,01 g/L, 0,03 g/L, 0,06 g/L, 0,09 g/L et 1,13 g/L) est supérieure à celle du lot témoin. Donc, l'enrichissement des lots par les cendres accélère la vitesse des réactions de façon appréciable. Après 72 heures de fermentation, une importante dégradation des sucres totaux est révélée. Concernant la teneur en alcool obtenue au cours des différentes lots de milieux enrichis est importante et elle varie selon la nature de la variété d'un part, d'autre part selon la concentration ajoutée.

D'après la figure (3.16), la production d'alcool augmente durant les dernières 48 heures de la fermentation. L'évolution de la concentration de l'alcool, montre que la cinétique de croissance et de production d'alcool pour une concentration de 1,13 g/L est meilleure pour les trois variétés étudiées. Le moût issu de la variété Kentichi enrichi par l'urée à raison de 2,4 g/L et par 1,13 g/L de minéraux a permis de donner un volume de l'éthanol de 1610 mL/Kg (98,14 %), suivie par Hamraya et Degla Beida à raison de 1340,21 et 921,42 mL/Kg respectivement. Par contre le moût issu de kentichi non enrichi a donné un volume d'éthanol de 685 mL/Kg.

3.3.3. Purification du bioéthanol

A la fin de la fermentation, nous serons en présence d'un vin de dattes qu'il faut distiller et rectifier pour pouvoir extraire l'éthanol. La production du bioéthanol par la fermentation alcoolique du moût de datte filtré, produit des mélanges eau-éthanol. Pour une utilisation comme carburant, l'éthanol doit être purifié. La distillation fractionnée est la méthode de la vérification de la pureté de notre bioéthanol. C'est l'opération de séparation de l'alcool, de l'eau et des impuretés, dans une colonne de distillation à une température de l'ordre de 79 °C.

Elle permet de concentrer l'éthanol et conduit à un alcool brut ou flegme. La rectification de l'alcool brut nécessite une deuxième distillation de l'ordre de 78°C. Pour obtenir de l'éthanol plus pur, il faut déshydrater en utilisant un desséchant, tels que le tamis moléculaire 3 Å (taille des pores) avec une formule chimique $Al_{12}K_{12}O_{48}Si_{12}.xH_2O$ et de 2 mm diamètre particule, les micropores du tamis moléculaire réabsorbant l'eau jusqu'à des concentrations très faibles.

Le tableau (3.11) résume les résultats de la Biomasse maximale, taux des Sucres consommés, Volume en éthanol après la 2^{ème} distillation fractionnée après le processus de la fermentation alcoolique de 1 Kg de chaque variété de dattes étudiées.

Tableau 3.11: Biomasse maximale, Sucres consommés, Volume en éthanol après la 2^{ème} distillation fractionnée pour les trois variétés de dattes étudiées.

Milieu à base de sirop de Kentichi avec une concentration initiale des sucres totaux = 176g/L						
Concentration en cendre	0,00g/L	0,01g/L	0,03g/L	0,06g/L	0,09g/L	1,13g/L
Biomasse maximale (cell/mL) x 10 ⁶	675	690	795	831	856	876
Sucres totaux consommés (g/L)	175,4	175,5	175,6	175,6	175,4	175,8
Volume final en éthanol (mL/Kg)	685,0	865,19	1022,96	1160	1442,72	1610
Indice de réfraction a 20°C (n _D ²⁰)	1,3653	1,3610	1,3602	1,3556	1,3631	1,3604
Milieu à base de sirop de Hamraya avec une concentration initiale des sucres totaux = 180g/L						
Concentration en cendre	0,00g/L	0,01g/L	0,03g/L	0,06g/L	0,09g/L	1,13g/L
Biomasse maximale (cell/mL) x 10 ⁶	675	729,52	855	772	889	877
Sucres totaux consommés (g/L)	179,7	179,5	179,5	180	180	180
Volume final en éthanol (mL/Kg)	860,43	860,61	960,66	1180,50	1260,75	1340,21
Indice de réfraction a 20°C (n _D ²⁰)	1,3657	1,3631	1,3566	1,3629	1,3648	1,3645
Milieu à base de sirop de Degla-Beida avec une concentration initiale des sucres totaux = 164,6g/L						
Concentration en cendre	0,00g/L	0,01g/L	0,03g/L	0,06g/L	0,09g/L	1,13g/L
Biomasse maximale (cell/mL) x 10 ⁶	620	641	787	765	747	854
Sucres totaux consommés (g/L)	164,56	164,56	164,56	164,56	164,56	164,56
Volume final en éthanol (mL/Kg)	780,87	840,17	878,57	880,11	835,78	921,42
Indice de réfraction a 20°C (n _D ²⁰)	1,3656	1,3655	1,3641	1,3656	1,3641	1,3610

La figure (3.17) présente le changement de couleur de moût extrait à base de la variété Hamraya

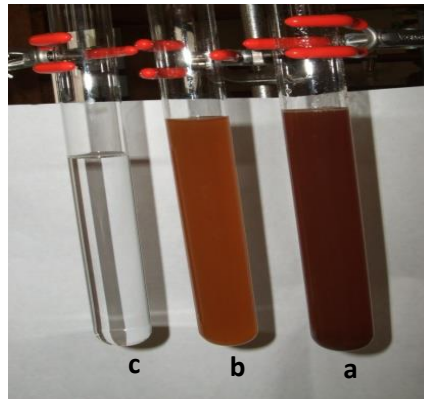


Figure 3.17: Changement de couleur du moût de Hamraya: (a) moût de datte avant la fermentation; (b) moût de datte après 3 jours de fermentation; (c) bioéthanol purifié.

3.3.4. Résultats de l'analyse de produit obtenu

3.3.4.1. Le pourcentage d'éthanol: L'éthanol obtenu après la 2^{ème} distillation fractionnée est d'un pourcentage d'éthanol 98,137% en volume donc notre bioéthanol est conforme aux normes (Ethanol absolu=.98%).

3.3.4.2. L'indice de réfraction: Notre produit fini présente un indice de réfraction à 20°C égale à 1,3648, cette valeur est plus proche à celle de la valeur standard de l'éthanol absolu commercial (1,3629).

3.3.4.3. L'inflammabilité: Le bioéthanol obtenu par fermentation des dattes et facilement inflammable.

3.3.4.4. Température d'ébullition: Le bioéthanol obtenu a une Température d'ébullition égale à 78,0°C, celle d'éthanol absolu commercial égale à 77,2°C

3.3.4.5. Densité : Elle est d'ordre 0,7932 à température ambiante, celle d'éthanol absolu commercial égale à 0,7906 à la même température.

3.3.4.6. Analyse Infra rouge de bioéthanol obtenu

Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTf) est une technique d'analyse utilisée dans le but de vérifier la pureté de bioéthanol obtenu.

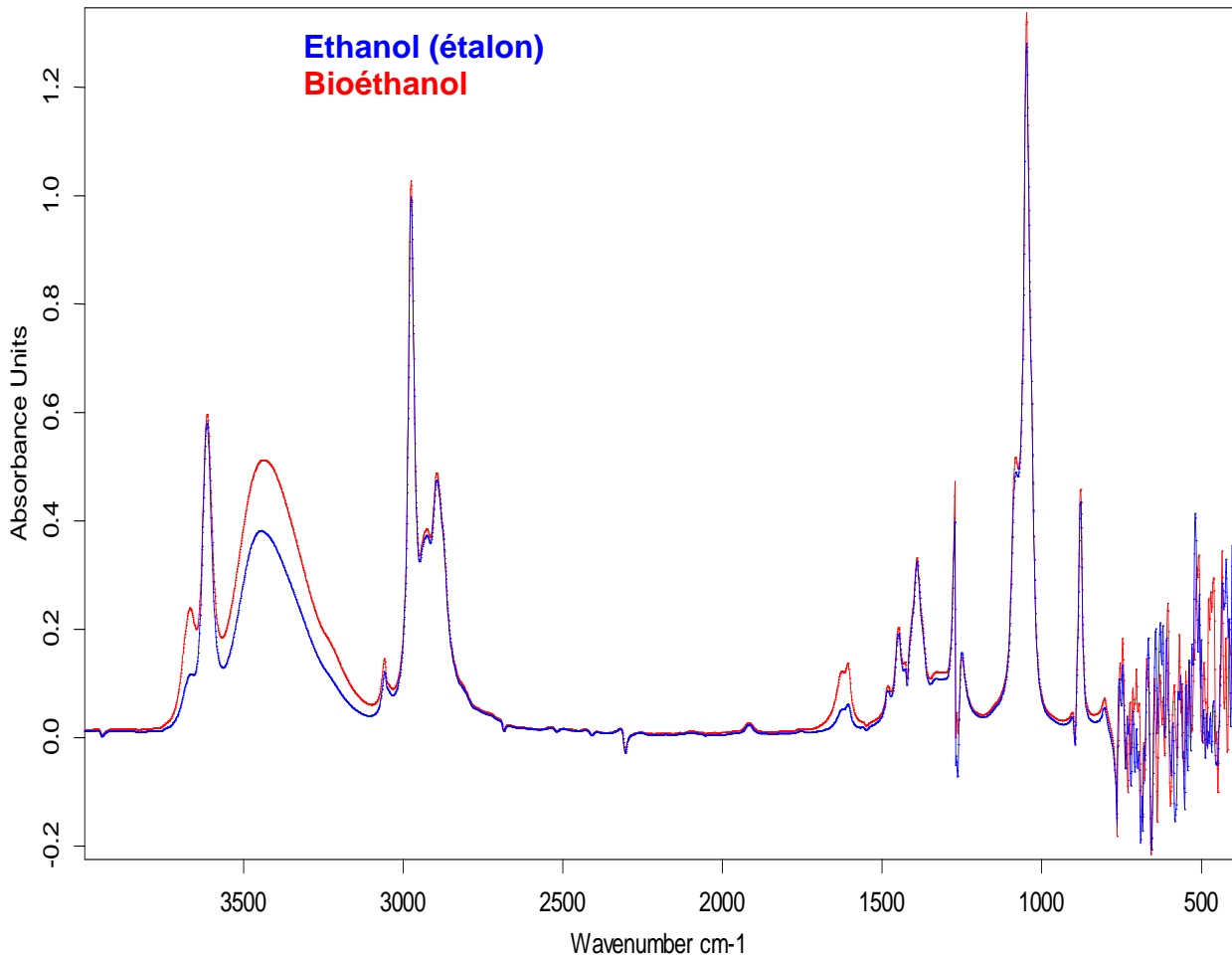


Figure 3.18: Comparaison entre les spectres de l'éthanol (étalon) et le bioéthanol produite.

L'allure des spectres de l'éthanol étalon et le bioéthanol dilués dans le dichlorométhane est identique dans le domaine spectral compris entre 4 000 et 400 cm^{-1} ce qui indique qu'il s'agit d'un même produit.

- On constate que les deux spectres montrent une bande moyenne à 3615 cm^{-1} qui représente l'élongation du groupement O—H (libre).
- Ils présentent également une bande large entre 3560 et 3150 cm^{-1} correspondante à l'élongation de la liaison O—H liée (en solution diluée) ou le bioéthanol montre une intensité un peu plus élevée par rapport à l'éthanol

étalon du probablement à l'humidité présente dans le premier, confirmé par l'apparition d'un pic faible à 1605 cm^{-1} .

- Les pics intense et moyen à 2975 et 2895 cm^{-1} sont caractéristiques à l'élongation C—H des groupes CH_3 et CH_2 , respectivement, alors que le pic moyen à 1380 cm^{-1} représente la déformation de la liaison C—H des mêmes groupements.
- Enfin, nous constatons que les intensités de l'absorbance au niveau de la bande spécifique à 1047 cm^{-1} correspondante à l'élongation de la liaison C—O d'un alcool primaire, sont presque égales ce qui permet de confirmer que le bioéthanol est bien apte à se substitué à l'éthanol absolu pour les différentes applications.

CONCLUSION GENERALE

Le présent travail a montré que la valorisation des sous-produits de dattes, en vue de leur transformation en éthanol est possible. Dans un premier temps, et afin de pouvoir bien exploiter les sous-produits de dattes, nous avons isolé six souches du type *Saccharomyces cerevisiae* à partir de six variétés de rebuts de dattes. Le moût de datte obtenu par concentration est caractérisé par une teneur élevée en sucres fermentescibles (glucose, fructose et saccharose), il constitue un environnement favorable pour le développement des levures, mais leur pauvreté en matières azotées est un facteur limitant. En ce sens, les noyaux de Deglet-Nour sont utilisés sous forme des cendres comme une source minérale et nutritive pour enrichir les milieux de culture à base de moût de dattes.

Les tests de résistance des levures isolées à éthanol, montre que l'effet de ce dernier sur la croissance des levures n'est pas le même, il existe une variabilité importante entre elles d'un point de vue cinétique. Pour les six souches testées, nous avons distingué que plus la concentration en éthanol augmente, plus la résistance des souches à l'éthanol augmente. Les souches testées n'ont pas la même sensibilité à l'éthanol et dans nos conditions seulement deux sur six se développent encore à 18% (v/v) d'éthanol. On conclut que les deux souches S1 et S3 sont les plus productives pour différents teneurs en éthanol par rapport aux autres.

L'étude de l'optimisation de la croissance de deux souches de type *Saccharomyces cerevisiae* S1 et S3, réalisée dans une gamme de conditions de stress environnementales potentiellement agressives, a permis de mettre en évidence l'effet linéaire des quatre facteurs physicochimiques (concentration en éthanol, pH, température et concentration en NaCl) et de modéliser les effets des interactions conjuguées sur la croissance, plus particulièrement les paramètres cinétiques de croissance (biomasse maximale, taux de croissance maximum et le temps de latence).

Les paramètres de croissance ont été déterminés directement à partir de la courbe de croissance et les effets des facteurs physico-chimiques sur toutes les réponses étudiées ont été évalués au moyen des diagrammes de Pareto et son tableau de valeurs associées, ce qui permet de visualiser clairement l'influence de chacun des paramètres sur la variable de réponse. A la fin le modèle mathématique correspondant est établi après un calcul matriciel.

Les résultats obtenus, pour chaque essai du plan d'expérience exécuté, nous ont montré que l'effet linéaire direct de la variable **concentration en éthanol** [EOH] est le plus important parmi ceux étudiés. Des concentrations critiques de ce facteur diminuent la densité cellulaire finale et affectent négativement le taux de croissance spécifique, son maximum a été détecté au voisinage de 12% (v/v), ce qui provoque par la suite une augmentation dans la durée de l'adaptation des deux souches. Le taux de croissance de *S1* et *S3* est affecté aussi par l'interaction significative conjuguée [EOH-NaCl]. Il semble y avoir un effet significatif (négatif) du pH du milieu et une interaction conjuguée [EOH-pH] significative (positif) qui se manifestent de façon similaire sur le taux de croissance de *S1*, contrairement à ce qui avait été observé pour la souche *S3*. Ces effets sont à la limite du seuil de signification et ont donc un poids beaucoup moins important. D'autre part, les diagrammes de Pareto montrent une meilleure aptitude de la croissance de la souche *S1* par rapport à la souche *S3*.

La production d'éthanol en présence de la souche *S1* et l'enrichissement du milieu fermentescible par l'urée à raison de 2,4 g/L et par les cendres du noyau de Deglet-Nour a rendu le processus de la fermentation plus rentable. La caractérisation physico-chimique des dattes montre que le moût issu des trois variétés de dattes est riche en sucres, ce qui constitue un substrat favorable à la multiplication des levures. Par ailleurs, le taux des protéines et la teneur en cendre semblent faibles ne pouvant pas couvrir les besoins de la levure et sont inférieurs à la valeur citée par les auteurs. Cependant, le milieu de culture est supplémenté par l'urée et par les éléments minéraux pour assurer un métabolisme optimal.

En ce sens, les noyaux de Deglet-Nour sont utilisés sous forme des cendres pour l'enrichissement des moûts en minéraux, la caractérisation des cendres montre que les teneurs en Potassium, Calcium, Magnésium, Phosphore, Sodium, Zinc, Cuivre, Fer et en Manganèse dans 100 g de cendre sont de l'ordre de 125,60 mg, 395,19 mg, 46,66 mg, 183,27 mg, 46,65 mg, 4,24 mg, 8,49 mg, 1,85 mg et 0,22 mg respectivement.

A la lumière de ces résultats, nous avons réalisé des essais de fermentation alcoolique menés dans un milieu de culture à base de sirop de datte enrichis par les cendres du noyau de Deglet-Nour.

Les résultats obtenus montrent qu'une meilleure production en biomasse a été observée dans les milieux à base de deux moûts Kentichi et Hamraya. Le dénombrement cellulaire augmente lorsque la concentration en sels minéraux augmente. Parallèlement, le moût à base de Hamraya soit une biomasse maximale de $8,89 \times 10^8$ cell/mL et $8,77 \times 10^8$ cell/mL a été enregistré à 0,09 g/L et 1,13g/L de cendre respectivement. L'utilisation des cendres du noyau de Deglet-Nour comme une source minérale rend la levure plus active. L'évolution de la concentration de l'alcool, montre que la cinétique de croissance et de production d'alcool pour une concentration de 1,13 g/L est meilleure pour la variété Kentichi soit 1610 mL/Kg d'éthanol avec un taux de pureté de 98,14%, suivie par Hamraya et Degla Beida à raison de 1340,21 et 921,42 mL/Kg respectivement.

A la fin, la comparaison entre les propriétés physico-chimiques de l'éthanol et de bioéthanol produite est presque semblable, ce qui permet de confirmer que le bioéthanol est bien apte à se substituer à l'éthanol absolu pour les différentes applications.

Afin de compléter la présente étude, les points suivants nous semblent très pertinents:

1. L'utilisation des deux souches du genre *Saccharomyces cerevisiae* (S1 et S3) comme levure boulangère par les levurerries et comme complément alimentaire.
2. Etude de valorisation des déchets de la récolte ainsi que les produits secondaires du procédé (noyaux, fibres...)

3. La mise en œuvre d'une industrie de transformation des sous-produits de dattes par des procédés biotechnologiques simples répondrait parfaitement aux besoins socio-économiques du pays.
4. Contribution des régions phoenicoles dans la filière de la production de bioéthanol et participer en même temps au développement de l'économie nationale.
5. La production du bioéthanol à partir des sous-produits des dattes permettra :
 - L'activation des ressources humaines travaillant dans ce secteur, économique et social.
 - Le développement d'un vaste réseau de distribution d'énergie liquide.
 - L'exportation et la vente de quantités supplémentaires de produits raffinés.
 - Fournir un revenu économique national supplémentaire à la région.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Générés par ce travail

Liste de publications

- Chibi S., El Hadi D., The isolation and characterization of yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* cultivated on musts of common dates: Physiological studies of the adaptation and the resistance to ethanol, *Algerian J. Env. Sc. Technology*, 5:2 (2019) -.
- Chibi S., El Hadi D., *La Bio-production de L'éthanol à Partir de Déchets de Dattes : Effet de l'incorporation des Cendres du Noyau de Deglet-Nour sur Le Rendement*, *Revue Agrobiologia* 8:1 (2018) 685-694.
- Chibi S., Rabet S., El-Hadi D., *Etude des Paramètres Environnementaux sur la Croissance de "Saccharomyces Cerevisiae" Isolée de Rebut de Dattes*, *Algerian J. Env. Sc. Technology*, 2:3 (2016) 62-69

Communications Internationales et Nationales

- *The second international symposium medicinal plants and materials (mpm-2019) organized in Tozeur (Tunisia) on february 15 to 17, 2019, oral communication entitled: Optimisation et modélisation des Paramètres culturaux sur la Croissance de "Saccharomyces Cerevisiae" Isolée de Rebut de Datte.*
- *The second international symposium medicinal plants and materials (mpm-2019) organized in Tozeur (Tunisia) on february 15 to 17, 2019, poster communication entitled: isolation and characterization of yeast strains Saccharomyces Cerevisiae cultivated on musts of common dates: physiological studies of the adaptation and the resistance to ethanol.*
- *5^{ème} Workshope International sur les Stress Environnementaux et la Conduite des Cultures (WISECC 5) organisé par le laboratoire de Biotechnologie des Production Végétales (LBPV), Faculté des Sciences de la Nature et de Vie, le 12 et 13 Décembre 2018, une communication affichée intitulée : Etude i vitro de l'effet des paramètres culturaux sur la croissance de Sacharomyes cerevisiae isolé de rebut de datte.*
- *Journées Scientifiques sur les Sciences et l'Engineering (JSSE'18), ENP-*

Constantine, Décembre 09-10, 2018, une communication Orale, intitulée : Etude physiologique de l'adaptation et de la résistance des souches du genre *Saccharomyces cerevisiae* à l'éthanol.

- Des Deuxièmes Journées sur l'Agroalimentaire FSNV Blida-1, les 27-28 Novembre 2018, une communication affichée intitulée : *Valorisation des Rebut de Dattes par la Bio-Production de l'Ethanol: Effet de l'Incorporation des Cendres du Noyau de Deglet–Nour sur le Rendement*.
- 1^{er} séminaire National de Génie des Procédés (SNGP 2018), université Saad Dahlab Blida-1, les 07-08 novembre 2018, une communication affichée intitulée: Optimisation et Modélisation des Paramètres Environnementaux sur la Croissance de *Saccharomyces Cerevisiae* Isolée de Rebut de Datte.
- 9^{ème} Congrès National de la Société Algérienne de Chimie du 08 au 10 Mai 2018 (SAC'2018) à l'USTHB, une Communication Orale, intitulée : Isolement et Caractérisation de Souches Levuriennes *Saccharomyces cerevisiae* Résistantes à la Concertation Initiale en Ethanol Cultivé e sur Moût de Rebut de Dattes.
- 3^{ème} journée Scientifique sur le Génie des Procédés (JSGP3-2012), université Saad Dahlab Blida-1, le 19 Novembre 2012, une communication orale intitulée : *Extraction et caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile de noyaux de dattes de trois variétés « Tantboucht, H'chef et Kentichi »*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Al-Hooti, S., Sidhu, J.S., Al Saqer, J.M., Al-Othman, A., "Chemical composition and quality of date syrup as affected by pectinase/cellulase enzyme treatment", *Food Chemistry*, 79, (2002), 215-220.
- [2] Benziouche, SE., Cheriet, F., "Structure and constraints of the date chain in Algeria", *New Mediat, A Mediterranean Journal of Economics, Agriculture and Environment*, n° 4, Q 17, F 14, (2012), 49-51.
- [3] Ould. H.D.M., "Etude comparative de la productivité d'alcool brut de dattes selon les variétés", *Recherche Agronomique*, n° 9, INRA-Alger, (2001) pp. 91-99.
- [4] Ogier J.C., Bellerini D., Leygue J.P., Rigal L., Pourquoié J., "Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique", *Oil & Gas Science and Technology- Revue de l'IFP*, V.1, n° 54, (1999), 67-94.
- [5] Touzi A., "production d'éthanol à partir des déchets de dattes", *Rev. Rech. Agro*, (1997), 1, 53-58.
- [6] F. Lecheb, S. Benamara, H. Gougam, Valorisation de l'huile du noyau de dattes, Editions universitaires europeennes EUE, (2011), p 192.
- [7] Baliga, M.S., Baliga, B.V., Kandathil, S.M., Bhat, H.P., Vayalil, P.K, "A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera* L.)", *Food Chemistry International*, FRIN, 03245, (2010), 11p.
- [8] Patle, S., Lal, B., "*Investigation of the Potential of Agro-Industrial Material as Low Cost Substrate for Ethanol Production by Using Candida Tropicalis and Zymomonas Mobilis*", *Biomass and Bioenergy*, V. 32, n°7, (2008), 596 – 602.
- [9] Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M., "*Ethanol Fermentation Technologies From Sugar and Starch Feedstocks*", *Biotechnology Advances*, V. 26, n°1, (2008), 89-105.
- [10] Ma, M., Liu, Z.L., "*Mechanisms of Ethanol Tolerance in Saccharomyces cerevisiae*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 87, n°3, (2010), 829-845.
- [11] Stanley, D., Fraser, S., Chambers, P.J., Rogers, P., Stanley, G.A., "*Generation and Characterization of Stable Ethanol-Tolerant Mutants Of Saccharomyces Cerevisiae*", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, V. 37, n°2, (2010), 139 - 149.
- [12] Munier, P., "Le palmier dattier", G-P Maisonneuve et Larose, Paris, ISBN 2-7068-0563-3, (1973), 141- 150.
- [13] Riedacker, A., Dreyer, E., Pafadnam, C., Joly, H., Bory, G., "Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides", *Seminaire*, Paris, FRA (1990-03-02) Nancy, Paris, FRA (1990-03-20), FRA : John Libbey, (1991). <http://prodinra.inra.fr/record/100671>.
- [14] Djerbi M., "Précise de phoeniculture", FAO, Rome, (1994), 191p
- [15] Espiard, E., "Introduction à la transformation industrielle des fruits", Ed Tech et la voisier, (2002), 147-155.
- [16] Boufis, N., Khelifi-Slaoui, M., Djillali, Z, Zaoui, D., Morsli, A., Bernards, M.A., Makhzum., Khelifi. L., "Effects of growth regulators and types of culture media on somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida)", *Scientia Horticulturae*, 172, (2014), 135-142.
- [17] STAT, (2014), Disponible sur le site : <http://www.faostat.fao.org/>.
- [18] SIDAB, Salon International de la Datte de Biskra, (2015). www.sidab.caci.dz

- [19] Dowson et Aten, "Composition et maturation, récolte et conditionnement des dattes", collection F.A.O. Rome, (1963), 397p.
- [20] Booi, I. et al., "Etude de la composition chimique des dattes à différents stades de maturité pour la caractérisation végétal de divers cultivars de palmier dattier (*Phoenix Dactylifera L.*)", V. 45, n°6, (1992).
- [21] Hussein F., El kahtani M., Waliy., "La culture du palmier dattier et la production de dattes dans le monde arabe et islamique. Imprimerie", Ain chamss, (1979), 576p.
- [22] Dubost, D., "Ecologie, aménagement et développement agricole des Oasis Algérienne", thèse doctorat en géographie et aménagement de monde arabe ; E. F. R d'aménagement, (1991).
- [23] Elleuch, M., Besbes, S., Roiseaux, O., Blecker, C., Deroanne, C., Drira, N., and Attia, H., "Date flesh: Chemical composition and characteristics of the dietary fibre", *FoodChemistry*, 111, (2008), 676-682.
- [24] Elarem, A.G., Flamini, G., Emna, B.S., Issaoui, M., Zeyene, N., Ferchichi, A., Hammami, M., Helal Ahmed, N., Achour, L., "Chemical and aroma volatile compositions of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) fruits at three maturation stages", *FoodChemistry*, 127, (2011), 1744-1754.
- [25] Abou-Zeid, A.A., Baeshin, N.A., Baghla, A.O. 1991. The formation of oxytetracycline in a date-coat medium. *Bioresource Technology*, 37, 179-84.
- [26] Sawaya, W. N., Khatchadourian, H., Khalil, J., "Growth and chemical characterization of three Saudi date cultivars at various stages of development", *Can. inst. Food Sci. Technol*, 16, (1982), 87-91.
- [27] Ahmed, I.A., Ahmed, A.K., Robinson, R.K., "Chemical composition of date varieties as influenced by the stage of ripening". *Food Chemistry*, 54, (1995), 305-309
- [28] Reynes, M., Bouabidi, H., Piombo, G., Risterucci, A.M., "Caractérisation des principales variétés des dattes cultivées dans la région du Djerid en Tunisie", *Fruits*, v.4, n°49, (1994), 289-298.
- [29] Bouabidi, H., Reynes, M., Rouissi, M., "Critères de caractérisation de quelques cultivars des palmiers dattiers (*Phoenix dactylifera L.*) du sud tunisien", *Annale De l'INRAT*, 69, (1996), 73-87.
- [30] Mrabet, A., Ferchihci, A., Chaira, N., Ben Salah, M., Baaziz, M., Penny, "Physico-chemical characteristics and total quality of date palm varieties grown in the southern of Tunisia", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, V.11, n°7, (2008), 1003-1008.
- [31] Buelguedj, M., "Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud-Est Algérien", *INRAA El-Harrach, Alger*, n°11, (2001), 289p.
- [32] Hannachi S., Khitri D., Benkhalifa A. et Brac de Perrière R.A., "Inventaire variétal de la palmeraie algérienne" Ed. Anep. Rouiba, Alger, (1998), 225p.
- [33] Dakhia N., M.K. Bensallah, M. Romani, AM. Djoudi et M. Belhamra, "Etat phytosanitaire et diversité variétale du palmier dattier au bas Sahara – Algérie", *journal Algérien des Régions Arides*, n° Spécial, (2013)
- [34] El-Sharnouby, G.A., Al-Eid, S.M., Al-Otaibi, M.M., "Utilisation of enzymes in the production of liquid sugar dates", *African Journal of Biochemistry Research*, V.3, n°3, (2009), 41-47.
- [35] Mostafa, Y.S., Alumri, S.A., "Optimization of date syrup for enhancement of the production of cidric acid using immobilized cells of *Aspergillus niger*", *Saudi Journal of Biological sciences*, V.19, n°2, (2012), 241-246.
- [36] Mahjoub, A, Jraidi, Z., "Elaboration d'une boisson gazeuse et d'une confiture

- aromatisée à partir de deux variétés de dattes", *INAT*, 7, (1992), 37- 44.
- [37] Espiard E., "Introduction à la transformation industrielle des fruits", Ed. Tech et Doc. Lavoisier, Paris, (2002), 147-155.
- [38] Estanove, P., "Note technique: Valorisation de la datte, Option Méditerranéennes. Les systèmes Agricoles Oasiens", Ed IRFA-CIRAD, France, Série A, n°11, (1990).
- [39] Besbes, S., Cheikh Rouhou, S., Blecker, C., Lognay, G., Drira, N.E., "Voies de valorisation de sous-produits de dates: valorisation de la pulpe", *Microbiologie Hygiène Alimentaire*, 8, (2006), 3 - 7.
- [40] Salah, R.B., Jaouadi, B., Bouaziz, A., Chaari, K., Blecker, C., Derrouane, C., Attia, H., Besbes, S. "Fermentation of date palm juice by curdlan gum production from *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466™: purification, rheological and physico-chemical characterization", *LWT–Food Science and Technology*, 44, (2011), 1026–1034.
- [41] Elsanhoty, R.M., Al-Turki, I.A., Ramadan, M.F., "Screening of medium Components by Plackett–Burman design for carotenoid production using date (*Phoenix dactylifera*) wastes", *Industrial Crops and Products*, 36, (2012), 313-320.
- [42] Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., Voß, I., Steinbüchel, A., "Optimization of cell growth and poly (3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain", *Biotechnology Letters*, 23, (2001), 1119-1123.
- [43] Davati, N., Hamidi, E.Z., Shoja A.S., "A study on producing possibility of amino acids from date palm wastes by two mutant *Corynebacterium glutamicum* cect690 & cect77. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 4, (2007), 55–64.
- [44] Tavakkoli, M., Hamidi-Esfahani, Z., Azizi, M.H., "Optimization of *Corynebacterium glutamicum* glutamic acid production by response surface methodology", *Food Bioprocess Technoogy*, 5, (2012), 92–99.
- [45] Radwan, H.H., Alanazi, F.K., Taha, E.I., Dardir, H.A., Moussa, I.M., Alsarra, I.A., "Development of a new medium containing date syrup for production of bleomycin by *Streptomyces mobaraensis* ATCC 15003 using response surface methodology", *African Journal of Biotechnology*, 9, (2010), 5450–5459.
- [46] Khan, J.A., Abulnaja, K.O., Kumosani, T.A., Abou-Zeid, A.A., "Utilization of Saudi dates sugars in production of baker's yeast", *Bioresource Technology*, 53, (1995), 63-66.
- [47] Qureshi, N., Ezeji, T.C., "Butanol, a superior biofuel production from agricultural residues (renewable biomass): Recent progress in technology", *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, V.2, n°4, (2008), 319-330.
- [48] Bari, M.R., Alizadeh, M., Farbeh, F., "Optimizing endopectinase production from date pomace by *Aspergillus niger* PC5 using response surface methodology", *Food Bioproducts Processing*, 88, (2010), 67-72.
- [49] Acourene, S., Ammouche, A., "Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, (2012), 759–766.
- [50] Abd-Alla, M.H., Morsy, F.M., El-Enany, A.W.E., "Hydrogen production from rotten dates by sequential three stages fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, (2011), 13518-13527.
- [51] Gupta, N., Kushwaha, H., "Date palm as a source of bioethanol producing

- microorganisms", Springer; Netherlands, (2011), 711-727.
- [52] Louhichi, B., Belgaib, J., Benamor, H., Hajji, N., "Production of bioethanol from three varieties of dates", *Renawable Energy*, 51, (2013), 170-174.
- [53] Abd-Alla, M.H., El-Enany, A.W.E., "Production of acetone–butanol–ethanol from spoilage date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits by mixed culture of *Clostridiumacetobutylicum* and *Bacillus subtilis*", *Biomass and Bioenergy*, 42, (2012), 172-178.
- [54] Pasty J.C., "Les débouchés non alimentaires des produits agricoles : un enjeu pour la France et l'union européenne", *Avis et rapports du conseil economical n° 2004*, (2004), 1-201.
- [55] Poitrat E., "Technique de l'ingénieur ", BE 8550 (biocarburants)
- [56] Demirbas, A., Fatih Demirbas, F., Algae, M., "Energy: Algae as a New Source of Biodiesel", London: Springer, (2010), 29-47.
- [57] Perréon-Delamette, "De l'or noir à l'or vert ? L'avenir industriel des bioproduits", *Dossier de presse de l'ADEME*, (2004).
<http://www.chanvre-info.ch/info/en/article2479.html>.
- [58] Berg, C., "Aquantitative analysis. In World Ethanol 2003 Conference", London, UK, November 5-7, ed, Lichts ; F.O. (London) Ltd, (2003).
- [59] Agores, "Biofuels-Market Barriers", page d'accueil de Agores, (2001). [http : www.europa.eu.int/en/comm/dgA/atlas/html/biodbarr.html](http://www.europa.eu.int/en/comm/dgA/atlas/html/biodbarr.html).
- [60] Oestling, A., "Carburant additionné de bioéthanol Stoa-Evaluation des choix scientifiques et technologiques", *Note d'information*, n°7, (2001).
<http://www.europarl.eu.int/stoa/publi/pdf>.
- [61] Gnansounou, E., "Les filières de production de bioéthanol", (2001).
<http://lasen.epfl/page40003.html>.
- [62] Brennen, A.H., Hoagland W., Schell D.J., "High Temperature Acid Hydrolysis of Biomass Using an Engineering-scale Plug Flow Reactor: Results of Lows Solids Testing", *Biotech. Bioeng. Symp*, 17, (1987), 53-70.
- [63] Parisi, F., "Advances in lignocellulosics hydrolysis and the utilization of the hydrolysate", *Adv. Biovhem. Eng./ Biotech*, (1989), 53-87
- [64] Belaïch, J.P., "Bases méthodologiques et stratégiques de la production de bioéthanol sur substrats non conventionnels", (2004).
<http://energie.insa-lyon.fr/rapport/PRI/PRI1-1.pdf>.
- [65] Durante, D.A. "The US Energy Bill and Renewable Fuels Standard. In World Ethanol 2003 Conference", London, UK, November 5-7, ed, Lichts ; F.O. (London) Ltd, (2003).
- [66] Bayrock, D.P., Ingledew, W.M., "Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, Lactobacillus-contaminated continuous, and batch fermentations", *World J. Microbial. Biotechnol*, 21, (2005), 83-88
- [67] ChangH.N., Lee W.G., Kim B.S., "Cell retention culture with an internal filter module : continuous ethanol fermentation", *Biotechnol. Bioeng.* V.41, n°6, (1993), 677-681.
- [68] Lapace J.M., Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M., "Ethanol production from glucose and xylose by separated and co-culture processes using high cell density", *Process Biochem*, V. 28, n°8, (1993), 519-525.
- [69] Lee, W.G., Park, B.G., Chang, Y.K., Chang, H.N., Lee, J.S., Park, S.C., "Continuous ethanol production from concentrated wood hydrolysates in an internal membrane-filtration bioreactor", *Biotechnol. Prog.* V.16, n°2, (2000), 302-304.
- [70] Groot, w.J., Sikkenk, C.M., Waldram, R.H., Van der lans, R.G.J.M., Luyben,

- K.C.A.M., "Kinetics of ethanol production by baker's yeast in an integrated process of fermentation and microfiltration", *Bioprocess Eng*, 8, (1992), 39-47.
- [71] Escobar, J.M., Rane, K.D. et Cheryan, M., "Ethanol production in a membrane bioreactor: pilot-scale trials in a corn wet mill", *Appl Biochem Biotechnol*, (2001), 91-93, 283-96
- [72] Boze, H., Moulin, G., and Galzy, P., "Production of Microbial Biomass", In *Biotechnology*, H.-J. Rehm, and G. Reed, eds. (Wiley-VCH Verlag GmbH), (2008), 166-220.
- [73] Larpent, J.P., Larpent-Gourgand, M., "Mémento technique de microbiologie", 3^{ème} édition Ed. Tec & Doc, (1997), 1039.
- [74] Hencké, S., "Utilisation alimentaire des levures", Thèse doctorat, Université Henri Poincaré - Nancy I. Faculte de pharmacie , (2000).
- [75] Fritsche, W., "The Yeasts, Vol. 2. Physiology and Biochemistry of Yeasts", *Z. Für Allg. Mikrobiol*, 12, (1972), 349-349.
- [76] Birch, and Walker, "Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*", *Enzyme Microb. Technol.* 26, (2000), 678-687.
- [77] Dombek, K.M., and Ingram, L.O., "Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation", *Appl. Environ. Microbiol.* 52, (1986), 975-981.
- [78] Ferreira, B.S., Calado, C.R.C., van Keulen, F., Fonseca, L.P., Cabral, J.M.S., da Fonseca, M.M.R., "Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain triggers acetate production to fuel biosynthetic pathways", *J. Biotechnol*, 109, (2004) ,159-167.
- [79] Winter, J., "Fermentation alcoolique par *saccharomyces cerevisiae*: contribution à l'étude du contrôle de la dynamique fermentaire par l'inhibition et les facteurs nutritionnels", Thèse doctorat d'état, (1988).
- [80] Rose, A.H., "Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*", *Biol. Act. Yeast*, Academic Press, (1980), 103p.
- [81] Sanchez Gonzalez, Y., "Etude de l'adaptation et de la gestion de l'activité cellulaire dans un bioréacteur bi étagé: intensification de la production d'éthanol", Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, (2008).
- [82] Furukawa, Y., Kimura, S., "Effect of pantothenic acid deficiency on lipid metabolism in the yeast", *J Vitaminol* 17, (1971), 219-224.
- [83] Camarasa, C., Grivet, J. P. & Dequin, S., "Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation", *Microbiology*, 149, (2003), 2669-2678.
- [84] Blom, J., Mattos, M.J.T.D., and Grivell, L.A., "Redirection of the Respiratory Fermentative Flux Distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by Overexpression of the Transcription Factor Hap4p", *Appl. Environ. Microbiol*, 66, (2000), 1970-1973.
- [85] Flikweert, M.T., Kuyper, M., van Maris, A.J., Kötter, P., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T., "Steady-state and transient-state analysis of growth and metabolite production in a *Saccharomyces cerevisiae* strain with reduced pyruvate-decarboxylase activity", *Biotechnol. Bioeng*, 66, (1999), 42-50.
- [86] Van Hoek, van Dijken J.P., and Pronk, "Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*", *Enzyme Microb. Technol*, 26, (2000), 724-736.

- [87] Crabtree, H.G., "Observations on the carbohydrate metabolism of tumours", *Biochem*, 23, (1929), 536-545.
- [88] De Decken R.H., "The Crabtree effect: a regulatory system in yeast", *J. gen. Microbiol.* 44, (1966), 149-156.
- [89] Fiechter, A., and Seghezzi, W., "Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells". *J. Biotechnol*, 27, (1992), 27-45.
- [90] Meijer, M. M. C., Boonstra, J., Verkleij, A. J., and Verrips, C. T., " Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to glucose concentration rather than the glucose flux. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (37), (1998), 24102-24107.
- [91] Ratledge, C., "Yeast physiology a micro-synopsis", *Bioprocess Eng.* 6, (1991), 195-203.
- [92] Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W.A., and van Dijken, J.P., "Glucose transport in crabtreepositive and crabtree-negative yeasts", *J. Gen. Microbiol.* 135, (1989), 2399-2406.
- [93] Pronk et al, (1996)
- [94] Hohmann, S., and Mager, W.H., "Yeast Stress Responses", Springer, (2003).
- [95] Graumlich, T.R., and Stevenson, K.E., "Respiration and viability of thermally injured *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Environ. Microbiol.* 38, (1979), 461-465.
- [96] Helmann, J.D., "The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors", *Adv. Microb. Physiol*, 46, (2002), 47-110.
- [97] Booth, F.W., Chakravarthy, M.V., and Spangenburg, E.E., "Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity", *J. Physiol.* 543, (2002), 399-411.
- [98] Attfield, P.V., "Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast", *Nat. Biotechnol.* 15, (1997), 1351-1357.
- [99] Henson M.A., "Dynamic modeling and control of yeast cell populations in continuous biochemical reactors", *Comput. Chem. Eng.* 27, (2003), 1185-1199.
- [100] Lacroix, C., and Yildirim, S., "Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality", *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, (2007), 176-183.
- [101] Sonnleitner, B., "Dynamic adaptation of microbes", *J. Biotechnol.* 65, (1998), 47-60.
- [102] Marechal, P.A., Martı́nez de Marnañón, I., Poirier, I., and Gervais, P., "The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing", *Trends Food Sci. Technol.* 10, (1999), 15-20.
- [103] Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclair, J.P.R., Powell, C.D., and Smart, K.A. "Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling", *FEMS Microbiol. Rev.* 31, (2007), 535-569.
- [104] Hirasawa, T., Yoshikawa, K., Nakakura, Y., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., Shimizu, H., and Shioya, S., "Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis", *J. Biotechnol*, 131, (2007), 34-44.
- [105] Sainz, J., Pizarro, F., Pérez-Correa, J.R., and Agosin, E., "Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation", *Biotechnol, Bioeng.* 81, (2003), 818-828.
- [106] Poilpré, E., "Mécanisme d'adaptation rapide de *Saccharomyces cerevisiae*

- en métabolisme oxydatif: implication des sucres de réserve et de la capacité respiratoire", Institut national des sciences appliquées, Toulouse,(2002).
- [107] Alexander, M.A et Jeffries, T.W., "Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in Yeast", *Enzyme and Microbiol Technology*, 12, (1990), 2-18.
- [108] Gancedo, C. et Serrano, R., "The yeast", tome 3. A.H. Rose and J.S. Harrison, Academic Press,New York, (1989), 205-259.
- [109] Navarro, J.M., "Levures immobilisées : croissance et métabolisme ; fermentation alcoolique", Thèse Doc. Es.sc. université Paul Sabatier Toulouse, (1980).
- [110] Millar, D.G., Griffiths-Smith Algar, E. et Scopes, R.K., "Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol", *Bioethanol*, Let.4, (1982), 601-606.
- [111] Ingram, L.O.N. et Buttke, T.M., "Effects of alcohols on microorganisms", *Adv, Microb, Physiol*, 25, (1984), 253-300.
- [112] Alfenore, S., Molina-jauve, C., Guillouet, S.E. UribeIarrea, J.L., Goma, G. et Benbadis, L., "Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process", *Appl Microbiol, Biotechnol*, 60, V.1, n°2 , (2002), 67-72.
- [113] Jones R.P. et Greenfield P.F., "Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation", *Enz. Microbiol. Technol.*, 3, (1982), 249-257.
- [114] Saez, C., "Etude des paramètres de la fermentation alcoolique. Application à l'élaboration de pétillant de raisin", Thèse INSA Toulouse, (1982).
- [115] Shimoda, M., Cocunubo-Castellanos, J., Kago, H., Miyake M., Osajima, Y. et Hayakama I., "The influence of dissolved CO₂ concentration on the death kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Applied Microbiol*, 91, (2001), 306-311.
- [116] Shang, L., Min J. Chul Hee, R., Ho Nam Chang, Soon Haeng Cho et Lee J.W., "Inhibitory effect of carbon dioxide on the fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*: Evaluation by CO₂ pulse injection and autogenous CO₂ methodes", *Biotechnol, Bioeng*, 83, (2003), 312-320.
- [117] Ciftci, T., Constantinides, A. et Wang S.S., "Optimization of conditions and cell feeding procedures for alcohol fermentation", *Biotechnol, Bioeng*, 25, (1983), 2007-2033.
- [118] Lafforgue, C., "Fermentation alcoolique continue en bioréacteur à membrane". Thèse INSA Toulouse, (1988).
- [119] Aldiguier, A.S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., UribeIarrea, J.L., Guillouet, S.E., Molina-Jouve, C., "Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production", *Bioprocess Biosys, Eng*, 26, (2004), 217-222.
- [120] Fadil, M. ,Farah, A. ,Ihssane, B. ,Haloui, T. ,Rachiq, S., "Optimization of parameters influencing the hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. by response surface methodology", *J. Mater, Environ, Sci*, V.8, n°6, (2015), 2346-2357.
- [121] Rabier, F. "Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire". Thèse de Doctorat en Génie Mécanique, Ecole doctorale matériaux – structure – mécanique, (2007), 181.
- [122] Goupy, J., "La méthode des plans d'expériences", Dunod, 2^{ème} Ed, (1999) 259-316

- [123] Perrin, D., Van Hille, B., Barret JM., Kruczynski, A., Etiévant, C., Imbert, T., Hill, BT., "F 11782, a novel epipodophylloid non-intercalating dual catalytic inhibitor of topoisomerases I and II with an original mechanism of action", *Biochem Pharmacol*, V.59, n°7, (2000), 807-19.
- [124] Feneuille, D., Mathieu, D., and Phan-Tan-luu, R., "Méthodologie de la recherche expérimentale", Laboratoire de prospective réactionnelle et d'analyse de l'information, (1983).
- [125] Chibi, S., Rabet, S. et El-Hadi, D., "Etude des Paramètres Environnementaux sur la Croissance de "*Saccharomyces Cerevisiae*" Isolée de Rebutts de Dattes", *Algerian Journal of Environmental Science and Technology* Avril edition, V.2, n°3, (2016), 62-69.
- [126] Tan Kolfi, N.; Mohd Dayaon, S.H., "Identification of microorganism from Ragi for bioethanol production by API Kit", *Statewide Agricultural Land Use Baseline*, 10, (2015), 2751-2753.
- [127] Guigou, M., Lareo, C. and Perez, M.E., "*Bioethanol Production from Sweet Sorghum: Evaluation of Post-Harvest Treatments on Sugar Extraction and Fermentation*", *Biomass and Bioenergy*, V.7, n°35, (2011), 3058-3062.
- [128] Norme Algérienne, "NA.717. Détermination des cendres totale", ISO 1575, Catalogue des normes algériennes, (1987) ".
- [129] Yamaoka, C., Kurita, O., Kubo, T., "Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation", *Microbiological Research*, 169, (2014), 907-914.
- [130] Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugar and related substances", *Anal. Chem*, 28, (1956), 350-356.
- [131] Lecoq, R., "Handle alimentary analyses and usuelle experts", Tome I, Ed. Doin, Deren et Cie, (1965), 241-251.
- [132] Audigie, C.I., Figarelle, J. et Zonszani, F., "Manipulations d'analyses biochimiques", Ed. Doin éditeurs, Paris, (1984), 88-97.
- [133] Lange, H., Bavouzet, J.M., Tailandier, P., Delorme, C., "Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions", *Biotechnology Techniques*. V.3, n°7, (1993), 223-228.
- [134] Girard, H. and Rougieux, R., "The microbiologie agricole Technics", Ed. Dunod, Paris, (1958), 80-90.
- [135] Abegg, D., Calo, N., Mazamay, E. et Surriabre, P., "Détermination des conditions optimales de séparation et dosage de l'éthanol et du méthanol", Université de Geneve, science II, Laboratoire 144- Groupe 4, (2008), 3-4.
- [136] Nevoigt, E., "Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiol, mol, Biol. Rev*, V.72, n°3, (2008), 379-412.
- [137] Othman, A M A. 1995. "Prospective of development of palm dates protection of arabes", The Arab Center for the Studies of Arides zones and dry Land, (1995), 14p.
- [138] Amellal-Chibane, H., Salem, B., "Total contents of major minerals in the nature yoghurt and in the yoghurts with the date powder of three dry varieties", *Am, J. Food. Nutr* V.2, n°1, (2011) 74-78.
- [139] Riviere, "*Industriel application of the microbiologie*", Ed Masson et Cie, (1975), 203p.
- [140] Brissonet, F., Bouix, M., Loiseau, G., Russel, A., Leveauj, Y., "The stress bacteries and the consequences of hygien genitic", *IAA* n°3, (1994), 106-

- 114.
- [141] Jassim, A., Hasahalli, S., Rahman Khan, A., "Effect of water activity on glass transition of date paste", *Journal of Food Engineering*, V.66, n°2, (January 2005), 253-258.
- [142] Saafi, E.B., Trigui, M., Thabet, R., Hammami, M., Achour, L., "Common date palm in Tunisia: chemical composition of pulp and pits", *International Journal of Food Science and Technology*, n°3, (2008), 2033-2037.
- [143] Fethi, H.A et El-Kohtani, M.N., "Production de dattes dans le monde arabe et islamique", Université Ain chems, (1979), 533-541.
- [144] Lambiot, B., "Some aspect of the role of dates in human nutrition", The first symposium on date palm, King Faysal University Al Hassa Kingdom of Asudi Arabia, (1983), 577-579.
- [145] Favier, J.C., Ireland, R.J., Toque, C., Feinberg, M., "General of alimentary", Ed. Tec et Doc-Lavoisier, INRA Editions, CNEVA et CIQUAI, (1995), 897p.
- [146] Mimouni, Y., Siboukeur, O. E. K., "Etude des propriétés nutritives et diététiques des sirops de dattes extraits par diffusion, en comparaison avec les sirops a haute teneur en fructose (isoglucoses), issues de l'industrie de l'amidon", *Ann. Sci. Tech*, V.3, n°1, (2011), 1-11.
- [147] Ganbl, H., "Production of Nutritious High Quality Date (*Phoenix dactylifera*) Fruits Syrup (Dibs) by using some Novel Technological Approaches", *Journal of Applied Sciences Research*, V.8, n°3, (2012), 1524-1538.
- [148] Queshi, A. S., Bhutto, M. A., Chisti, Y., Khushk, D. M. U., Bano, S., "Production of pectinase by *Bacillus subtilis* EFRL 01 in a date syrup medium", *African Journal of Biotechnology*, V.62, n°11, (2012), 12563-12570.
- [149] Siboukeur, O., Ould, HMD., Zargat, F., "Contribution à l'Etude de la Production d'Acide Citrique par *Aspergillus niger* Cultivée sur Moût de Dattes de la Variété Ghars", *Rev. Energ. Ren, Production et Valorisation- Biomasse*, (2001), 93-96.
- [150] Ould HMD., Bitour, Z., Siboukeur, O., "Etude De La Production De Levure Boulangere (*Saccharomyces Cerevisiae*) Cultivée Sur Mout De Rebut De Dattes", *Courrier du Savoir*, n°7, (Décembre 2006), 13-18.
- [151] Nixon, R W. et Carpenter, B., "Growing dates in united states", United states department of agriculture, information bulletin prepared by science and education administration, (1978), 44-45
- [152] Kurtzman, P.C., "Yecies recognition from gene sequence analyses and other molecular methods, *Mycoscience*", V.47, n°2, (2006), 65-71.
- [153] Piper, P.W. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and funtional overlap. *FEMS Microbiol Lett* (1995) 134:121.
- [154] Pina, C. ; Santos, C. ; Couto, J.A. ; Hogg, T. Ethanol tolerance of five are not *Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* influenced by different culture conditions. *Food Microbiology* 21 (2004) 439.
- [155] Nedwell, D.B. ; Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature; *FEMS Microbiology letters*; 30, 101-111 (1999).
- [156] Ansanay-Galeote V., Blondin B., Dequin S. et Sablayrolles J.M..(2001). Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Lett.* 23, p. 677-681

- [157] Ingledew W.M., Kelsall D.R. Austin G.D. et Kluhspies C.. (2009). The alcohol textbook 5th edition. Nottingham university press, p. 108-117
- [158] Ingledew, W.M., Casey, G.P., 1982. The use and understanding of media used in brewing microbiology. I. Dig. 57 : 12-22.
- [159] Hayashida, S.; Ohta, K. Formation of high concentration of alcohol by various yeasts. *Journal Inst. Brew* 87 (1981) 42-44.
- [160] Meyer, J.; Schneider, B.U.; Werk, K.; Oren, R.; Schulze, E.D. Performance of two *Picea abies* (L) Karst. Strands at different stages of decline. *Oecologia* 77 (1988) 7-13.
- [161] Li Y., Lu J., Gu G. et Mao Z. ; Characterization of the enzymatic degradation of arabinoxylans in grist containing wheat malt using response surface methodology; *Journal of the American Society of Brewing Chemists*; 63:171-176 (2005).
- [162] Chi Z. et Arneborg N. ; Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol*; 86:1047–1052 (1999).
- [163] You KM., Rosenfield CL. et Knipple DC. ; Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content; *Appl Environ Microbiol*; 69:1499–150 (2003)
- [164] Raynaud, S. ; Metabolic and Transcriptomic Adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Biovar *diacetylactis* in Response to Autoacidification and Temperature Downshift in Skim Milk. *Applied and Environmental Microbiology*; 71(12):8016-23 (2006).
- [165] Abdul Afiq M.J., Abdul Rahman R., CheMan Y.B., Mansor T.S.T. and Al-KahtaniH.A. (2013). Date seed and date seed oil. *International Food Research Journal*, 20(5): 2035-2043
- [166] Platat C., Habib H.M., Al Maqbali F.D., Jaber N.N. and Ibrahim, WH. (2014). Identification of Date Seeds Varieties Patterns to Optimize Nutritional Benefits of Date Seeds. *Journal of Nutrition & Food*, S8: 008. doi:10.4172/2155-9600.S8-008
- [167] Besbes S., Blecker C., Deroanne C., Lognay G., Drira N. E. and Attia H. (2004). Quality Characteristics and Oxidative Stability of Date Seed Oil during Storage. *Food Science and Technology International*, 10: 333-338.

ANNEXES

1 MILIEUX DE CULTURE

1.1. Composition de la solution d'oligo-éléments

- FeCl ₂ , 4H ₂ O	1500 mg
- MnCl ₂ , 4H ₂ O	100 mg
- ZnCl ₂	70 mg
- CuCl ₂ , 2H ₂ O	2 mg
- HCl, 35%	6,7 ml
- CoCl ₂ , 6H ₂ O	190 mg
- H ₃ BO ₃	6 mg
- Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	36 mg
- NiCl ₂ ,6H ₂ O	24 mg
- H ₂ O q.s.p	1000 ml

2. Auxacolor



3. MATERIELS D'ANALYSE ET LES COURBES D'ETALONNAGES

3.1 Les conditions expérimentales de l'analyse IRTF:

Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Bruker type Tensor 27, équipé d'un détecteur sulfate triglycine deutéré DTGS à température ambiante, d'une source infrarouge moyen (4000 - 400 cm⁻¹), d'un rayonnement de laser et un diviseur de faisceau KBr a été utilisé. La fenêtre utilisée pour l'analyse de la phase liquide était en fluorure de baryum (BaF₂) avec une entretoise en téflon de 0.1 mm d'épaisseur. Le traitement des spectres est

réalisé avec le logiciel OPUS 6.5 sous le système d'exploitation Microsoft Windows XP. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de scan égal à 25 spectres par rapport à un background stabilisé préalablement dans les mêmes conditions instrumentales avec une cellule remplie de solvant utilisé pour la préparation de solution (dichlorométhane).

3.2. Les conditions expérimentales de l'analyse (CPG)

La séparation est réalisée sur colonne capillaire OV 17 type GC-17A SHIMADZU, une colonne capillaire moyennement polaire de type FS-OV-1701-CB-0,25. La phase mobile est composée de N_2 , de longueur 25m. La température de la colonne 70°C , la température de l'injection 220°C , température de détecteur 220°C et la pression 80mPa. Le débit est de 18 ml/min. Cette méthode permet de séparer l'éthanol et le dioxanne en moins de 2min.

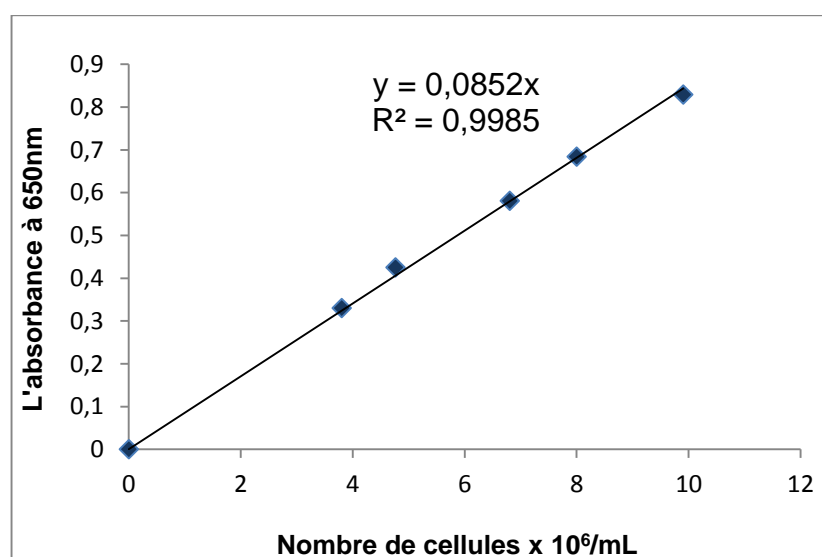


Figure 1: Corrélation entre le Nombre de cellule et la densité optique à 620nm pour *Saccharomyces cerevisiae* isolés à partir de déchets de datte.

Tableau 1 : Courbe d'étalonnage 0,01% de glucose

Concentration de glucose en (μg)	0	40	80	120	160	200
DO à 490nm	0	0,183	0,341	0,544	0,713	0,854

3.3. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est une bonne manière de vérifier la concentration d'alcool des échantillons recueilli. 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. Le tableau ci-dessous présente le pourcentage de l'éthanol obtenu dans l'eau et leur indice de réfraction remis à 20°C, ce qui a permis de déterminer le pourcentage d'éthanol à la suite de chaque distillation.

L'équation utilisée pour ramener l'indice de réfraction à 20 °C est :

$$n^{20} = n^t + 0,00045x(t - 20)$$

Tableau 2 : Pourcentage d'éthanol selon l'indice de réfraction (Selon la courbe d'étalonnage)

% Ethanol	n ²⁰	% Ethanol	n ²⁰
0 (eau distillé)	1,3335	55	1,3616
5	1,3380	60	1,3619
10	1,3399	65	1,3628
15	1,3422	70	1,3634
20	1,3462	75	1,3641
25	1,3486	80	1,3643
30	1,3509	85	1,3644
35	1,3530	90	1,3647
40	1,3555	95	1,3637
45	1,3568	100(éthanol absolu)	1,3628
50	1,3595		