

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie
ma mère qui m'a apporté son appui durant toutes mes années
d'études, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance,
courage et sécurité.*

*À mon père qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de
mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses encouragements.*

À la mémoire de ma très chère sœur.

À mes très chers sœurs et frères.

À mes belles sœurs et mes beaux frères.

À mes neveux et nièces.

À mes ami(e)s.

*À ma chère binôme et sœur MERIEM qui m'a accompagnée durant
ce travail, et à toute sa famille.*

À toute la promotion de biotechnologie microbienne 2017.

À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer....

Kenza

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce travail A :

La lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui m'apporté son appui durant tous mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance courage et sécurité.

Mon père qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et encouragements.

Ma sœur : Nabila

Mes frères : Lyazid, Mustapha, Mouhamed, Athmane

Mes adorables petites nièces : Zineb et Sarah

Mes belles sœurs : Samia et Karima

Mes cousines : Hassina et zahira

Mon binôme Melle Rezkj, sans oublier mes chères amis et camarades qui m'ont aidé, que ce soit de près ou de loin merci à eux à leurs soutiens et leur compréhension.

La Promotion de biotechnologie microbienne 2016-2017

Meriem

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant nous avoirs données, la santé, la patience et le courage d'achevé ce modeste travail

À cet effet, on tient à exprimer notre profonde gratitude à notre promoteur, M. BOUKHALFA, qui a aimablement accepté de diriger notre travail, on le remercie très vivement pour ces connaissances, sa gentillesse, il nous a permis de puiser de son expérience, de sa compétence et de ses connaissances très variées, pour ses conseils judicieux, sa disponibilité et sa bonté, on est très reconnaissantes .

On remercie également Pr. MADANI d'avoir accepté de présider notre travail et M. TACHERFOUIT de l'examiner.

Nous tenons à exprimer nos sincères reconnaissances et nos vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail en l'occurrence nos familles qui n'ont jamais cessé de nous encourager.

Enfin, on adresse nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis qui nous ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I Dattes 3

 I.1 Généralités sur les dattes 3

 I.2 Classification des variétés de dattes : 3

 I.3 Composition biochimique et valeurs nutritive de la datte 3

 I.3.1 Partie comestible " pulpe " 3

 I.3.2 La partie non comestible "Noyau " 4

 I.4 Valeur nutritionnelle de la datte 4

 I.5 Production des dattes dans le monde et en Algérie 5

 I.6 La variété de *Tantboucht* 5

II Bioéthanol 6

 II.1 Généralités sur l'éthanol 6

 II.2 Composition du bioéthanol..... 6

 II.3 Procédé de fabrication de bioéthanol..... 7

 II.4 Production mondial de bioéthanol 7

 II.5 Commerce de bioéthanol 7

III Plan d'expériences 8

 III.1 Terminologie 8

 III.2 Plans pour surfaces de réponses (RSM) 9

III.3	Plan Box-Behnken (BBD)	9
-------	------------------------------	---

Chapitre II : Matériels et Méthodes

I	Matériel expérimentale	10
I.1	Échantillonnage et traitement	10
I.2	Matériel biologique.....	10
I.2.1	Technique d'isolement des levures	11
I.2.2	Purification des souches de levure	11
I.2.3	Identification des souches de levure.....	11
II	Caractérisation physico-chimiques de la poudre de datte.....	13
II.1	Taux d'humidité	13
II.2	Taux de matière sèche (MS).....	14
II.3	Taux de cendres totales.....	14
II.4	Potentiel d'hydrogène (pH)	14
II.5	Acidité titrable	14
II.6	Teneur en sucres totaux	15
II.7	Teneur en sucres réducteurs	16
II.8	Teneur en saccharose.....	16
II.9	Teneur en protéines	16
II.10	Dosage de l'azote total	17
II.11	Détermination de la teneur en alcool.....	17
II.12	La viabilité cellulaire	18
III	Milieu de fermentation.....	18
III.1	Conduite de la fermentation	18
III.2	Etude préliminaire	19
III.3	Influence de la concentration du substrat et du temps d'incubation sur la production d'éthanol.	19

IV Optimisation des paramètres de production du bioéthanol par le plan d'expérience Box- Behnken.....	19
IV.1 Choix de la température.....	19
IV.2 Choix du pH.....	20
IV.3 Choix de source d'azote (NH ₄) ₂ SO ₄	20
IV.4 Application du model Box-Behnken pour l'optimisation de la production.	20
IV.5 Etude statistique.....	22

Chapitre III : Résultats et Discussion

I. Isolement des souches levuriennes	23
I.1. Caractères de la production végétative.....	23
I.2. Etude des caractères biochimiques de la souche isolée.....	24
II. Caractéristique morphologique de <i>Tantboucht</i>	25
III. Caractérisation physico-chimique de la poudre de datte <i>Tantboucht</i>	26
III.1. Taux d'humidité	27
III.2. Taux de matière sèche	27
III.3. La teneur en cendre.....	27
III.4. Potentiel d'hydrogène (pH)	28
III.5. L'acidité titrable	28
III.6. Sucres totaux.....	28
III.7. Les sucres réducteurs.....	29
III.8. Saccharose	29
III.9. Protéines	29
III.10. L'azote total.....	30
IV. Optimisation des paramètres de production d'éthanol.....	30
IV.1. Essais préliminaires	30

IV.2. Plan d'expérience	32
VI.2.1. Validation du model.....	34
VI.2.2. Coefficient de corrélation (R^2).....	34
VI.2.3. Model globale et manque d'ajustement	35
VI.2.4. Effet des facteurs	36
VI.2.5. Modèle mathématique.....	38
VI.2.6. Paramètres optimaux.....	38
VII- Viabilité cellulaire	39
Conclusion	40

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

°C: degré Celsius.

µl : microlitre.

ANOVA: Analysis of variance.

BBD: Box Behnken Design.

BSA: Albumine de Sérum Bovin.

DNS: dinitrosalicylique.

DSASI: Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'information.

FAO: Food and Agriculture Organization of the united nation.

g : gramme.

GN: Gélose Nutritive.

h : heure.

M.S : matière sèche.

MF: Matière sèche.

mg : milligramme.

min : minute.

ml: millilitre.

MS: Matière Frais.

nm: nanomètre.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PF: Poids Frais.

RMS: Response surface methodology.

v/v : volume / volume.

Liste des figures

Figure 1: Photographie la variété <i>Tantboucht</i>	10
Figure 2: Photographie de boîte pétrie de souches levuriennes isolée sur milieu SABOURAUD (30°C/5 jours).....	23
Figure 3 : Photographie de l'observation microscopique à l'état frais de souches levuriennes isolées.....	24
Figure 4 : Photographie des compositions de <i>Tantboucht</i>	25
Figure 5 : Effet de concentration du substrat et le temps d'incubation sur la dégradation des sucres totaux.....	30
Figure 6: Effet de concentration du substrat et le temps d'incubation sur la dégradation des sucres réducteurs.....	31
Figure 7: Effet de concentration du substrat et le temps d'incubation sur la production des protéines.....	32
Figure 8: plan de prédiction réelle de la poudre de datte.....	35
Figure 9: Surface de réponse pour les différentes interactions.....	37
Figure 10: Effets des différents paramètres physico-chimiques sur la viabilité cellulaire en comparant avec la productivité.....	39

La liste des tableaux

Tableau I: les niveaux des paramètres choisis.....	21
Tableau II : Matrices d'expérimentation du plan Box-Behnken.....	21
Tableau III: Résultats des tests biochimique de la souche isolée.....	24
Tableau IV : Caractéristiques morphologique de la variété <i>Tantboucht</i>	26
Tableau V : Caractéristiques physico-chimiques de la variété <i>Tantboucht</i>	26
Tableau VI: Optimisation des conditions de production de Bioéthanol par le plan Box-Behnken (BBD).....	33
Tableaux VII : l'étude de la variance du modèle et le manque d'ajustement.....	35
Tableau VIII: les coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.....	36
Tableau IX: Les conditions optimales pour la production de bioéthanol.....	38



Introduction

Introduction

Introduction

L'épuisement à terme des réserves de pétrole brut ainsi que la prise en compte des problèmes liés à l'environnement et la crise de l'énergie entraîne une demande accrue de sources d'énergie alternatives et renouvelables (**Makkar et Cameotra, 2002**), créant une conjoncture favorable au développement des biocarburants bien placés pour répondre aux soucis énergétiques.

Ces derniers sont issus des sources de biomasses très diversifiées, et peuvent être issues à partir soit des plantes saccharifères et amylacées comme la betterave et les céréales ainsi appelées première génération, soit à partir de la lignocellulose appelées alors seconde génération.

Les biocarburants, parfois appelés agrocarburants, sont issus de la matière première utilisée. Il existe de nombreux types de biocarburants, citons le Biodiesel, Biobutanol, Biométhanol, huile végétale brute (HVB) et Bioéthanol.

La production du bioéthanol peut être dérivée des procédés de fermentation à partir des résidus agro-industriels contenant des sucres ou des précurseurs du sucre qui peuvent constituer une solution de choix, étant donnée la nécessité de remplacer les combustibles fossiles. (**Alazard-Toux et al., 2006**).

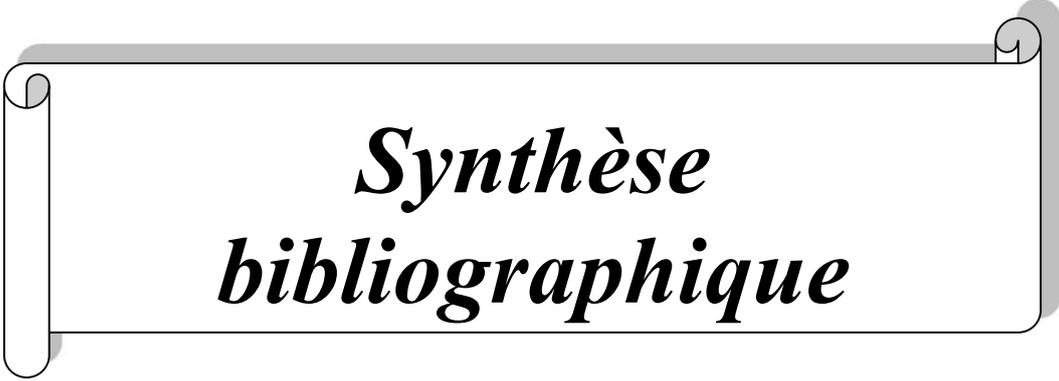
L'Algérie avec son patrimoine riche et diversifié en palmiers dattiers, plus de 18605076 de palmiers avec une production totale de dattes évaluée à 9903770 (Ministère de l'Agriculture DSASI, 2015) compte parmi les grands producteurs de dattes en occupant le cinquième rang mondial (**FAO, 2013**).

Les dattes *Phoenixdactylifera L.*, à part leur grande valeur en sucres fermentescibles elles sont très appréciées pour leur forte concentration d'antioxydants qui peuvent constituer une matière première pour de nombreuses industries, il est donc préférable de les valoriser à l'aide des processus biotechnologiques qui représentent une solution de choix pour produire des substances à forte valeur et peu coûteuses, afin de contribuer au développement de notre industrie et diminuer les nuisances pour l'environnement. Parmi ces substances le bioéthanol qui est issu d'un procédé biotechnologique de fermentation anaérobie.

Introduction

Les levures sont des microorganismes idéaux pour la valorisation des déchets agricoles et industriels. Parmi ces levures, *Saccharomyces cerevisiae*, qui est l'un des microorganismes les plus utilisés par l'homme depuis des millénaires pour des applications traditionnelles telles que la production de vin, de pain, cette levure est aussi largement utilisée pour la production des protéines, de divers produits chimiques et plus récemment pour la production de bioéthanol.

L'objectif de la présente étude est d'étudier les caractéristiques physico-chimiques de la variété datte *Tantboucht* et l'optimisation des paramètres qui influencent sur *saccharomyces cerevisiae* pour la production de bioéthanol par la fermentation submergée à partir de la datte commune à faible valeur marchande comme substrat. En appliquant la méthode de surface de réponse (RSM) dont le modèle de plan d'expérience est Box-Behnken. Une série d'expérimentations de fermentation alcoolique de moût de datte est réalisée avec des conditions de production, à savoir la température, le pH, et enfin la concentration en sulfate d'ammonium.



*Synthèse
bibliographique*

I Dattes

I.1 Généralités Sur Les Dattes

La datte est le fruit du palmier dattier *Phoenix dactylifera L.*, de la famille *Areaceae* (Linné, 1734). provient du mot « Phoenix » qui signifie dattier chez les phéniciens, et « dactylifera » dérive du terme grec "dactulos" signifiant doigt, (Djerbi, 1994).

I.2 Classification des variétés de dattes :

Selon sa teneur en humidité, la datte est répartie en trois variétés; (Espiard, 2002)

- **Les dattes molles** : taux d'humidité supérieur ou égal à 30%, elles sont à base de sucre invertis (fructose, glucose) tels que : Ghars, Hamraia, etc.
- **Les dattes demi-molles** : de 20 à 30% d'humidité, elles occupent une position intermédiaire à l'exception de *Deglet-Nour*, *Tantboucht* des dattes à base de saccharose par excellence.
- **Les dattes sèches** : dures, avec moins de 20% d'humidité, riche en saccharose. Elles ont une texture farineuse telle que Meche-Degla, Degla Beida.....etc.

I.3 Composition biochimique et valeurs nutritive de la datte

I.3.1 Partie comestible " pulpe "

La teneur en eau varie selon les variétés, du climat et du stade de maturation, Elle varie entre 8 et 30 % du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19 % (Noui, 2007).

Le majeur constituant de la datte est le sucre. L'analyse des sucres de la datte a révélé essentiellement la présence de trois types de sucres : saccharose, le glucose et le fructose qui sont facilement assimilables (Acourene et Tama, 1997 ; Estanove, 1990).

On trouve aussi d'autres sucres, mais en faible proportion tels que : le galactose, le xylose et le sorbitol (Favier et al., 1993 ; Siboukeur, 1997).

La datte est riche en fibres, elle en apporte 8,1 à 12,7 % du poids sec (Al-Shahib et Marshall, 2003). Les constituants pariétaux de la datte sont : cellulose, pectine, hémicellulose et la lignine (Benchabane 1996).

Les dattes présentent des teneurs faibles en protéines, 2,3 à 5,6 % du poids frais. Malgré cette faible teneur, les protéines de la datte sont équilibrées qualitativement (**Yahiaoui 1998**).

Les lipides sont présents en faible quantité dans la datte, leur taux varie entre 0,43 à 1,9 % du poids sec (**Al-Shahib et Marshall, 2003**) en fonction de la variété et du stade de maturation.

Les dattes contiennent comme acide gras saturés les acides caprique, palmitique et stéarique, et comme acides gras insaturés, les acides oléique et linoléique (**Al-shahib et Marshall, 2003**). Elles ne sont pas une source importante de vitamine. La partie vitaminique se caractérise par des teneurs appréciables en vitamines du groupe B. Ce sont des précurseurs immédiats des coenzymes indispensables pour toutes les cellules vivantes (**Vilkas, 1993**).

Par contre, elles sont riches en éléments minéraux essentiellement le K, Mg, P, Ca, Fe (**Siboukeur, 1997**). La caractéristique la plus remarquable de la datte réside dans la présence de minéraux et d'oligoéléments particulièrement abondants, dépassant les autres fruits secs (**Al-shahib et Marshall, 2003**). Elles renferment aussi des composés phénoliques tels que : les acides cinnamiques, des flavones, des flavanones et des flavonols (**Mansouri et al., 2005**).

I.3.2 La partie non comestible "Noyau "

Le noyau occupe 7 à 30% du poids sec de la datte, il est composé d'un albumen blanc, dur et corné protégé par une enveloppe cellulosique (**Espiard, 2002**).

I.4 Valeur nutritionnelle de la datte

De par leur forte teneur en sucres, les dattes constituent un excellent aliment, de grande valeur nutritive et énergétique, **Gilles (2000)**. Elles ont aussi une teneur intéressante en sucres réducteurs facilement assimilables par l'organisme et des protéines équilibrées qualitativement. On outre, les dattes sont riches en minéraux plastiques (Ca, le Mg, P, et S) et en minéraux catalytiques (Fe, Mn). Elles sont reminéralisantes et renforcent notablement le système immunitaire (**Albert, 1998**).

Le profil vitaminique de la datte se caractérise par des teneurs appréciables en vitamines du groupe B. (**Tortora et Anagnostakos, 1987**).

I.5 Production des dattes dans le monde et en Algérie

En 2013, La production mondiale de dattes est de 07 millions de tonnes. Parmi les 34 pays les plus importants, on trouve, l’Egypte, l’Iran, l’Arabie Saoudite, les Emirats arabe, l’Irak, le Pakistan et l’Algérie. Selon les données de la FAO, l’Algérie serait le cinquième producteur mondial de dattes avec une production annuelle de 9 903 770 tonnes (**DSASI, 2015**).

En Algérie, la superficie occupée par le palmier dattier en 2015 est d’environ 2% de la superficie totale. (**Annexe II**)

La variété *Deglet Nour*, a représenté 53% de la production totale de dattes en 2015. Avec 51% à Biskra, 31% à El-Oued et 13% à Ouargla. Ces trois wilayas à elles seules représentent plus de la moitié de la production totale de datte en Algérie. (**Annexes III**)

La production de dattes connaît un essor remarquable en Algérie, elle ne cesse d’augmenter depuis 2012 dont elle est passée de 600 096 de tonnes à presque 1 millions de tonnes en 2015. (**Annexes IV**)

I.6 La variété de *Tantboucht*

La variété *Tanboucht* est une datte commune à faible valeur marchande, destinée à la consommation locale ou à l’alimentation du bétail (**Estanove, 1990**). Elle est riche en sucre (21.9- 22.2) et en sels minéraux tels que calcium, potassium, magnésium et le fer, mais pauvre en phosphore, protéine et vitamines. (**Acourène et Tama, 2001**), d’une consistance demi-molle avec un pH 6. Cette variété renferme des sucres fermentescibles (**glucose et fructose**) directement assimilables par la levure. Origine d’Oued-Righ et Zibans. (**Acourene et al., 2007**).

II Bioéthanol

II.1 Généralités sur l'éthanol

L'Éthanol est un liquide, incolore, volatil, inflammable, à forte odeur, miscible à l'eau en toutes proportions, nommé alcool éthylique ou alcool car il se retrouve dans toutes les boissons alcoolisées et dans la pharmacopée. L'éthanol désigne l'éthanol pur à 100 %. Il est utilisé comme intermédiaire de synthèse dans l'industrie chimique comme solvant et désinfectant (**Parkash 1998**).

Le bioéthanol est l'éthanol obtenu par la fermentation des sucres fermentescibles contenus dans la biomasse en présence d'une levure, (**Zahid et al., 2012**). Il a été identifié comme le biocarburant le plus utilisé dans le monde, car il contribue de manière significative à la réduction de la consommation de pétrole brut et de la pollution de l'environnement. (**Azhar et al., 2017**).

Il peut être produit à partir de substrats riches en sucrose (canne à sucre, betterave sucrière, etc.), en amidon (maïs, orge, blé, pomme de terre, etc.), de substrat cellulose tels que les résidus agricoles (la paille ou les cannes de maïs), les résidus forestiers (**Wyman 1996**), cultures énergétiques (le panic érigé ou des arbres à courte rotation). En raison de son coût et de ses abondances relativement faibles (**Didderen, (2008)**), et renouvelables aussi pour soutenir la production de bioéthanol à grande échelle. (**Charles Wyman 1996**). Les microalgues (**Demirbas, 2010**).

II.2 Composition du bioéthanol

Le bioéthanol contient 35% d'oxygène, ce qui permet une réduction d'émission de matière particulaire. L'utilisation de bioéthanol réduit de 7% la quantité de CO₂ émise par rapport à l'essence (**Demirbas, 2010**). Par ailleurs, le bioéthanol se caractérise par un indice d'octane très élevé. Un fort indice d'octane, indique une résistance élevée à la détonation provoquée par un allumage prématuré assurant une haute performance du moteur notamment, sur le plan de la puissance développée. L'éthanol joue à ce titre le rôle des dérivés du plomb autrefois présents dans l'essence (**Brodeur, 2011**).

II.3 Procédé de fabrication de bioéthanol

Le procédé de fabrication du bioéthanol est constitué de trois étapes (**Azhar et al., 2017**). Le produit final est le bioéthanol issu de la fermentation reste le même, seul le procédé de fabrication diffère selon la matière première à fermenter.

II.4 Production mondiale de bioéthanol

Parmi les pays en développement, le plus grand producteur de bioéthanol est le Brésil qui représente environ 37%, suivent les USA avec 36% puis les 27% restants répartirent entre l'Asie 15%, l'Europe 10% et d'autres pays 2%.

80% de cette production est utilisé comme carburant, les 20% restants sont utilisés dans d'autres secteurs (alimentaire, industrie pharmaceutique, chauffage...). D'après les projections, le bioéthanol à base de racines et de tubercules, comme le manioc, ne devrait présenter que 4% environ de la production totale. La culture du manioc en particulier à des fins de production de bioéthanol pourrait présenter un fort potentiel dans le monde en développement. (**OCDE et FAO, 2016**)

L'immense majorité du bioéthanol est produit à partir de canne à sucre (Brésil), de betterave (France) ou de céréales (Etats-Unis, Asie, Europe).

II.5 Commerce de bioéthanol

En moyenne 7% de la production mondiale de bioéthanol devrait faire l'objet d'échange au cours de la période de projection. Le marché devrait se rétablir par rapport à 2010, qui avait vu les exportations brésiliennes de bioéthanol chuter très fortement.

Au niveau mondial, l'augmentation du volume des échanges sera due en quasi-totalité à l'accroissement des exportations de bioéthanol qui devraient totaliser 0,5 milliards de litres en 2020. En union européenne, les importations de bioéthanol augmenteront dans un premier temps, pour faire face à une demande croissante, et s'établiront ensuite autour de 4 milliards de litres en 2013. Etant donné les critères de durabilité de la directive européenne DER et l'expansion du bioéthanol cellulosique qui est attendue sur les dernières années de la période étudiée par les perspective, les importations de bioéthanol devraient retomber à 2,3 milliards d'ici 2020. (**OCDE et FAO, 2016**)

III Plan d'expériences

Sont définies comme étant la méthode mathématique et statistique qui permet de modéliser et d'organiser aux mieux des essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. **(Goupy et Creighton, 2006)**

Ces méthodes visent à établir et analyser les différentes interactions qui existent entre les grandeurs étudiées, et leurs sources de variations supposées. **(Vivien, 2002)**

Un plan d'expérience consiste en la mise en oeuvre organisée d'un ensemble d'unités expérimentales d'une manière à révéler les effets de différents traitements. **(Franco, 2008 ; Tinsson, 2010).**

L'objectif principal de la théorie des plans d'expériences est d'assurer la meilleure précision possible, avec un maximum d'information et un minimum d'essais sans sacrifier la qualité, après avoir fait varier simultanément les niveaux d'un ou plusieurs facteurs. **(Goupy et Creighton, 2006)**

Actuellement, il existe de différents types de plans d'expériences, comme les plans factoriels complets ou fractionnaires à 2 niveaux, plans factoriel à plus de deux niveaux. Les plans en blocs complets ou incomplets, les plans de surface de réponse, les plans de mélange et les plans optimaux. **(Goupy et Creighton, 2006)**

Les plans d'expériences sont devisés en deux grandes catégories, selon leurs propriétés et leurs capacités à répondre à certain problématique particulières.

- Les plans pour estimer et comparer les effets des paramètres.
- Les plans pour régler les paramètres afin d'obtenir un optimum. **(Faucher, 2006)**

III.1 Terminologie

Facteur : est un paramètre qualitatif ou quantitatif dont sa variation est susceptible de modifier le fonctionnement de ce dernier.

Niveau d'un facteur : c'est la valeur codés donnée à un facteur pour réaliser une expérience.

Réponse : c'est la grandeur d'intérêt mesuré, afin d'évaluer l'effet du facteur étudié.

Domaine d'étude : c'est l'espace expérimental dans lequel chaque point représente une combinaison possible des valeurs des facteurs étudiés.

Modélisation mathématique : est une fonction mathématique qui relie la repense aux facteurs qui l'influence.

Matrice d'expérience : c'est l'ensemble des niveaux imposés aux variables, pour la réalisation des différents essais, après avoir choisi le plan expérimental. **(Goupy et Creighton, 2006 ; Vivier, 2002).**

III.2 Plans pour surfaces de réponses (RSM)

Les plans d'expérience permettent de régler les paramètres pour atteindre un optimum entre les niveaux des facteurs étudiés. **(Faucher, 2006)**

Le principe de toutes les méthodes d'optimisation, consiste à explorer cette surface de façon à localiser un éventuel extremum dans un domaine expérimental donné.

Ces plans utilisent des modèles polynomiaux du second degré avec interaction d'ordre 2. **(Goupy et Creighton, 2006)**

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \dots + \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Mei et al., 2008})$$

Où :

Y : grandeur d'intérêt.

X_i, X_j : les variables.

$\beta_0, \beta_j, \beta_{jj}, \beta_{ij}$: les coefficients de polynôme.

Il existe de nombreux types de plans permettant de construire des surfaces de réponse tels que : les plans composites centrés, plans de Doehlert et les plans Box-Behnken. **(Faucher, 2006)**

III.3 Plan Box-Behnken (BBD)

En 1960, Box et Behnken ont proposé ces plans faciles à mettre en œuvre qui permettent d'établir des modèles du second degré dans lesquelles chaque facteur prend trois niveaux (-1, 0 et +1).

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est construit sur un cube dont les points expérimentaux sont placés au milieu, ses arêtes avec une répartition de tous les points expérimentaux à égale distance du centre de domaine d'étude.

Les plans Box-Behnken à trois facteurs contiennent 15 points expérimentaux, dont 12 essais sont situés au milieu de chaque arête.



Matériel et Méthodes

I Matériel expérimentale

I.1 Échantillonnage et traitement

L'essai d'optimisation de production de l'éthanol par voie fermentaire est effectué en utilisant une variété de datte provenant des palmeraies de la région sud-est de l'Algérie plus exactement à Tolga de la wilaya de Biskra. C'est la variété *Tantboucht*, caractérisée par sa forme sphérique, sa couleur noir et sa texture demi molle.



Figure 1: Photographie la variété *Tantboucht*.

Le choix de cette variété se justifie par sa disponibilité, son abondance et sa faible valeur marchande. L'échantillon représentatif est récupéré chez les marchands de datte de la wilaya de Bejaia.

Les fruits ont été nettoyés, coupés à l'aide de ciseau en petit morceau qui seront séchés à l'étuve à 40°C jusqu'à stabilité total du poids. Les dattes ainsi sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique (**IKA-WORKS, TYPE A11.basic**) afin d'obtenir une poudre très fine. Cette dernière est tamisée en utilisant un tamis manuel, et la poudre ainsi obtenue ($\Phi \leq 250 \mu\text{m}$) est conservée à basse température (5°C), à l'abri de la lumière et de l'humidité dans un récipient hermétique et opaque.

I.2 Matériel biologique

La souche choisie pour la production de l'éthanol à partir de la poudre de datte de la variété *Tantboucht*, est isolée à partir du sol. En effet, les échantillons du sol utilisés pour cet objectif sont prélevés de la région Sidi Aich (Bejaïa).

Chaque prélèvement est déposé sur une feuille d'aluminium stérile enveloppé dans des sacs en papier; ensuite transporter au laboratoire dans une glacière pour être utilisé dans les 24 heures.

I.2.1 Technique d'isolement des levures

L'analyse microbiologique comporte la recherche des souches levuriennes issus du sol apporté, qui contient également des bactéries et parfois des moisissures.

L'isolement des levures en vue de leur identification peut donc demander l'emploi de milieux sélectifs dotés des propriétés générales tel que l'addition des antibiotiques.

La solution mère est préparée mélangeant 25g de sol avec de l'eau physiologique. L'ensemble est laissé sous agitation, avant qu'il soit filtré pour récupérer le filtrat qui représentera la solution mère. Cette dernière servira de base pour la préparation de solution décimale dilutions de 10^{-1} jusqu'à 10^{-8} .

La technique d'isolement consiste à ensemencée chaque dilution en surface à l'aide d'un écouvillon sur les deux milieux gélosés (Gélose nutritive et PDA). Les boîtes Pétri ensemencéessont incubées dans une étuve à 30°C pendant 5 jours.

Des colonies prélevées de boîtes incubés, sont repiquées sur le milieu SABOURAUD avec l'addition de chloramphénicol (0.05 g/l) afin d'inhiber la croissance bactériennes. Ces boîtes repiquées sont alors incubées à 30°C, pendant 5 jours selon la méthodologie de **Hammer et al.(1998)**.

I.2.2 Purification des souches de levure

Pour assurer la purification des souches, des isolements successifs sur le milieu SABOURAUD sont effectués. Des colonies sont repiqués successivement par strie sur la gélose de SABOURAUD sur boîtes de pétri. Les boîtes sont incubées dans les mêmes conditions.

I.2.3 Identification des souches de levure

L'identification ne peut être effectuée que sur une souche en culture pure probablement isolée sur le milieu SABOURAUD.

Selon **Bourgeois et Leveau, (1980)** les caractéristiques culturelles, et morphologiques permettent d'identifier le genre par contre les caractéristiques biochimiques permettent de définir l'espèce de la levure.

I.2.3.1 Caractéristiques culturelles

Il s'agit d'examiner l'aspect des cultures en milieu solide, après incubation. Les caractéristiques des cultures sont notées. Elles font appel à la taille, la forme et la pigmentation des colonies de levures (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

I.2.3.2 Caractéristiques morphologiques

Selon **Bourgeois et Leveau (1980)**, les caractéristiques morphologiques des cellules végétatives sont étudiées en utilisant des préparations microscopiques effectuées entre lame et lamelle à partir de cultures en milieu solide.

I.2.3.3 Caractéristiques biochimiques

✦ Fermentation des sucres

Selon **Guirard et Rougieux (1958)**, la capacité ou l'incapacité des levures à fermenter les hydrates de carbone en éthanol et CO₂ est la caractéristique la plus utilisée pour différencier des espèces.

Les milieux sont répartis en tubes renfermant chacun une cloche de Durham. Six sucres sont utilisés : glucose- galactose- maltose- saccharose- lactose- raffinose. Les tubes sont incubés à 25°C pendant 2 à 3 jours pour une première lecture, suivie d'une seconde tous les deux jours pendant 2 semaines.

☺ Assimilation des sucres

Selon **Guirard et Rougieux (1958)**, l'étude de l'assimilation des composés carbonés, est utilisée pour le milieu minéral synthétique gélosé qui ne contient pas d'aliments carbonés.

Verser dans une boîte de Pétri stérile, 2 ml de suspension de levure dans de l'eau de levure puis couler un tube à essais de milieu minéral synthétique fondu et ramener à 40 °C, mélanger. Incubation dans l'étuve à 25 °C jusqu'à ce que la surface de milieu soit

sèche. Déposer en différents points les composés carbonés à tester (glucose, saccharose, lactose, maltose, galactose)

✦ Assimilation de source d'azote

D'après **Guirard et Rougieux (1958)**, toutes les levures ne sont pas aptes à utiliser des sources d'azote. Le milieu minéral synthétique solide, ne contient pas d'aliment azoté. Après, ensemencement de la boîte de Pétri par 1 ml de suspension de levure et solidification, il est déposé en différents points et séparément des traces de nitrate de potassium. Les boîtes sont incubées à 30°C. L'apparition de zone de croissance confirme l'assimilation de l'azote.

Saccharomyces cerevisiae présente un test négatif pour l'assimilation de l'azote.

La souche de la levure, est conservée dans un réfrigérateur à 4°C sur milieu gélose (YPG). A partir de cette souche pure, une série de repiquage sur milieu enrichi est effectuée chaque 15 jours, pour le rajeunissement des cellules, de levure, ce qui permet d'utiliser la souche pour une longue durée.

II Caractérisation physico-chimiques de la poudre de datte

Les analyses physico-chimiques sont effectuées sur la datte entière et sur les produits élaborés expérimentalement à partir de la datte. Les dattes sont lavées et débarrassées de leurs graines puis séchées dans une étuve ventilée à une température de 40°C jusqu'à stabilité total du poids.

II.1 Taux d'humidité

La teneur en eau dans la poudre de datte est évaluée selon la méthode décrite par **A.O.A.C N° 920.151 (1990)**.

Une prise d'essai de 3g de la poudre est séchée dans une étuve ventilée à une température de 103°C (± 2°C) jusqu'à un poids constant. L'humidité est alors calculée selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité} = \frac{PS - PF}{P} \times 100$$

D'où :

PF : poids frais de l'échantillon avant étuvage.

PS : poids sec de l'échantillon après étuvage.

P : masse de la prise d'essai.

II.2 Taux de matière sèche (MS)

La teneur en matière sèche est évaluée selon la méthode décrite par **AFNOR (1986)**. Cette dernière est calculée par la formule suivante :

$$MS\% = 100 - \%Humidité$$

II.3 Taux de cendres totales

Le taux des cendres est évalué selon la méthode décrite par (**NF V 03 922**).

Une prise d'essai 3g de la poudre est incinérée dans un four à moufle pendant 5h à 600°C. Le taux de cendre est calculé par la formule suivante :

$$Teneurencendre = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

D'où :

M₀ : Masse de la capsule vide.

M₁ : Masse (capsule plus échantillon) avant incinération (g).

M₂ : Masse de capsule plus cendre après incinération (g).

II.4 Potentiel d'hydrogène (pH)

Le potentiel hydrogène de la poudre est évalué à l'aide d'un pH mètre selon la méthode décrite par **AFNOR (1982)**. Une prise d'essai de 1g est dissoute dans un volume de 50 ml d'eau distillée, et l'ensemble est laissée sous agitation pendant 30 minutes. Une fois filtré, la mesure est réalisée en trois répétitions.

II.5 Acidité titrable

La mesure de l'acidité est réalisée selon la méthode décrite par **Verma et joshi (2000)**. Une prise d'essai de la poudre est mélangée avec de l'eau distillée, et l'ensemble est met sous reflux sous réfrigérant pendant 30 minutes avant d'être filtré. Le titrage est réalisé à température ambiante avec une solution de NaOH à (0.1N) sous agitation après

avoir ajouté de la phénolphtaléine. Le titrage est arrêté lors de l'apparition d'un virage de couleur.

La teneur en acide titrable est exprimée en g d'équivalent d'acide citrique dans 100g de poudre, est calculée selon la formule qui suit :

$$\text{Acidité (g/100g)} = (\text{Nb} \times \text{Vb} \times \text{M}) / (\text{Va} \times \text{P})$$

D'où :

M: Masse molaire de l'acide citrique (192,13 g/mol).

V_a: Volume en millilitres de la prise d'essai.

V_b: Volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé.

N_b: Normalité de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé (0,1 N).

P : Nombre de protons (3).

II.6 Teneur en sucres totaux

La teneur en sucres totaux est déterminée par la méthode de **Dubois (1956)**. Une prise d'essai de 250 mg de la poudre est mélangée avec 25 ml d'eau distillé, et laissée sous une agitation pendant 45 minutes à température ambiante. Une fois filtrée, un volume de 10 ml est additionné avec 750 µl de sels CAREZ I et CAREZ II (**Annexe VII**), qui sera ainsi laissé décanter pendant 30 minutes. Une filtration est réalisée afin de récupérer le filtrat.

Pour un volume de 1 ml du filtrat sont ajoutés respectivement, 1 ml de phénol à 5% et 3 ml d'acide sulfurique, le mélange est mis à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à une température ambiante. L'absorbance est mesurée à 550nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un témoin.

La teneur en sucres totaux dans la poudre de datte est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage qui est réalisée en utilisant le glucose (**Annexe IX**) dans les mêmes conditions opératoires.

II.7 Teneur en sucres réducteurs

Le dosage des sucres réducteurs est réalisé selon la méthode décrite par **Miller (1959)**. Une prise d'essai de 250 mg de la poudre est mélangée avec 25 ml d'eau distillé. Le mélange agité pendant 45 min à température ambiante est filtré.

Un volume 200µl sont alors additionné de 300 µl de DNS (**Annexe VIII**), et subiun chauffage dans un bain marie à 100°C pendant 5 minutes. Après chauffage, 1.5 ml d'eau distillé, est ajouté au mélange qui sera laissé à l'abri de la lumière pendant 15 min. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La teneur en sucres réducteurs dans la poudre est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant le glucose(**Annexe X**).

II.9 Teneur en saccharose

La teneur en saccharose est obtenue par la différence entre la teneur en sucrestotaux etles sucres réducteurs présents dans l'échantillon. Audigie (1980)

$$\text{Saccharose}\% = [\text{sucretotaux}\% - \text{sucreréducteurs}] \times 0.95$$

II.8 Teneur en protéines

Le dosage des protéines totales est réalisé selon la méthode de **Bradford (1976)**. Cette méthode colorimétrique permet de déterminer la concentration d'une solution protéique.

Une prise d'essai de 250 mg de la poudre est diluée dans 25 ml d'eau distillé. L'ensemble est agité pendant 30 minutes, avant d'être filtrée.

Un volume de 100 µl est additionné de 3 ml de bleu de coomassie(**Annex VI**), et l'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un témoin.

La teneur en protéines de la poudre est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée en utilisant la BSA dans les mêmes conditions opératoires (**Annexe XI**).

II.10 Dosage de l'azote total

L'azote total est dosé après minéralisation par volumétrie selon la méthode de **Kjeldahl (1889)**. Une prise d'essai de 10 mg de la poudre de datte est introduite dans un matras de minéralisation, auquel une pincé du catalyseur sulfate de cuivre et sulfate d'ammonium est ajouté. À ce mélange 20 ml d'acide sulfurique concentré est ajouté. L'ensemble est chauffé à froid pendant 15 min jusqu'à apparition d'une vapeur blanche d'anhydride sulfurique. L'ensemble est alors laissé au chauffage à chaud pendant 4 à 5 heures.

Après décoloration complète, la solution est refroidie et complétée jusqu'à un volume de 250 ml avec de l'eau distillée. La distillation est alors réalisé juste après la minéralisation en prélevant un volume de 20 ml de la solution minéralisée à la quel de la soude est ajoutée.

Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré (le bleu de méthylène et le rouge de méthylène), et l'excès d'ammoniac est dosé avec l'acide sulfurique à 0.05N. La teneur en azote est déterminée par la formule suivante :

$$N = 14 \times N_A \times V_A \times d/V_0$$

D'ou

N_A : Normalité de l'acide.

V_A : Volume, en ml de l'acide versé.

V_0 : Volume en ml de la prise d'essai.

d : dilution de la fraction considéré.

II.11 Détermination de la teneur en alcool

La teneur en alcool peut être déterminée de plusieurs façon : par pycnomètre, aéromètre, ébulliométrie, méthode enzymatiques, CPG et dosage chimique.

Actuellement il existe des méthodes rapides pour la détermination de la teneur en alcool, a l'aide d'instrument dédié à cet effet, ainsi dans notre étude le taux d'éthanol a été déterminé a l'aide d'un appareillage appelé Fermento Flash FUNKE GERBER.

II.12 La viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire de *S.cerevisiae* est déterminée par un comptage, après coloration bleu de méthylène, sur hématimètre (**cellule de Malassez**) sous microscope ($G \times 100$) selon la méthode décrite par **Ould et al. (2006)**.

La coloration au bleu de méthylène permet de séparer les cellules vivante de celle morte. Ce colorant pénétré facilement dans la cellule que vite soit éliminé dans les cellules vivante tandis qu'il persiste dans les cellules mortes.

La proportion relative des cellules colorées ou non est un reflet exact du nombre de cellules vivantes ou mortes et donc de la viabilité de l'ensemble de la population cellulaire.

Un volume de 100 μ l du moût de fermentation avec l'ajouté du même volume de bleu de méthylène, après en remplir complètement la chambre de comptage avec la suspension cellulaire préalablement homogénéisée. Lissée sédimentée les cellules sur le quadrillage pour quelque minutes puis en compte. (**Annexe XIV**).

Peut alors calculer le % de viabilité d'une suspension cellulaire :

$$\% \text{Viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes comptées}}{\text{Nombre de cellules totales comptées (vivant + mortes)}} \times 100$$

III Milieu de fermentation

La datte est connue par sa faible teneur en éléments nutritifs, essentiellement en protéines et en sels minéraux, nécessaire pour la multiplication des levures et une meilleure production du bioéthanol.

Plusieurs travaux démontrent qu'un enrichissement de la poudre de datte par des apports ; en urée (50mg/100ml), en K_2HPO_4 (125mg /100ml), $ZnCl_2$ (8mg /100ml), est très nécessaire pour améliorer la production du bioéthanol par les levures (**Ould et al. ,2012 ; Mei et al., 2008; Singh et al.,2012**).

III.1 Conduite de la fermentation

La production de bioéthanol dépend directement de la croissance et du développement de microorganismes. Cette croissance est influencée par plusieurs paramètres nutritifs et physico chimiques. Afin d'atteindre l'optimum de la production une étude préliminaire de l'influence de certains paramètres s'impose nécessaire.

III.2 Etude préliminaire

La fermentation submergée est réalisée dans des erlenmeyers inoculés par une charge des levures, et l'ensemble est laissé incuber à 30°C, sous agitation, durant une période qui s'étend de 48 jours jusqu'à 5 jours.

À la fin de chaque essai, plusieurs dosages sont réalisés : dosage des protéines, sucres totaux et réducteurs, ainsi que le taux de production de l'éthanol.

III.3 Influence de la concentration du substrat et du temps d'incubation sur la production d'éthanol

Des erlenmeyers de 250ml contenant de la poudre de datte a différentes concentrations (3g, 5g, 8g, 10g) sont additionnés d'un volume de 100ml d'eau distillée. Les erlenmeyers ainsi préparés sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Une fois refroidis, 1ml de suspension levuriennes est ajouté à chaque erlenmeyer, et ces derniers seront incubés à 30°C pendant 48, 72, 96 heures.

Le choix de temps d'incubation de la fermentation est effectué après plusieurs essais préliminaires réalisés au laboratoire, les temps choisis sont de 48h, 72h et 96h. D'après les résultats d'**Amadi et Ifeanacho, (2016)** la meilleure production de l'éthanol par les espèces de levure oscille entre 2 à 4 jours.

IV Optimisation des paramètres de production du bioéthanol par le plan d'expérience Box-Behnken

Le choix des paramètres à optimiser à savoir la température, le pH et la concentration en sulfate d'ammonium est basé sur les résultats de plusieurs études et autres. (**Amadi et Ifeanacho, 2016 ; Arrego-Lopez et al., 2009 ; Bjaafri, 2008 ; Zarifa et al., 2013**).

IV.1 Choix de la température

Selon plusieurs études, la température optimale de la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* est de 30°C à 40°C (**Louhichi et al., 2012 ; Yan et al., 2012 ; Zarifa et al., 2013**).

IV.2 Choix du pH

La levure *Saccharomyces cerevisiae*, comme toutes les autres levures, présente l'avantage de croître dans les milieux acides contrairement à la plupart des bactéries.

Dans cette étude, le choix de variation de paramètre pH est fixé entre 3-5, pour éviter les contaminations bactériennes. Le choix de cet intervalle est justifié par les résultats de plusieurs études tels que (**Ghobrini, et al., 2013 ; Khaled et al., 2014 ; Tesfaw et Assefa, 2014 ; Yan et al., 2012**).

IV.3 Choix de source d'azote (NH₄)₂SO₄

Les microorganismes ont besoin de substances azotées pour synthétiser les substances protéiques nécessaires à sa croissance et à son fonctionnement.

La provenance de cet azote peut se faire par fixation directe de l'azote atmosphérique ou par incorporation de composés azotés.

Pour la majorité des levures, sont totalement incapables de synthétiser les substances azotées indispensables à leur structure, et leur croissance exige l'apport, dans les milieux de culture, de composés inorganiques (ammoniac, sulfates d'ammonium, nitrites, nitrates).

D'après l'étude de **Mei et al. (2008)** portant sur l'optimisation des conditions de fermentation de la production de bioéthanol à partir de sous-produit de tige de sorgho sucré ont démontré l'efficacité des sels de sulfates d'ammonium dans l'augmentation de taux de production de bioéthanol. Ces auteurs ont démontré que le meilleur rendement est atteint avec de l'ajout de sulfate d'ammonium aux alentours de 0.244g/100ml.

A cet effet, le choix des seuils d'ajout de sulfates d'ammonium est fixé à l'intervalle de 0.1 à 0.3%.

IV.4 Application du modèle Box-Behnken pour l'optimisation de la production.

Une fois les paramètres optimaux déterminés, l'optimisation de la production de bioéthanol est réalisée en employant le plan de surface et de réponse (RSM) avec trois niveaux (-1, 0, 1) pour chaque paramètre choisis respectivement (X₁, X₂, X₃) sont mis en place.

Le modèle Box-Behnken est appliqué pour étudier l'influence des paramètres sélectionnés sur la production de bioéthanol. Les niveaux bas, moyen et haut de chaque variable sont représentés dans le tableau suivant

Tableau I: Les niveaux des paramètres choisis

Facteurs	Niveau bas (-1)	Niveau centré 0	Niveau haut (+1)
X1 (Température en °C)	25	35	45
X2 (pH)	3	4	5
X3 [(NH ₄) ₂ SO ₄ en g/100ml]	0.1	0.2	0.3

Le modèle expérimental du plan Box-Behnken est représenté dans le tableau qui suit :

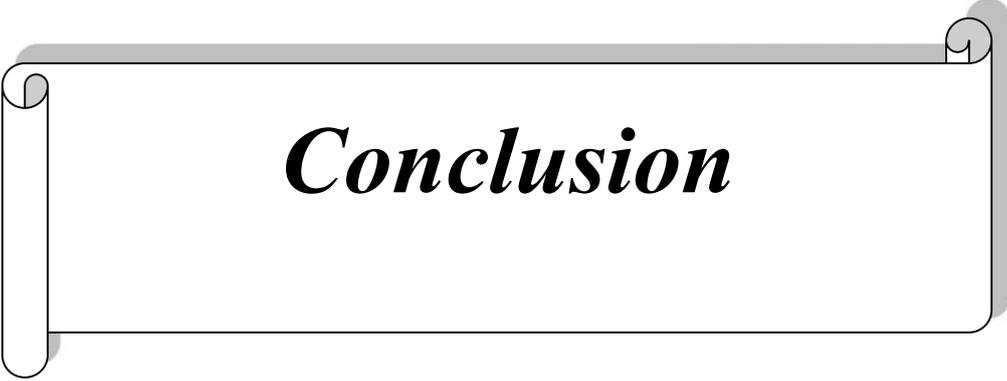
Tableau II : Matrices d'expérimentation du plan Box-Behnken.

Essai N°	T (°C)	pH	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/100ml)
1	25	4	0.3
2	35	5	0.3
3	35	4	0.2
4	25	5	0.2
5	45	5	0.2
6	25	3	0.2
7	35	4	0.2
8	35	4	0.2
9	25	4	0.1
10	35	3	0.1
11	35	3	0.3
12	35	5	0.1
13	45	4	0.1
14	45	4	0.3
15	45	3	0.2

IV.5 Etude statistique

Les résultats obtenus sont exprimés par une moyenne plus ou moins un écart-type. L'analyse de ces résultats est réalisée par le logiciel R, basé sur l'analyse de la variance.

D'une autre part, les résultats expérimentaux obtenus par le plan d'expérience Box-Benhken sont analysés par le logiciel JMP10.



Conclusion

Conclusion

La production du bioéthanol aide les agriculteurs et permet la création des emplois domestiques car ce dernier est utilisé comme solution de rechange à l'essence qui fournit plusieurs avantages clés, ce qui est relativement peu coûteux. Il est également considéré comme un moyen de réduire les gaz à effet de serre provenant de l'utilisation de combustibles fossiles et réduire le réchauffement climatique provoqué par l'homme.

Dans la présente étude, La fermentation submergée de la poudre de datte *Tantboucht* pour produire du bioéthanol est étudiée en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* isolée à partir d'un échantillon du sol et en appliquant le modèle Box-Behnken qui est une approche utile pour déterminer les conditions optimales pour une production maximale à trois facteurs, à savoir la température, le pH, et la concentration en sulfate d'ammonium (NH) SO .

Les résultats obtenus montrent que les meilleures conditions de production de bioéthanol à partir la variété de date étudié sont respectivement ; la température à 31.18° C, le pH de 3.75 et une concentration en (NH) SO de 0.23 g/ml avec une période d'incubation de 96 heures. Ces conditions permettent un taux de production de bioéthanol maximal qui oscille aux alentours de 2.85g/100g de poudre de date.

Les résultats obtenus montrent que les facteurs choisis influence significativement sur le taux de production. Les valeurs de taux de bioéthanol mesurée sont très proches des valeurs prédites.

La présente étude a permis aussi de déterminer les caractéristiques physico-chimiques de la variété *Tantboucht*, les analyses montrent que le taux d'humidité est de 14.51% (MS) cette valeur favorise la conservation de la datte pour une longue durée. Le taux de cendres 1.99 %, le dosage des sucres totaux, réducteurs et les protéines révèle que leurs teneurs sont respectivement de 78.78%,37.18% et 1.007% (MS).L'acidité 0.13 g/l à pH 4.8, matière sèche 84.36% et un taux d'azote total de 0.7 %.

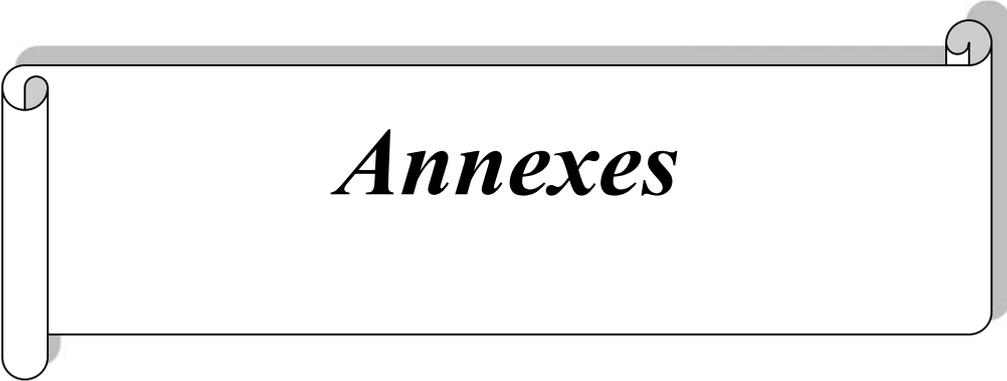
D'après les résultats de la présente étude, la variété *Tantboucht* à faible valeur marchande peut être considère comme une solution de choix pour la production du bioéthanol dans le but de remplacer les combustibles fossiles, et également une source de revenus à l'économie national

L'ensemble des résultats obtenus permettent de dégager de nombreuses perspectives et dans le but de compléter ce travail, il serait souhaitable :

- ▶ D'élargir l'application du modèle Box-Behnken sur d'autres produits, et avantager son utilisation au niveau industriel ;
- ▶ D'élargir l'étude sur d'autres variétés de datte existantes en Algérie et différents régions ;
- ▶ D'optimiser d'autres facteurs influençant la production de bioéthanol tels que le la concentration d'inoculum et la concentration du substrat.



Références bibliographiques

A decorative scroll-like frame with a grey shadow, containing the word "Annexes" in a bold, italicized serif font.

Annexes

Annexes

Annexe I : : Teneur en eau de quelques variétés de dattes de la région fliache (Biskra), en % (NOUI ,2007)

Variétés	Consistance	Teneur en eau
Deglet-Nour	Demi-molle	22.60
Mech-Degla	Sèche	13.70
Ghars	Molle	25.40

Annexes II : Superficie et nombre de palmiers comptés en Algérie

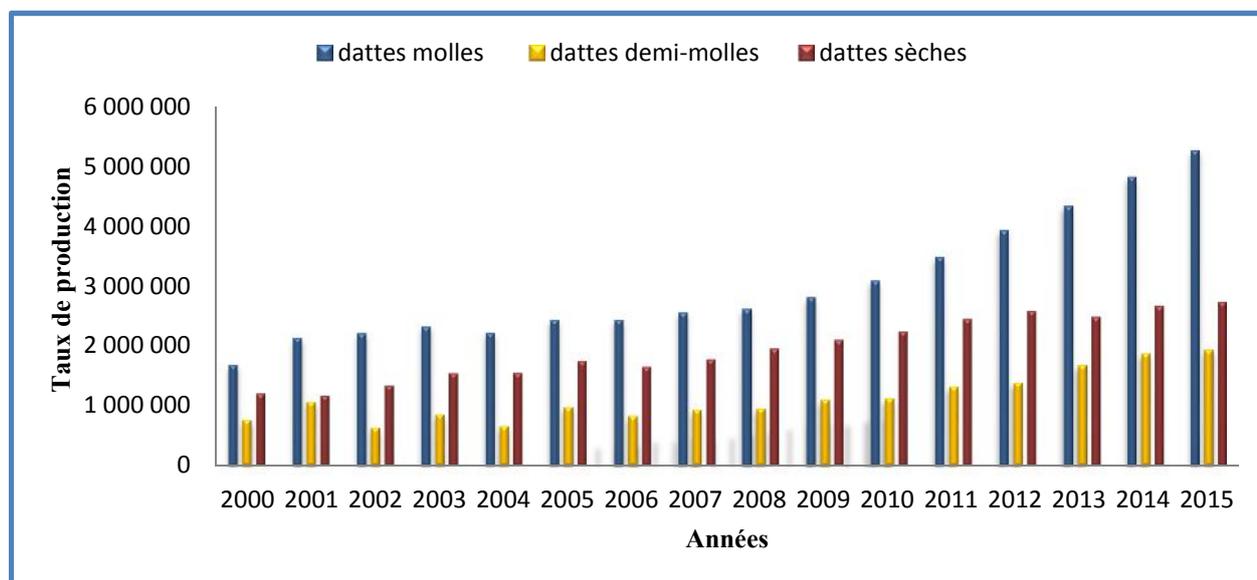
WILAYAS	Superficie occupée	Dattes demi-molles	Dattes molles et Analogues	Dattes sèches et Analogues
	ha	Nbre d'arbre	Nbre d'arbre	Nbre d'arbre
ADRAR	28 326	0	0	3 798 965
LAGHOUAT	318	10 500	14 160	12 616
BATNA	193	8 656	9 033	10 977
BISKRA	42 911	2 659 679	558 827	1 096 592
BECHAR	14 121	0	1 404 938	234 894
TAMANRASSET	7 003	0	0	688 947
TEBESSA	816	39 400	22 400	0
DJELFA	101	6 800	2 500	800
M'SILA	0	0	0	0
OUARGLA	21 977	1 403 565	990 372	182 645
EL-BAYADH	639	19 800	15 900	28 200
ILLIZI	1 254	7 758	77 585	43 760
TINDOUF	434	0	45 206	0
EL-OUED	36 680	2 452 250	717 389	618 810
KHENCHELA	766	51 200	61 300	11 542
NAAMA	506	3 840	46 760	0
GHARDAIA	10 848	531 250	225 600	489 660
TOTAL	166 893	7 194 698	4 191 970	7 218 408

Annexes

Annexes III : Taux d'accroissement production des dattes en Algérie 2014/2015

Les variétés	Production en 2014			Production en 2015			Taux d'accroissement 2014/2015 %		
	Nbre d'arbres en rapport	Production (qx)	Rdt kgs/arbre	Nbre d'arbres en rapport	Production (qx)	Rdt kgs/arbre	Nbre d'arbres en rapport	Production (qx)	Rdt kgs/arbre
Palmiers dattiers	15 090 935	9 343 772	61,9	15 508 590	9 903 770	63,9	3	6	3
Deglet - nour	6 167 511	4 809 996	78,0	6 395 546	5 249 495	82,1	4	9	5
Dattes molles	3 140 349	1 870 955	59,6	3 228 407	1 928 537	59,7	3	3	0
Dattes sèches	5 783 075	2 662 821	46,0	5 884 637	2 725 738	46,3	2	2	1

Annexes IV : La production des dattes en Algérie 2000-2015 (DSASI, 2015).



Annexes

Annexes V : Préparation de milieu de culture YPG

✦ Extrait de levure.....	10g.
✦ Peptone	10g.
✦ Glucose.....	20g.
✦ Agar.....	17g.
✦ L'eau distillée	1L.
✦ pH.....	6 ,5.

Annexes VI : Composition du réactif de Bradford

✦ BBC G-250.....	100 mg.
✦ Ethanol absolu	50 ml.
✦ Acide phosphorique à 85%.....	100 ml.
✦ Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.	
✦ Conservation pendant 3 semaines à 4 °C et à l'abri de la lumière.	

Annexes VII : Composition des solutions CAREZ

La solution CAREZ I

✦ Acétate de zinc trihydraté.....	23.8g.
✦ Acide acétique glaciale	3g.
✦ Eau distillé.....	100ml.

La solution CAREZ II

✦ Ferrocyanure de potassium.....	10.6g.
----------------------------------	--------

Annexes

⊕ Eau distillé100ml.

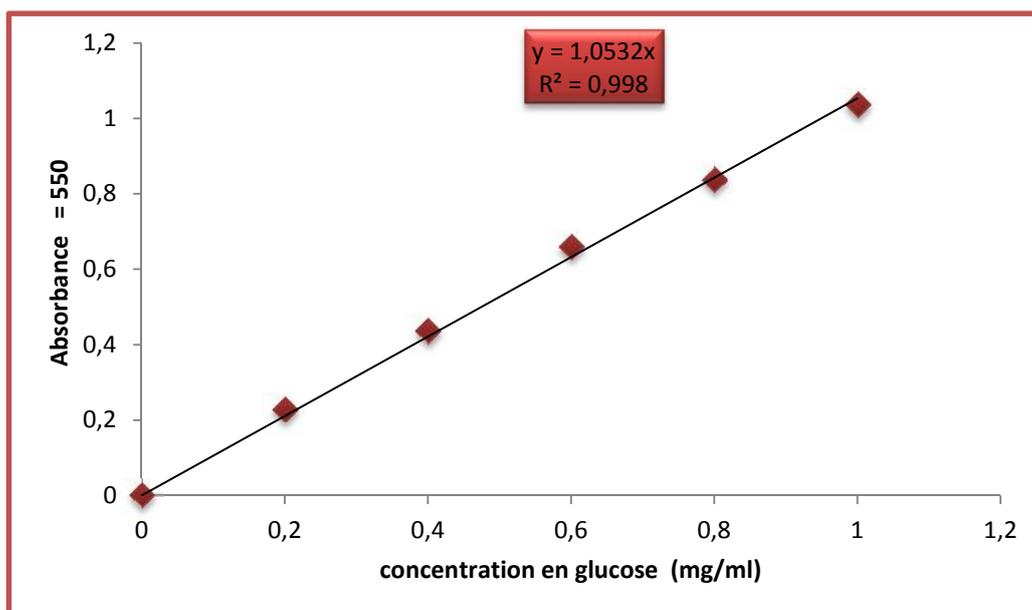
Annexes VIII : Préparation de réactif DNS

⊕ DNS.....1g.
⊕ Soude.....1.5g.
⊕ Tartrate double de sodium-potassium.....30g.
⊕ L'eau distillé.....100ml.

Phénol à 5%

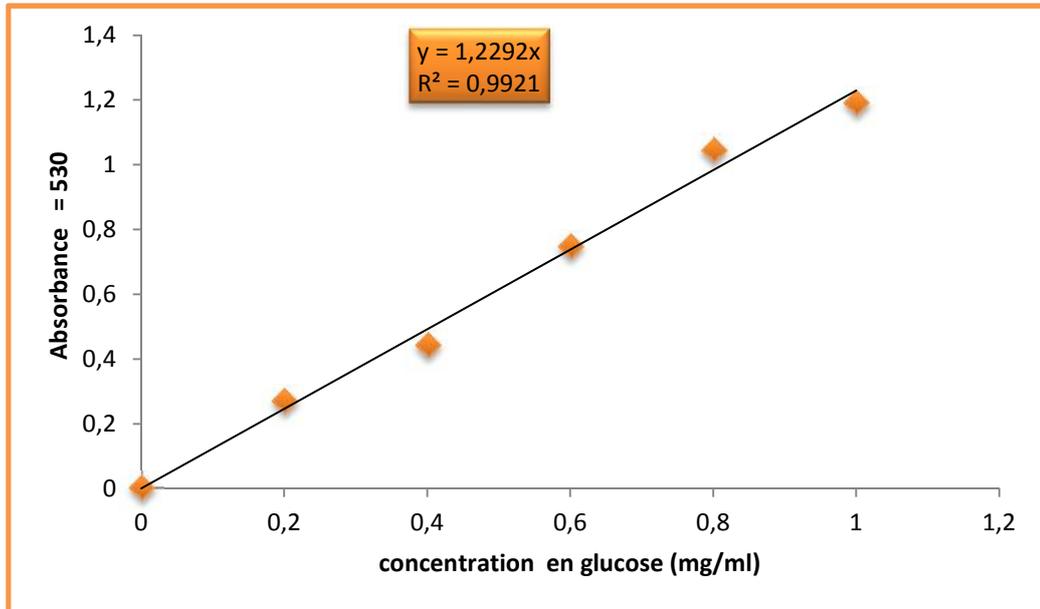
⊕ Phénol5g.
⊕ L'eau distillée100ml.

Annexes IX : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des sucres totaux

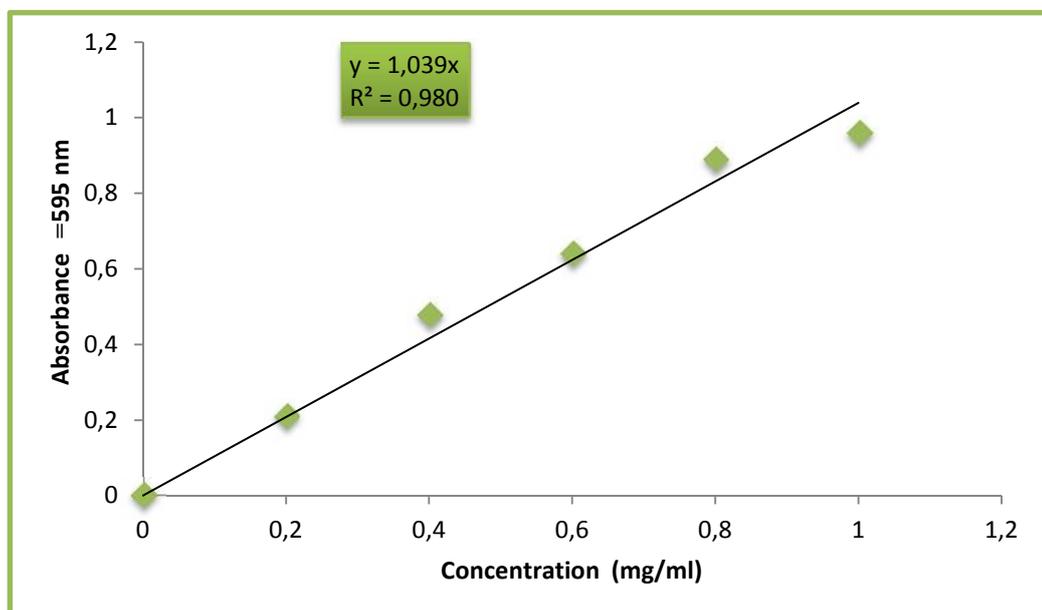


Annexes

Annexes X : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des sucres Réducteurs



Annexes XI : Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des protéines

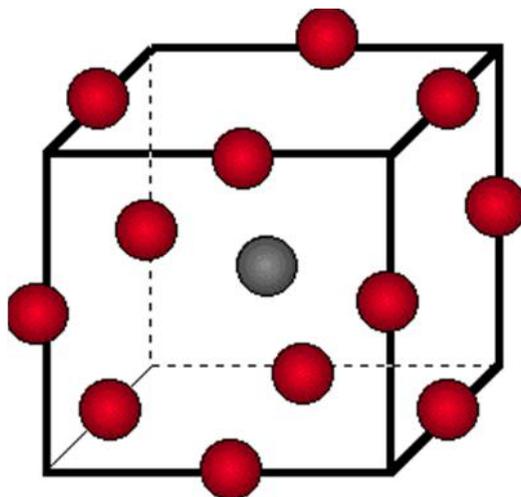


Annexes

Annexe XII : Tableaux récapitulatif des expériences du plan de box-behnken pour trois facteurs (Goupy, 2006)

Essai N°	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Annexes XIII : Le modèle Box-Behnken pour trois facteurs

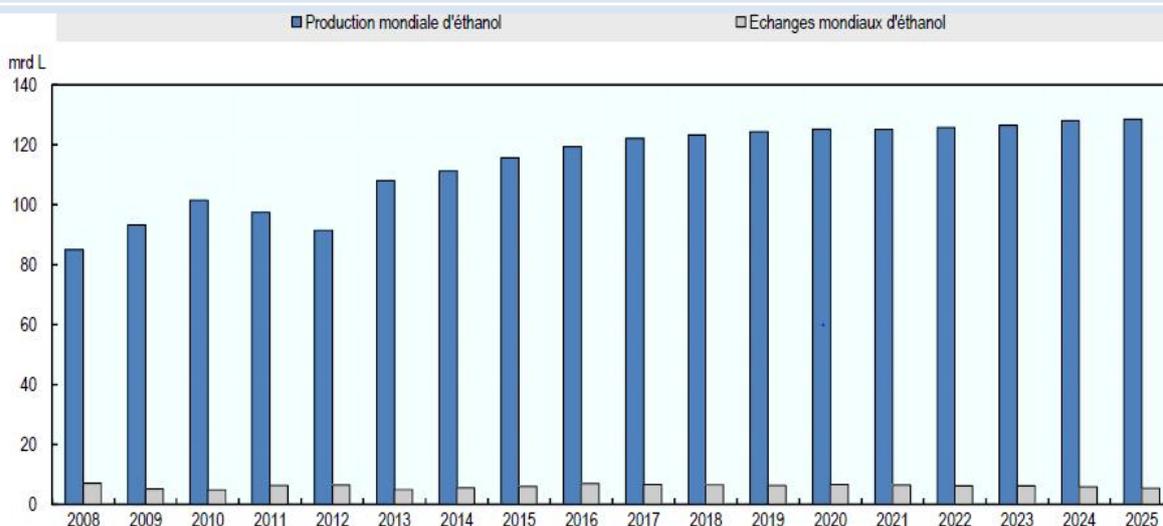


Annexes

Annexe XIV : Effets des différents paramètres physico-chimiques sur la viabilité cellulaire en comparant avec la productivité.

N° d'essais	T (°C) X1	pH X2	(NH ₄) ₂ SO ₄ X3	viabilité %	bioéthanol(%)
1	25	4	0,3	15	2,26
2	35	5	0,3	12	1,49
3	35	4	0,2	20	2,49
4	25	5	0,2	21	2,7
5	45	5	0,2	10	0,79
6	25	3	0,2	12	2,03
7	35	4	0,2	20	2,42
8	35	4	0,2	18	2,39
9	25	4	0,1	15	2,3
10	35	3	0,1	11	0,93
11	35	3	0,3	23	2,68
12	35	5	0,1	11	1,15
13	45	4	0,1	6	0,59
14	45	4	0,3	15	2,33
15	45	3	0,2	27	2,85

Annexe XV: production et échange mondiaux d'éthanol



Source : OCDE/FAO (2016), « Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO », *Statistiques agricoles de l'OCDE* (base de données), <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-fr>.

StatLink  <http://dx.doi.org/10.1787/888933386601>

Annexes XVI : Milieu eau de levure

- ✦ Extrait de levure5g
- ✦ Eau distillée1000 ml
- ✦ Ajuster à pH= 7

Annexes XVII : Milieu minérale synthétique gélosé

- ✦ SO₄ (NH₄)₂0,5 g
- ✦ PO₄KH₂0,1g
- ✦ SO₄Mg₇H₂O0,05 g
- ✦ Agar2 g
- ✦ Eau distillée100 ml

Se milieu est stérilisé pendant 15 minutes à 110c°.

Annexes VIII : Milieu minéral synthétique ne contient pas d'aliment azoté

- ✦ PO₄KHM₂0,1g
- ✦ SO₄Mg₇H₂ O 0,05 g
- ✦ Glucose..... 2 g

Annexes

- ✦ Agar2 g
- ✦ Eau distillée100 ml

Résumé

La présente étude s'intéresse à optimiser la production du bioéthanol d'une culture discontinue de *Saccharomyces cerevisiae* à partir de la datte *Tantboucht* (*Phoenix dactylifera* L). En appliquant la méthode de surface de réponse (RSM), le modèle Box-Behnken a été réalisée à trois niveaux (-1,0 et 1), Dans le but de déterminer les conditions optimales pour une production maximale. Trois paramètres à savoir, la température (X1), le pH (X2) et la concentration en sulfate d'ammonium (X3), ont été choisis pour observer l'effet. Les valeurs optimales de ces paramètres étaient de 31.18°C, pH 3.75 et 0.23 g/ml, respectivement.

Les caractéristiques physico-chimiques de la datte (pH, humidité, matière sèche, acidité, cendres, sucre totaux, sucre réducteurs, protéines, et l'azote total) ont été mesurées dans ce travail.

Mots-clés: datte, *Phoenix dactylifera* L., optimisation, *Saccharomyces cerevisiae*, Box-Behnken, Bioéthanol.

Abstract

The objective of this study is to optimize the production of bioethanol from a discontinuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* from the date *Tantboucht* (*Phoenix dactylifera* L). By applying the Response Surface Method (RSM), the Box-Behnken model was performed at three levels (-1.0 and 1), with the aim of determining the optimum conditions for maximum production. Three parameters, namely temperature (X1), pH (X2) and ammonium sulfate (X3) concentration, were chosen to observe the effect. Optimal values of these parameters were 31.18 ° C, pH 3.75 and 0.23 g / ml, respectively.

The physico-chemical characteristics of the date (pH, moisture, dry matter, acidity, ash, total sugar, reducing sugar, proteins, and total nitrogen) were measured in this work.

Keywords: date, *Phoenix dactylifera* L., optimization, *Saccharomyces cerevisiae*, Box-Behnken, Bioethanol.