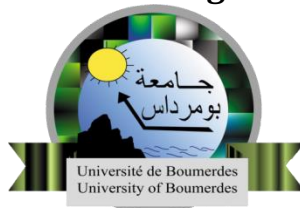


République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أمحمد بوقرة بومرداس
Université M'Hamed Bougera de Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de
Master II

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

**Essai de production du bioéthanol à partir d'une
biomasse végétale lignocellulosique : Les grignons
d'olives**

Réalisé par :
DJEBROUNI Nesrine
HAMMANI Baya

Le jury :

M ^{me} AIT SLIMANE- AIT KAKI S.	Professeur	UMBB	Président
M ^{me} AMELLAL-CHIBANE H.	Professeur	UMBB	Examineur
M ^{me} SAHIR- HALOUANE F.	Professeur	UMBB	Promoteur

Année universitaire : 2020/2021



Remerciement

Nous exprimons d'abord les grands remerciements et notre profonde reconnaissance à notre promotrice Madame SAHIR-HALOUANE. F professeur au département d'Agronomie à l'université de l'UMBB à Boumerdes de nous avoir fait confiance et proposé ce sujet. Son soutien, ses encouragements et ses précieux conseils ainsi que son suivi, nous ont beaucoup soutenus pour mener à bien ce travail.

On remercie beaucoup notre Co. Promotrice Mlle OUKALI. Z Son dynamisme, son suivi et ses encouragements demeureront pour nous un bon souvenir.

Nos remerciements s'adressent également à Madame AIT SLIMANE-AITKAKI S. Professeur au département de Biologie à l'université de l'UMBB à Boumerdes, pour avoir accepté d'évaluer ce modeste travail et de présider le jury.

Nous adressons nos remerciements et exprimons notre gratitude à Madame AMELLEL-CHIBANE H professeur au département de Biologie de l'université de l'UMBB Boumerdes qui nous a fait l'honneur d'accepter de critiquer ce travail.

Un vibrant hommage est adressé au Professeur HAMADA B, Doyen de la FHC UMBB qui nous a ouvert son laboratoire en ce temps de crise sanitaire. Sans son aide, ce travail ne sera jamais réalisé Nous oublierons jamais vos orientations et votre aide.

Merci professeur pour tout !

Enfin, un grand Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ce travail





A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A tous les membres de ma famille, en témoignage de mon profond attachement.

A tous mes

amis

A mon binôme

Nesrine

A la ma promotion BTM 2021.

Baya
Baya





Dédicaces

*A la mémoire de tous mes proches disparus, que leurs
âmes reposent en paix A la mémoire de mon cher frère
Mohammed*

*Je dédie ce travail aux êtres, les plus chers au monde :
mes parents. Quoi que je fasse je ne pourrais leur
rendre ce qu'ils ont fait pour moi, j'espère rester à la
hauteur de vos espoirs.*

*Si je suis arrivé là, c'est bien grâce à eux. Que Dieu le
tout puissant vous procure, santé et longue vie et vous
protège.*

*A mes chers frères Hakim et Mourad
A mes adorables sœurs Djamila et Asma*

*Merci pour votre amour, votre aide, votre assistance et
votre compréhension.*

A mes Amies

Amon binôme Baya

Nesrine



Résumé :

L'industrie de l'huile d'olive est un secteur en plein croissance dans les pays méditerranéens. L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile d'olive vierge laisse deux résidus : l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons). Malheureusement, presque la moitié du poids total des olives sont jetés sous forme de grignon d'olive, un déchet solide très polluant pour l'environnement. La valorisation de ces déchets s'avère indispensable pour atténuer leur effet pollueur. C'est dans ce sens que notre contribution s'oriente en valorisant une biomasse lignocellulosique (BLC), les grignons d'olives pour la production d'éthanol par un procédé de fermentation en discontinu. Une analyse de quelques paramètres physicochimiques des grignons utilisés a montré une HR de 7% et un taux de cendres de 1,76%. Le suivi de la fermentation sur le moût des grignons d'olives a fait ressortir une évolution de la biomasse levurienne de 10^7 UFC/ml à $1.47 \cdot 10^7$ UFC/ml du 1^{er} jour au 6^{ème} jour de la fermentation. La croissance de la levure est accompagnée d'une acidification de milieu, en effet le pH a diminué de 6.4 (1^{er} jour) pour atteindre 5.9 au 9^{ème} jour. Après 9 jours de fermentation, nous avons pu détecter par le procédé de distillation une production d'éthanol par notre levure. A l'issue de cette étude, on peut recommander l'utilisation des déchets d'huile d'olive « grignons d'olive » comme substrat de fermentation pour la levure *S. cerevisiae*. Ce type de valorisation s'avère un procédé efficace pour neutraliser l'effet polluant des déchets d'huile d'olive qui sont produits en très grandes quantités en Algérie et dans toute la région méditerranéenne.

Mots clés : Biomasse lignocellulosique (BLC), grignons d'olives, valorisation, fermentation, *S.cerevisiae*, distillation, éthanol.

Abstract:

The olive oil industry is a growing sector in Mediterranean countries. The olive industry, in addition to its main production, which is virgin olive oil, leaves two residues: one liquid (vegetable water) and the other solid (pomace), unfortunately, almost half of the total weight olives are thrown away in the form of olive pomace, a solid waste very polluting for the environment. The recovery of this waste is essential to mitigate its polluting effect. It is in this direction that our contribution is oriented by enhancing a Lignocellulosics biomass (BLS), olive pomace for the production of ethanol by batch fermentation process. An analysis of some physicochemical parameters of the pomace used showed an RH of 7% and an ash content of 1.76%. The monitoring of the fermentation of *S. cerevisiae* on the must of olive pomace revealed an evolution of the yeast biomass from 10^7 CFU / ml to $1.47 \cdot 10^7$ CFU / ml from the 1st day to the 5th day of the fermentation. The growth of the yeast is accompanied by acidification of the medium, in fact the pH has decreased from 6.4 (1st day) to reach 5.9 on the 9th day. After 9 days of fermentation, we were able to detect by the distillation process an ethanol production by our yeast. At the end of this study, we can recommend the use of olive pomace waste olive oil as a

fermentation substrate for the yeast *S. cerevisiae*. This type of valorization proves to be an effective process to neutralize the polluting effect of olive oil waste, which is produced in such large quantities in Algeria and throughout the Mediterranean region...

Keywords: Lignocellulosics biomass (BLC), olive pomace, recovery, fermentation, *S. cerevisiae*, distillation, ethanol

المخلص :

تعتبر صناعة زيت الزيتون قطاعاً متنامياً في دول البحر الأبيض المتوسط. صناعة الزيتون، بالإضافة إلى إنتاجها الرئيسي وهو زيت الزيتون البكر، يترك بقايا: أحدهما سائل (ماء نباتي) والآخر صلب (ثفل)، للأسف، يتم التخلص من نصف إجمالي وزن الزيتون تقريباً على شكل زيتون الثفل، نفايات صلبة شديدة التلوث للبيئة. إن استعادة هذه النفايات أمر ضروري للتخفيف من تأثيرها الملوّث. في هذا الاتجاه يتم توجيه مساهمتنا من خلال تقييم الكتلة الحيوية (BLC) وثفل الزيتون لإنتاج الإيثانول عن طريق عملية التخمير على دفعات. أظهر تحليل بعض المتغيرات الفيزيائية والكيميائية للثفل المستخدم رطوبة نسبية 7٪ ومحتوى رماد 1.76٪. كشفت مراقبة تخمر *S. cerevisiae* على ضرورة ثفل الزيتون عن تطور الكتلة الحيوية للخميرة من 10^7 CFU / ml إلى $10^{1.47}$ CFU / ml من اليوم الأول إلى اليوم الخامس من التخمير. يصاحب الخميرة تحمض الوسط، في الواقع انخفض الرقم الهيدروجيني من 6.4 (اليوم الأول) إلى 5.9 في اليوم التاسع بعد 9 أيام من التخمير، تمكنا من اكتشاف عملية التقطير لإنتاج الإيثانول بواسطة الخميرة. في نهاية هذه الدراسة، يمكننا أن نوصي باستخدام نفايات زيت الزيتون من ثفل الزيتون كركيزة تخمير لخميرة *S. cerevisiae*. يثبت هذا النوع من التقييم أنه عملية فعالة لتحييد التأثير الملوّث لمخلفات زيت الزيتون التي يتم إنتاجها بكميات كبيرة في الجزائر وفي جميع أنحاء منطقة البحر الأبيض المتوسط.

الكلمات المفتاحية: الكتلة الحيوية (BLC) lignocellulosique ، ثفل الزيتون، الانتعاش، التخمير، *S. cerevisiae*، التقطير، الإيثانول.

Table des matières	
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux	VI
Liste des abréviations	VII
Introduction générale.....	2
I-1 La biomasse végétale	5
1-1 Définition et source	5
1-2 Composition de la biomasse végétale	5
1-3 Le mode de conversion de la biomasse végétale.....	5
I-2 Le substrat lignocellulosique	6
2-1 Caractéristiques du substrat lignocellulosique	6
2-1-1 La cellulose.....	6
2-1-2 Les hémicelluloses.....	6
2-1-3 La lignine	7
2-2 Traitements des substrats lignocellulosique.....	7
2-2-1 Traitements physiques	7
2-2-2 Traitements chimiques.....	8
2-2-3 Traitements biologiques	8
2-2-4 Hydrolyse enzymatique	8
I-3- L'olivier et le secteur oléicole	9
3-1-1 A l'échelle mondiale.....	9
3-1-2 En Algérie.....	9
3-2 Les caractéristiques du fruit d'olivier	10
3-3 Composition chimique du fruit	11
3-4 Procédés d'extraction de l'huile d'olive.....	11
3-4-1 Procédé discontinu ou système à super presse	11
3-4-2 Procédé continu	11
I-4 Les grignons d'olives comme biomasse végétale lignocellulosique	15
4-1 Définition des grignons	15
4-2 Différents types de grignon d'olive	15
4-3 Composition de grignon d'olive	15
4-3-1 Caractéristiques physiques	16
4-3-2 Caractéristiques chimiques des grignons d'olive.....	16
4-4 Valorisation des grignons d'olives.....	17
4-4-1 Aliment de bétail	17

4-4-2 Utilisation de grignon comme engrais.....	17
4-4-4 Biocombustible.....	17
4-5 La production d'éthanol par les grignons d'olives.....	17
4-5-1 Préparation de substrat.....	18
4-5-2 Prétraitements.....	18
4-5-3 Hydrolyse enzymatique.....	18
4-5-4 Fermentation.....	18
4-5-5 Distillation.....	18
I-5 La fermentation alcoolique.....	19
5-1 Le bioéthanol carburant.....	19
5-1-1 Présentation générale.....	19
5-1-2 Avantages et inconvénients du bioéthanol.....	19
5-1-3 Impact de l'utilisation de bioéthanol comme carburant sur l'environnement.....	20
I-6 Généralité sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
6-1 Morphologie et Structure.....	22
6-2 Reproduction.....	22
6-2-1 Reproduction asexuée.....	22
6-3 Conditions de croissance.....	24
6-3-1 Besoins nutritionnels.....	24
6-4 Voies métaboliques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
6-4-1 En aérobiose.....	26
6-4-2 En anaérobiose.....	26
I-7 La production de bioéthanol par voie fermentaire.....	28
7-1 Présentation générale.....	28
7-2 Effet des paramètres physico-chimiques sur la fermentation.....	28
7-2-1 Effet de la température.....	28
7-2-2 Effet du pH.....	28
7-2-3 Rôle de l'oxygène.....	29
7-2-4 La pression osmotique.....	29
7-3 Les procédés de fermentation.....	29
7-3-1 Le mode discontinu (batch).....	29
7-3-2 Le mode semi-continu (fed-batch).....	29
7-3-3 Le mode continu.....	29
II.1. Echantillonnage.....	32
II.2. Matériels.....	32

II.3. Préparation des grignons d'olives.....	33
3.2. Broyage.....	33
II.4. Analyse physicochimique des grignons d'olives	33
4.2. Taux de cendres	33
4.3. Cellulose brute « CB »	34
II.5. Production du bioéthanol.....	34
5. 1. Préparation du moût de fermentation à partir des grignons d'olives par un traitement thermique.....	35
5.2. Ajustement du pH.....	36
5.3. Stérilisation.....	36
5.4. Préparation de l'inoculum (préculture)	36
5.4.1. Vérification de la pureté de la souche	36
5.4.1. Préparation de l'inoculum	36
II.6.Fermentation alcoolique	37
6.1. Conduite de la fermentation	37
6.2. Suivi de la fermentation.....	37
6.2. 1. Potentiel d'hydrogène (pH).....	37
6.2. 2. Estimation de la biomasse	38
II.7 Détermination de la cellulose brute dans le mout de fermentation.....	39
II.8. Séparation et récupération du bioéthanol par distillation	39
8.1. Evaporation.....	40
8.2. Arrêt de l'évaporation.....	40
8.3. Récupération du bioéthanol	40
II.9. Estimations qualitatives du Bioéthanol.....	41
III.1. Analyses physicochimiques des grignons	43
III.2. Conduite de la fermentation	44
2. 1. Vérification de la pureté de la souche <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
2.2. Suivi de la fermentation.....	45
2.2.1 Evolution du pH	46
2.2.2. Evolution de la biomasse.....	46
2.2.3 Evolution de la cellulose brute	47
2.3. Mise en évidence de la production de bioéthanol.....	47
Conclusion générale	49
Références bibliographiques	51

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la cellulose (Rafael et al., 2011).	6
Figure 2 : Structure de deux hémicelluloses (xylène et glucomannane) (Rafael et al, 2011). ...	7
Figure 3 : Exemple de schéma structurel de lignine (Ralph et al., 2001).	7
Figure 4: Répartition des zones géographiques de l'oléiculture algérienne.	10
Figure 5: Coupe transversale d'une olive (Bianchi, 2003).	11
Figure 6: Procédé d'extraction d'huile d'olive à trois phases (Nefzaoui, 1987).	12
Figure 7: Procédé d'extraction d'huile d'olive à deux phases (Nefzaoui, 1987).	13
Figure 8: Procédé d'extraction de l'huile d'olive par centrifugation (Martilotti, 1983).	14
Figure 9: Image tridimensionnelle d'une molécule d'alcool éthylique.	19
Figure 10 : Balance gaz à effet de serre pour différents biocarburants.	21
Figure 11 : La structure morphologique et les constituants de la levure type (<i>saccharomyces cerevisiae</i>).	22
Figure 12: Schéma de la reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure (Thuriaux, 2004).	23
Figure 13: Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure (Thuriaux, 2004).	23
Figure 14: Schéma de la reproduction sexuée d'une levure (Thuriaux, 2004).	24
Figure 15: Voie métabolique de fermentation de <i>S. cerevisiae</i> . G-3-P : Glycéraldéhyde- 3-phosphate, DHAP : d'hydroxy-acétone-phosphate, PEP : phospho-enolpyruvate ; PPP : Voie des Pentoses phosphates, NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (Maris et al., 2006).	27

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1: La production oléicole mondiale d'après Sansoucy et Cuellar (2000).....	9
Tableau 2: caractérisation des grignons bruts issus de diverse procédés d'extraction de huile (Tirigui, 2008).	15
Tableau 3: Composition physique de grignon d'olive (procédé de Ferreti) (Nefzaoui, 1987).16	
Tableau 4: Composition chimique indicative de grignons d'olives (Nefzaoui, 1984).....	17
Tableau 5 : Matériels utilisés dans l'essai expérimental.	32
Tableau 6: Paramètres physicochimique des grignons d'olives	43

Liste des abréviations

PH	: Potentiel d'hydrogène
FAO	: Food And Agriculture Organization
COI	: Conseil Oléicole International
GES	: Gaz A Effet De Serre
ADP	: Adenosine Di- Phosphate
ATP	: Adenosine Tri-Phosphate
PI	: Phosphate Inorganique
CB	: Cellulose Brute
BLC	: Biomasse Lignocellulosique
DCO	: Demande chimique en oxygene
TCO	: Total cost of ownership en francais le cout total en possession

Introduction générale

Introduction générale

L'huile d'olive est considérée comme l'une des huiles les plus anciennes et les plus nutritives au monde. Au fil des siècles, l'huile d'olive est passée d'un aliment de base à un aliment de luxe et même fonctionnel en raison de ses bienfaits pour la sante, notamment la réduction de la prévalence du cancer et la diminution des cas de maladies cardiovasculaires (Veillet, 2010).

Comme la production et la consommation mondiale d'huile d'olive ne cesse d'augmenter, la production de déchets d'olives, de résidus solides et liquides, ont également augmenté (International Olive Council, 2019).

Une fois l'huile extraite, les déchets de l'industrie oléicoles sont souvent stockés et relargués dans la nature, or ces résidus sont toxiques. La toxicité est due à la présence de nombreux polyphénols, à une DCO et une TCO élevée qui font de ces déchets des composés récalcitrants à la dégradation naturelle (Della et al., 2001).

Ces déchets hautement polluants contiennent de la pulpe, de l'eau de l'olive et des portions de graines et de noyaux d'olive, et constituent un handicap pour le développement et la croissance de cette industrie.

Plusieurs démarches ont été entreprises afin de réduire l'effet de ces déchets sur l'environnement, en passant de la simple tentative de leur traitement à leur valorisation à savoir l'extraction et la fabrication de produits à valeur ajoutée, la production de biocarburant par fermentation, son utilisation comme substrat nutritif pour les microorganismes utiles et comme biofertilisant (Sahir-Halouane et al., 2015 ; Amic et Dalmasso, 2013).

Les biocarburants ont été considérés comme des alternatives potentielles aux combustibles fossiles pour l'avenir. De plus, la demande croissante et concurrente de bioéthanol peut entraîner une grave pénurie d'approvisionnement et des hausses de prix indésirables de ces produits alimentaires et de ses dérivés. Cependant, la biomasse lignocellulosique (BLC), en particulier les résidus agricoles reconnus comme une source durable pour produire du bioéthanol. Beaucoup de travaux dans le monde et en Algérie ont abordé ce volet citons parmi eux ceux de Dhyani et Bhaskar, (2018) ; Ducom et al., (2019) et Larbi et Berriche, (2020).

L'étude de la production de bioéthanol, à partir de grignon d'olive est une recherche prometteuse, car elle jouerait un rôle important dans la protection de l'environnement, en tant que méthode de gestion de ce déchet, elle pourrait même être une alternative aux autres méthodes de traitement et de valorisation et pourrait également être une recherche exploratoire pour d'autres déchets agricoles.

C'est dans cette perspective que verse notre contribution, en effet l'objectif de notre travail est de valoriser un résidu oléicole « les grignons d'olives » issu d'une *maâsra* située dans la Kabylie en l'utilisant comme substrat de fermentation en mode discontinue à base d'un microorganisme utile la levure *S. cerevisiae* afin de produire du bioéthanol.

- ❖ Les principaux points abordés dans ce mémoire sont résumés comme suit :
- Une synthèse bibliographique décrivant des généralités sur la biomasse végétale,

l'oléiculture et le secteur d'olivier, le substrat lignocellulosique, les grignons d'olives comme biomasse végétale lignocellulosique, la fermentation alcoolique et la production du bioéthanol par voie fermentaire.

- Une étude expérimentale consacrée à la description de méthodologie suivie et les résultats avec leur discussion
- Enfin, on termine par une conclusion générale.

Rappels bibliographiques

I-1 La biomasse végétale

1-1 Définition et source

La FAO d' définit la biomasse comme "une matière d'origine biologique à l'exclusion du matière incorporée dans les formations géologiques et transformé en fossile" (**Carol . L et al. , 2015**). La biomasse végétale d' désigne généralement le bois, l'herbe, les cultures ligneuses et herbacées à rotation courte, la bagasse (résidu fibreux de la canne à sucre), les d' déchets de bois, la sciure de bois, les d' déchets agricoles, les résidus industriels.

1-2 Composition de la biomasse végétale

La biomasse végétale est constituée principalement de matière organique ainsi que de matière inorganique en plus faible quantité. La matière organique à l'échelle macromoléculaire consiste en la cellulose, l'hémicellulose, la lignine et des matières extractibles (**Pilon G, 2013**).

La biomasse lignocellulosique, ou lignine, constituée par : le bois et les résidus verts, la paille, la bagasse de canne à sucre, le fourrage.

La biomasse à glucides, riche en substances glucidiques facilement hydrolysables : céréales, betteraves sucrières, cannes à sucre, résidus agro-industriels.

La biomasse oléagineuse, riche en lipides : **colza (*Brassica napsus*)**, **palmier à huile (*Eleae guineensis*)**.

1-3 Le mode de conversion de la biomasse végétale

Dans la conversion biologique des biomasses lignocellulosique, un prétraitement est nécessaire. Les prétraitements d' décomposent la cellulose et l'hémicellulose en sucres et séparent la lignine et les autres composants végétaux des matières fermentescibles. Les technologies de prétraitement sont physiques, chimiques, biologiques et thermochimique.

Le prétraitement physique comprend l'exposition aux rayons gamma ; les m' méthodes chimiques comprennent l'utilisation d'acides, de bases et de liquides ioniques ; et les m' méthodes biologiques comme- prennent l'utilisation de micro-organismes (**Carol L, 2015**).

I-2 Le substrat lignocellulosique

2-1 Caractéristiques du substrat lignocellulosique

Les substrats lignocellulosiques sont principalement composés de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine, ainsi que de petites quantités de protéines, de pectine, de substances extractives (par exemple, les sucres, la chlorophylle, les cires) et de cendres. La cellulose et les hémicelluloses sont deux grandes catégories de glucides ayant une valeur significative. Lorsqu'ils sont combinés, ils sont appelés holocellulose. La fraction de lignine est constituée de molécules de type non sucre (**Jorgensen et al., 2007**).

2-1-1 La cellulose

- ❖ La cellulose est le composant le plus abondant sur terre. C'est un polymère de molécules de glucose insoluble dans l'eau, dont la longueur de la chaîne varie entre 100 et 14 000 unités. Ces glucoses sont reliés entre eux par une liaison glucidique β (1-4) (Fig.1)(**Rafael et al., 2011, Pratima, 2016**).

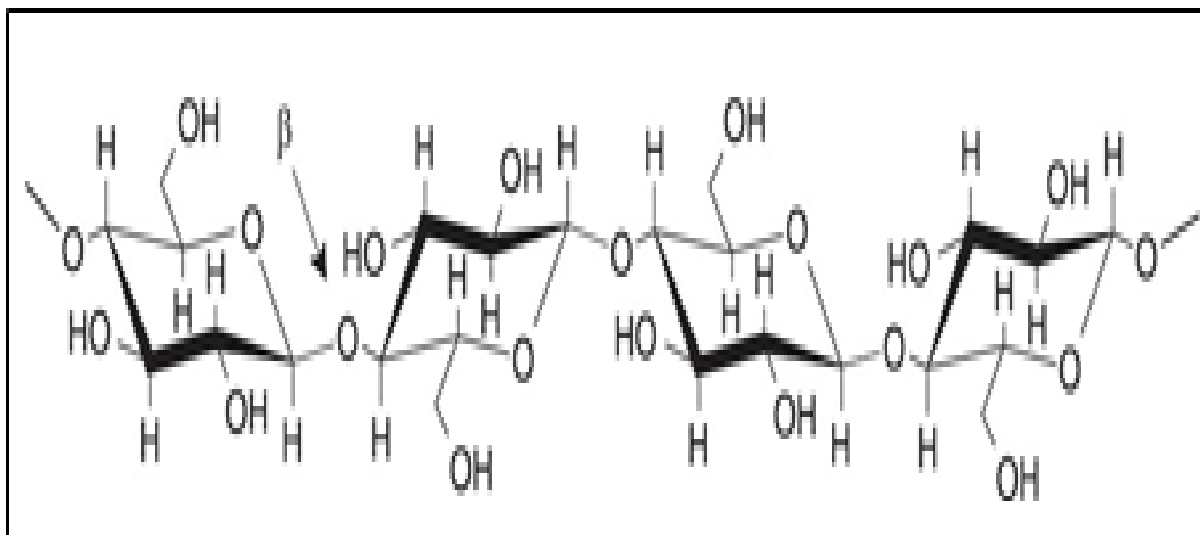


Figure 1 : Structure de la cellulose (**Rafael et al., 2011**).

2-1-2 Les hémicelluloses

L'hémicellulose est le deuxième polymère abondant, il contient 20 à 50% de la biomasse lignocellulosique. Il possède des branches avec des chaînes latérales courtes composées de différents types de sucres. Il est constitué d'hexoses (glucose, mannose et galactose), pentoses (xylose, rhamnose, et arabinose), et l'acide uronique. Par rapport à la cellulose, l'hémicellulose a une masse moléculaire faible. L'épine dorsale de l'hémicellulose est soit un homopolymère ou un hétéropolymère avec des courtes branches liées par des liaisons β (1-4) glucidiques et parfois β (1-3) glucidiques (Fig.2) (**Rafael et al., 2011, Boucher, 2014**).

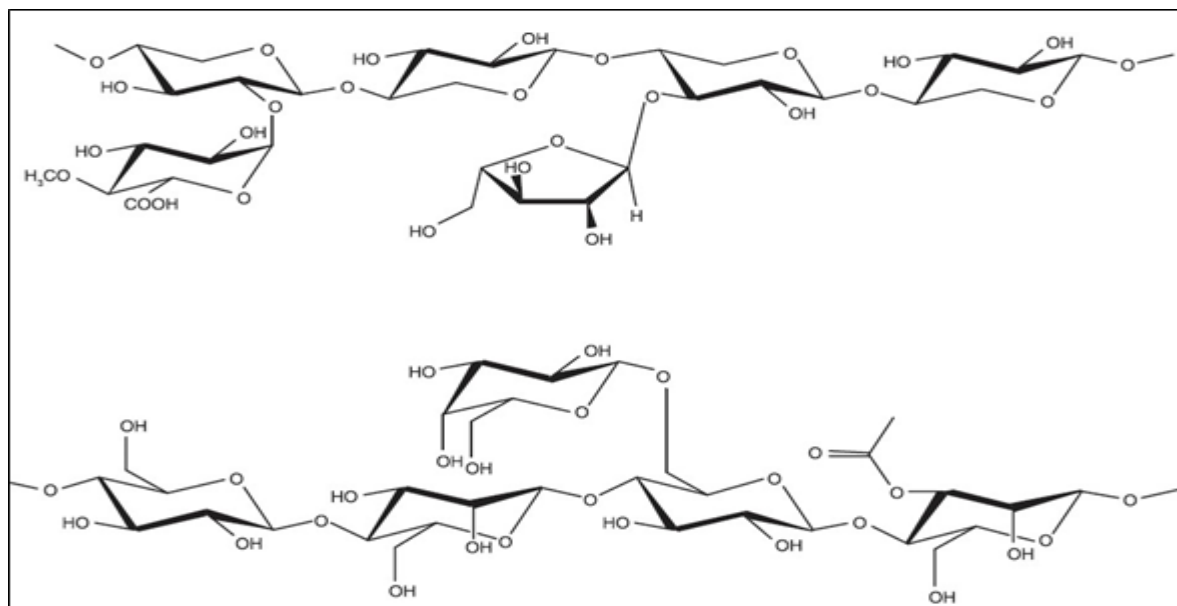


Figure 2 : Structure de deux hémicelluloses (xylène et glucomannane) (Rafael *et al.*, 2011).

2-1-3 La lignine

La lignine est une structure phénolique d'unités aromatiques amorphes et irrégulières (Fig.3). Elle est présentée dans les parois végétales et confère une résistance rigide et imperméable à l'attaque microbienne (Rafael *et al.*, 2001), (Pratima, 2016).

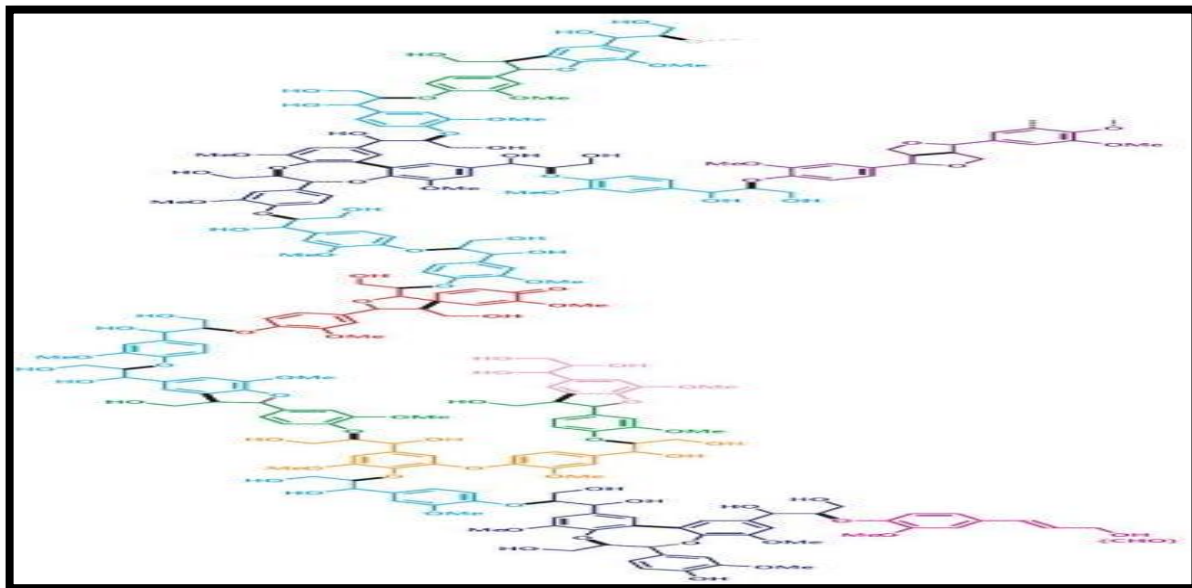


Figure 3 : Exemple de schéma structurel de lignine (Ralph *et al.*, 2001).

2-2 Traitements des substrats lignocellulosique

2-2-1 Traitements physiques

Les traitements physiques ont pour but de réduire le degré de polymérisation de la cellulose et de la lignine, et surtout d'augmenter les surfaces accessibles par les enzymes. Un broyage mécanique intense améliore la digestibilité enzymatique de la cellulose, mais à des

coûts d'investissement et d'énergie rédhibitoires pour l'économie du procédé (**Datta, 1981 et McMillan, 1994**), en raison des très faibles granulométries requises pour observer des effets significatifs. Par ailleurs, les techniques d'irradiation ont été décrites comme inefficaces, lentes, coûteuses en énergie et économiquement non viables (**Lorne, 2011**).

2-2-2 Traitements chimiques

Ces procédés utilisent un ou plusieurs réactifs chimiques dans le but d'hydrolyser à la fois les hémicelluloses et la cellulose. Les hémicelluloses de structure hétérogène et de faible degré de polymérisation sont hydrolysées en premier (**Gong et al., 1981**). L'un des objectifs majeurs de ces procédés est d'aboutir à une hydrolyse totale de la cellulose, tout en évitant des conditions trop sévères susceptibles d'entraîner la dégradation des sucres

2-2-3 Traitements biologiques

Les prétraitements biologiques mettent en œuvre certains basidiomycètes tels que *Phanerochaete chrysosporium*, qui peuvent dans certaines conditions, dégrader activement la lignine.

Des souches mutantes dépourvues de cellulases ont été obtenues et proposées pour effectuer une délignification biologique des lignocellulose.

La lenteur du processus et les difficultés de contrôle des conditions opératoires rendent peu probables l'extrapolation de ce type de procédé (**Pourquié et Vandecasteele, 1993**).

2-2-4 Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique constitue une méthode spécifique, réalisée dans des conditions relativement douces (50°C), et permettant des rendements d'hydrolyse supérieurs à ceux obtenus à partir des procédés chimiques. C'est la raison pour laquelle l'hydrolyse enzymatique a fait l'objet 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 (**Oil & Gas, 1999**).

I-3- L'olivier et le secteur oléicole

D'après le conseil oléicole international (COI, 2015), l'huile d'olive est définie comme étant une huile provenant uniquement du fruit de l'olivier (*Olea Europaea* L) à l'exclusion des huiles obtenues par solvants ou par des procédés de réestérification et de tout mélange avec les huiles d'autre nature.

L'huile d'olive, tout en apportant beaucoup d'AGMI, contient une quantité à la fois nécessaire et suffisante d'AGPI, qui sont essentiels au maintien de nombreuses fonctions physiologiques de l'organisme (perméabilité des membranes cellulaires, Synthèse des prostaglandines, multiples processus enzymatiques). Les bienfaits de la consommation de l'huile d'olive ne sont pas uniquement dus à l'acide oléique et ne sont pas tous liés au métabolisme lipidique, d'autres substances à propriété antioxydant tels que les composés phénoliques (Covas, 2007).

3-1 La production oléicole

3-1-1 A l'échelle mondiale

D'après un recensement agricole effectué (Cuellar, 2000), la production oléicole mondiale compte (850 millions arbres) productifs répartis sur une surface totale de (8,7 millions d'hectares) (Tableau .1). Certes les oliviers sont connus sur les cinq continents, mais un pourcentage de 98% de surface oléicole occupées existe sur les alentours du bassin méditerranéen. Selon les résultats de recherche d'une équipe de l'INRA de l'université de Montpellier, (97% de la production mondiale vient de la zone méditerranéenne).

Tableau 1: La production oléicole mondiale d'après Sansoucy et Cuellar (2000).

	Surface totale	Arbres en production	Olives produites	Huile produite
D'après Sansoucy	7 000 000 ha	600 000 000	8 400 000 tonnes	1 600 000 tonnes
D'après Cuellar	8 7 000 000 ha	850 000 000.	10 000 000	9 000 000 tonnes

3-1-2 En Algérie

L'oléiculture algérienne occupe une place de choix dans l'arboriculture algérienne avec 46 % de la superficie totale. L'oléiculture occupe la première place avant les agrumes et la vigne. Elle est présente sur l'ensemble des territoires.

Ce pays jouit des meilleures conditions climatiques et dispose d'importantes surfaces de terres propices aux différentes cultures. À noter que la production d'huile d'olive en Algérie est estimée de 80 000 tonnes durant la campagne 2017-2018, soit une hausse de 27% par rapport à la période précédente, tandis que la surface réservée à l'oléiculture à l'échelle nationale se compose de 56,3 millions d'oliviers dont 32,3 millions oliviers productifs, soit un taux de 57%.

L'oléiculture est concentrée au niveau de sept principales wilayas : Bejaïa, Tizi-Ouzou, Bouira, Bordj-Bou-Argeridj, Jijel, Sétif et Mascara (Fig.4). La région centre représente à elle seule un taux de plus de 75% de la superficie oléicole globale de ces sept wilayas (**Mohamedi, 2004**).

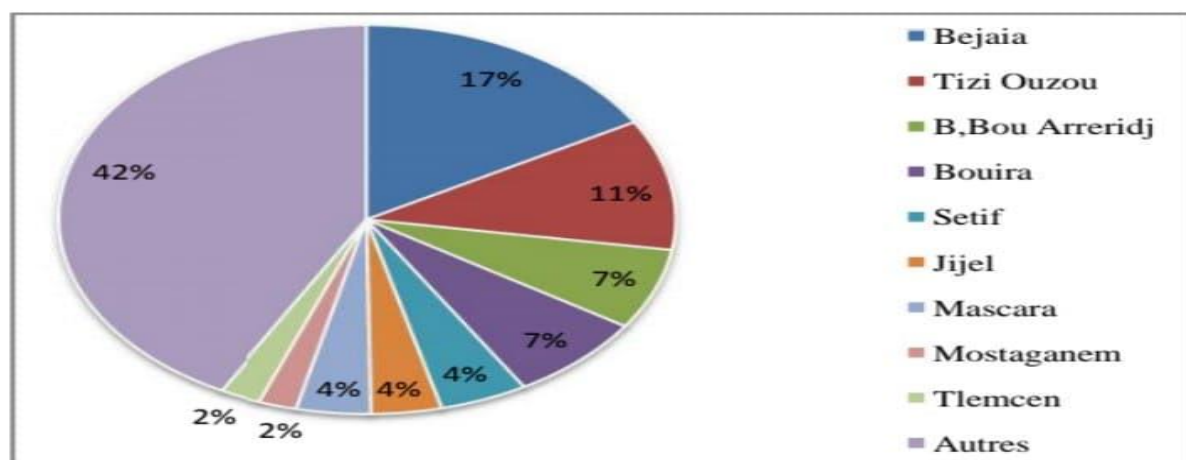


Figure 4: Répartition des zones géographiques de l'oléiculture algérienne.

3-2 Les caractéristiques du fruit d'olivier

Le fruit de l'olivier, l'olive, est une drupe charnue ayant une forme plus au moins Ovale, à peau lisse. Elle est constituée de l'extérieur vers l'intérieur de trois parties : L'épicarpe, le mésocarpe et l'endocarpe (Fig.5) (**Fedeli, 1997**).

❖ L'épicarpe : L'épicarpe, composé de l'épiderme et de la cuticule, représente 1 à 3 % du poids du Fruit. Il est constitué en plus grande partie d'acides gras accompagnés d'alcools et de leurs Esters, des composés aromatiques et des chlorophylles. Sa couleur varie du vert au début de Maturation au vert à jaunâtre, rose violacé, violet et noir à pleine maturité. Ces variations de couleur sont liées à la composition en pigments dans le fruit (**Cortesi et al., 2000 et Bianchi, 2003**).

❖ Le mésocarpe : Le mésocarpe, dénommé également la pulpe, représente 70 à 80 % du poids du fruit. Il renferme dans une matrice essentiellement protéique une solution aqueuse, dont les solutés Sont fondamentalement des sucres, accompagnés d'une série d'acides organiques, de phénols Simples et complexes, libres ou liés aux sucres, des composants d'arômes liposolubles. Le Mésocarpe renferme la plus grande partie d'huile (96 à 98 %) qui se trouve sous forme libre dans des vacuoles et sous forme liée à l'intérieur du cytoplasme (**Cortesi et al., 2000; Bianchi, 2003; El Antari et al., 2003**).

❖ L'endocarpe : Très caractéristique de la variété, l'endocarpe (noyau) représente 18 à 22 % du poids Du fruit. Il est composé de deux sous système : le premier constitué par la partie la plus Externe de la graine, le second constitué par la matrice protéique, contenant la composante lipidique et la composante hydrophile (**Cortesi et al., 2000; Bianchi ,2003**).

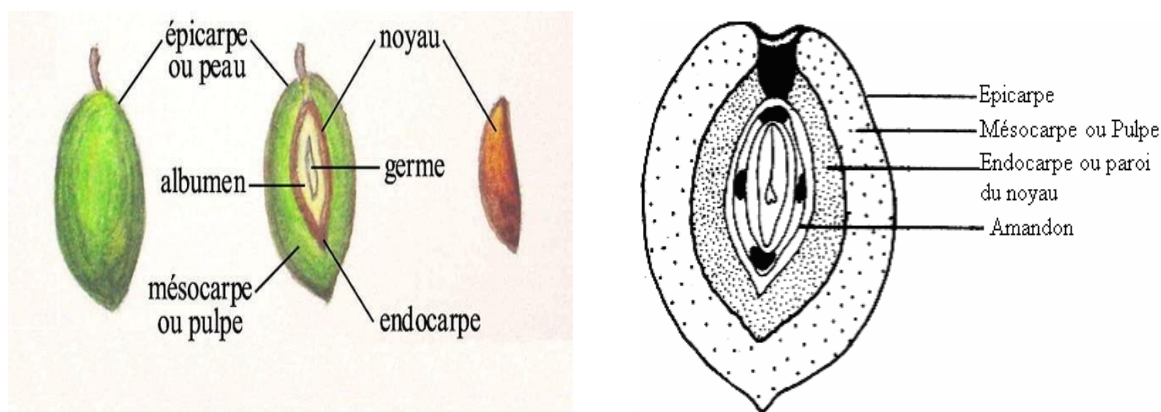


Figure 5: Coupe transversale d'une olive (Bianchi, 2003).

3-3 Composition chimique du fruit

La drupe est majoritairement composée d'eau, de glucides et d'huile (**Boskou, 2006 ; Ghedira, 2008**). Ainsi que des protéines, cellulose, acides organiques, pigments, minéraux et polyphénols qui sont aussi des constituants importants (**Boskou, 2006**). Les olives fraîches peuvent contenir jusqu'à 70 % d'eau, 5 -30 % d'huile, 20 % de glucides, 6 % de cellulose, 1,5% protéines et 1,5 % de minéraux (**Kailis, 2017**).

3-4 Procédés d'extraction de l'huile d'olive

3-4-1 Procédé discontinu ou système à super presse

- **Broyage** : Les meules utilisées pour le broyage sont légèrement décentrées par rapport à l'axe de rotation, ce qui accentue la possibilité d'écrasement des olives. (**ITAF, 2008**).
- **Malaxage** : Des raclettes ramènent en permanence la pâte sous les meules qui jouent alors le rôle de malaxeuses. La pâte est obtenue au bout d'une demi-heure environ (cette étape permet de libérer le maximum d'huile) (**ITAF, 2008**).
- **Séparation des phases** : La pâte est alors placée en couche de 2 cm d'épaisseur environ sur des disques en fibre de nylon (les scourtins), eux-mêmes empilés les uns sur les autres autour d'un pivot central monté sur un petit chariot. L'ensemble est placé sur un piston de presse hydraulique qui permet de faire subir à la pâte une pression de l'ordre de 100 kg.cm⁻². La phase liquide s'écoule dans un bac. Les grignons restent sur les scourtins. Cette opération dure environ 45 minutes. Ensuite, chaque scourtin est débarrassé de ses grignons en le tapant comme lors du nettoyage d'un tapis (**ITAF, 2008**).
- **Décantation** : Cette méthode n'est presque plus utilisée, en raison de sa lenteur et de la difficulté pour bien séparer l'huile de l'eau au voisinage de l'interface entre les deux fluides. Ce sont des centrifugeuses verticales à assiettes qui permettent aujourd'hui de séparer l'huile d'olive des margines (**ITAF, 2008**).

3-4-2 Procédé continu

Selon ITAF (2008), il existe deux types du procédé d'extraction continu :

- ✓ Système par centrifugation à trois phases et système par centrifugation à deux phases :

3-4-2-1 Système par centrifugation à trois phases

- **Broyage** : Il est réalisé par des broyeurs mécaniques à disques ou à marteaux. , la pâte étant obtenue presque instantanément.
- **Malaxage** : la pâte est versée dans un bac en inox, dans lequel tourne une spirale ou une vis sans fin, également en inox.
- **Séparation des phases** : La pâte malaxée est injectée par une pompe dans une centrifugeuse dont l'axe est horizontal.
- **Décantation** : permettent de séparer l'huile d'olive des margines. On utilise des centrifugeuses verticales à assiettes.

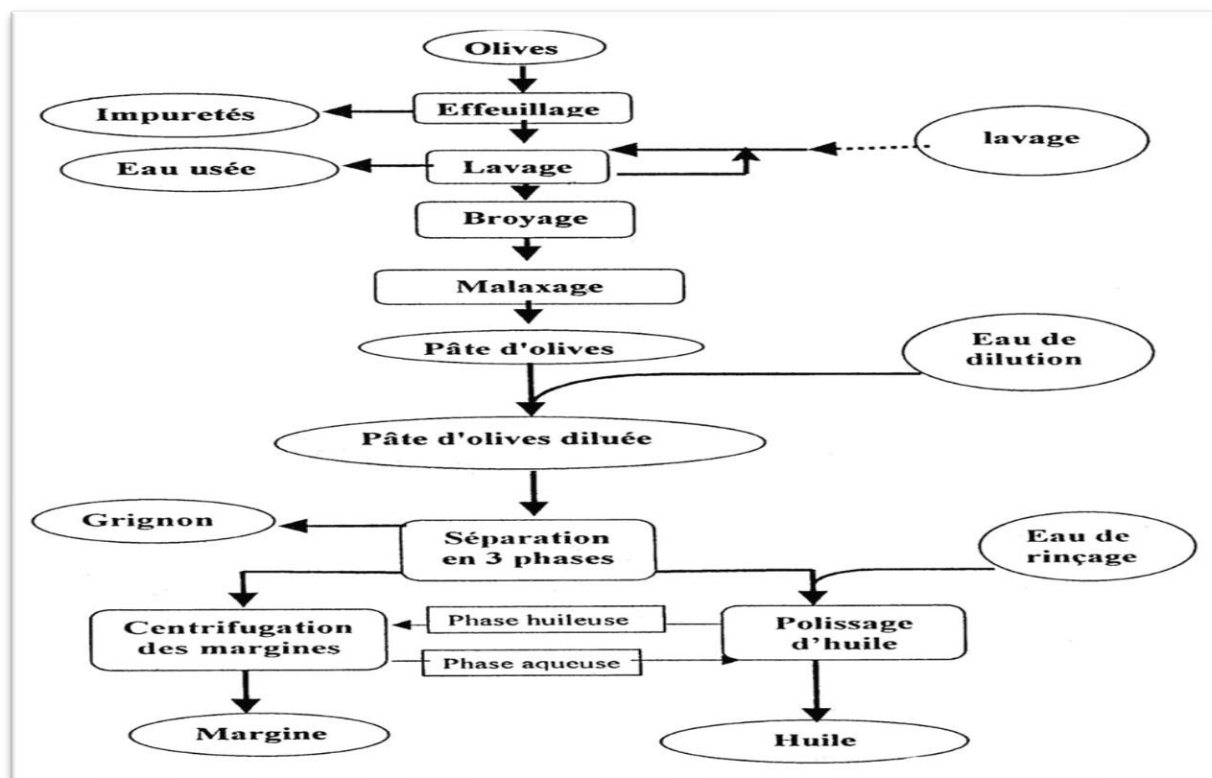


Figure 6: Procédé d'extraction d'huile d'olive à trois phases (Nefzaoui, 1987).

3-4-2-2 Système d'extraction par centrifugation à 2 phases

Avec ce type de séparateur, une centrifugation suffit pour séparer l'huile du grignon humidifié par les eaux de végétation sans fluidification de la masse d'olive (Fig.7 et 8). (Koutsaftakis et Stefanodakis, 1995 ; De Stefano *et al.*, 1999).

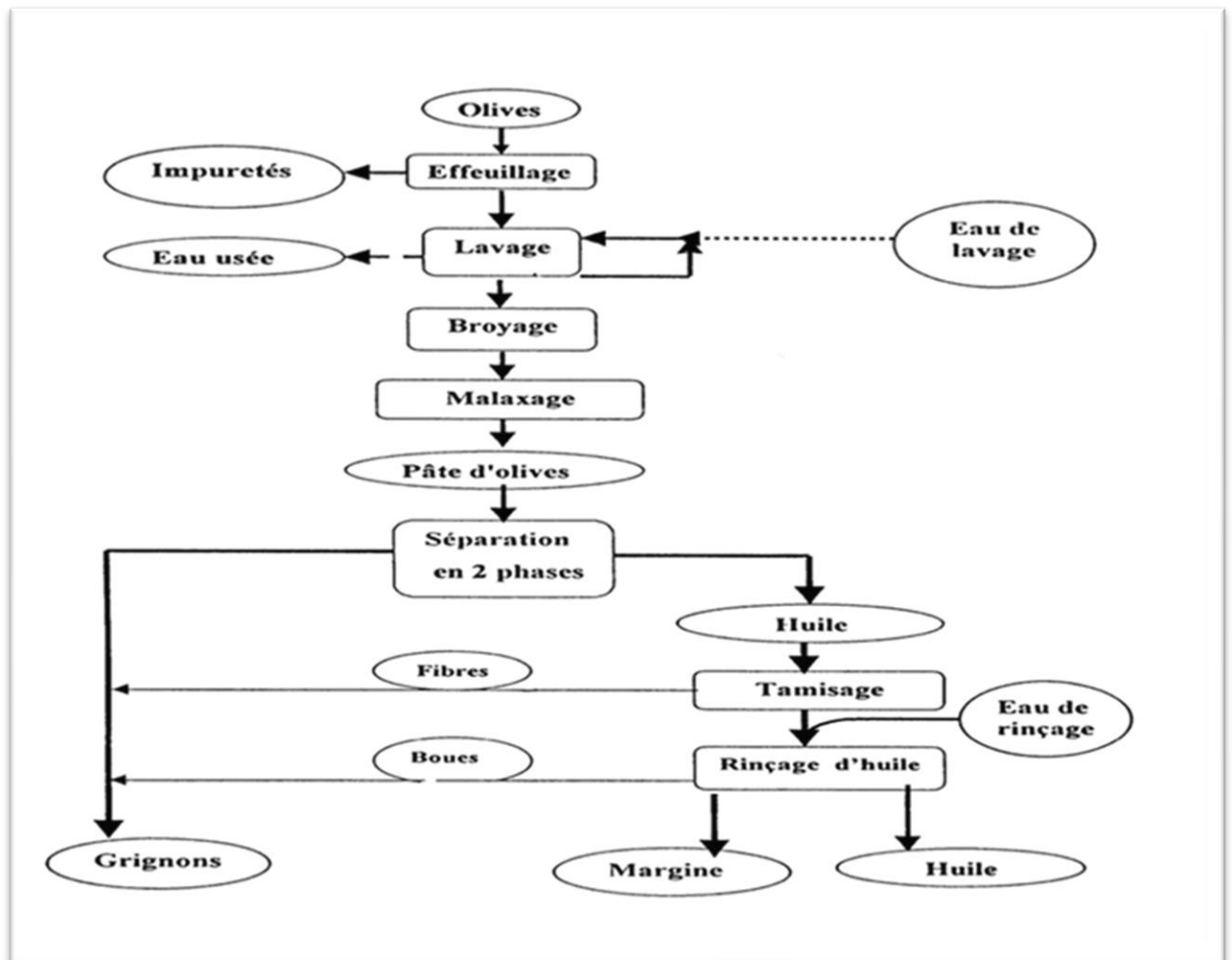


Figure 7: Procédé d'extraction d'huile d'olive à deux phases (Nefzaoui, 1987).

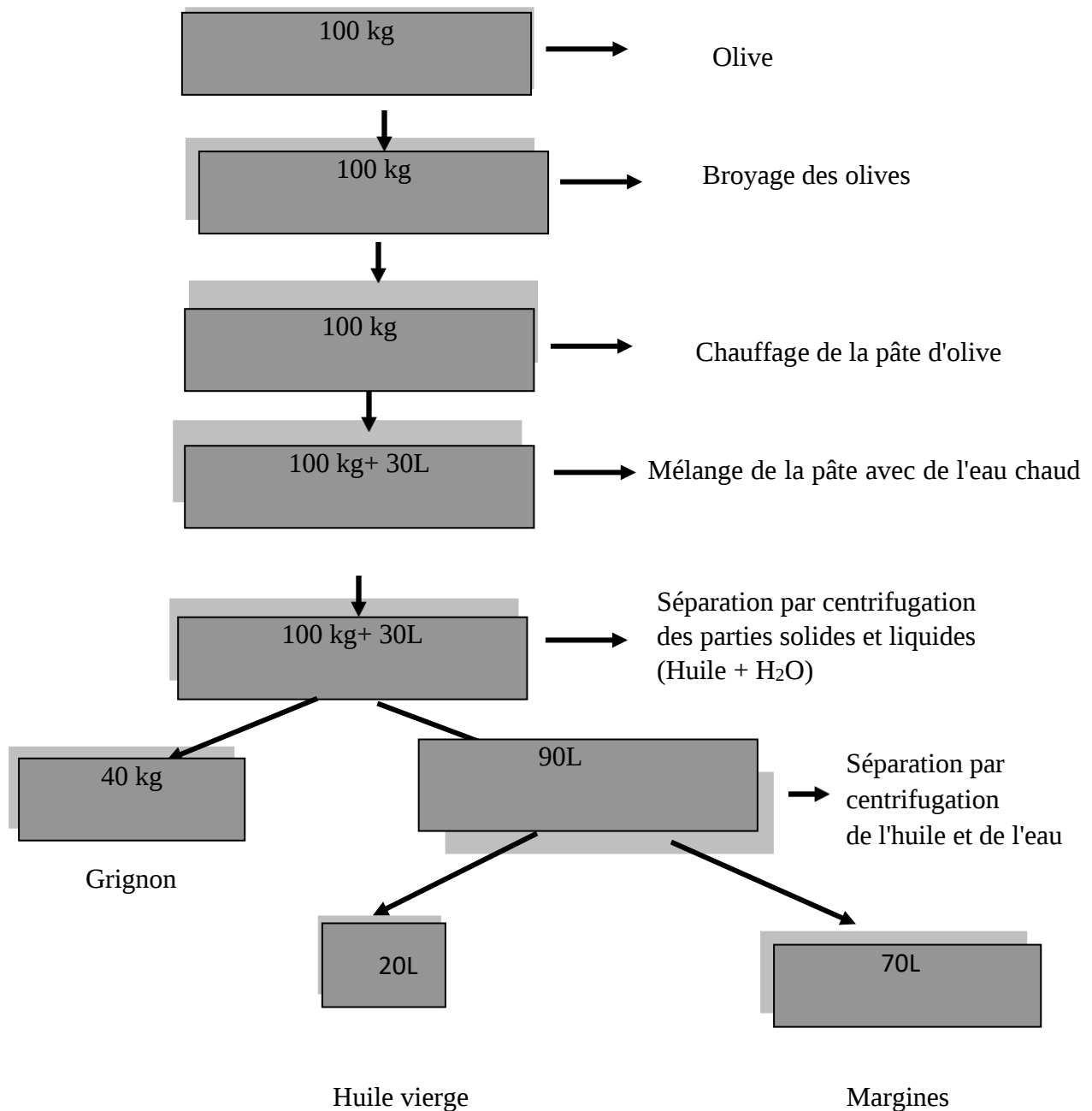


Figure 8: Procédé d'extraction de l'huile d'olive par centrifugation (Martilotti, 1983).

I-4 Les grignons d'olives comme biomasse végétale lignocellulosique

L'industrie oléicole dont l'activité principale est la production d'huile d'olive génère deux sous- produits l'un liquide (les margines), l'autre solide (le grignon d'olive). Ces deux rejets nocifs à l'environnement en raison des grandes quantités de matière organique qu'ils contiennent doivent subir un traitement qui est souvent une forme de valorisation.

4-1 Définition des grignons

Le grignon d'olive est un sous-produit du processus d'extraction de l'huile d'olive composé des peaux, des résidus de la pulpe et des fragments des noyaux.

4-2 Différents types de grignon d'olive

- **Le grignon brut** : c'est le résidu de la première extraction de l'huile par pression de l'olive entière, ses teneurs relativement élevées en eau (24%) et en huile (9%) favorisent son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre.
- **Le grignon épuisé** : c'est le résidu obtenu après déshuilage de grignon brut par un solvant, qui est généralement de l'hexane.
- **Le grignon partiellement dénoyauté** : il résulte de la séparation partielle du noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation.

4-3 Composition de grignon d'olive

Composition de grignons d'olive varie dans de très larges limites selon le stade maturation, le procédé d'extraction de l'huile et l'épuisement par solvant (Tableau 2).

Tableau 2: caractérisation des grignons bruts issus de diverse procédés d'extraction d'huile (Tirigui, 2008).

Paramètres	Extractions par pressage	Système continu à :	
		3-Phases	2-Phases
Humidité en%	27.2	50.23	56.8
Huile%	8.72	3.89	4.65
Protéines %	4.77	3.43	2.87
Sucre totaux%	1.38	0.99	0.83
Cellulose%	24.1	17.37	15.54
Hémicellulose%	11.0	7.92	6.63
Cendres%	2.36	1.7	1.42
Lignine%	14.1	10.21	8.54

Azote%	0.71	0.51	0.43
Phosphore P₂O₅%	0.07	0.05	0.04
Composés phénoliques%	1.14	0.326	2.43
Potassium K₂O%	0.54	0.39	0.32
Carbone Total%	42.6	29.03	25.37
C/N	60.42	59.92	59.00
C/P	61.85	580.60	634.25

N.B : C/N : carbone total (%) / Azote (%), C/P : carbone total (%) / phosphore (%).

4-3-1 Caractéristiques physiques

La composition physique des grignons est mentionnée dans le tableau n°3.

Tableau 3: Composition physique de grignon d'olive (procédé de Ferreti) (Nefzaoui, 1987).

	Produit Composition	Olive	Grignon Brut	Grignon épuisé	Grignon tamise
	MG	27	9.1	4.2	18.6
	Noyau sec	14.1	9.1	-	-
	Amandon	1.3	3	5,6	11.1
	Mésocarpe/épicarpe	9	21.2	39.3	80.2

4-3-2 Caractéristiques chimiques des grignons d'olive

La composition chimique de grignons varie en fonction des variétés d'olives triturées. Le tableau en ci-dessous donne une indication sur cette composition.

Tableau 4: Composition chimique indicative de grignons d'olives (Nefzaoui, 1984).

Type de grignon	Matière sèche	Cendres totales	MAT	Matière grasse	Cellulose brute
Brut	69.8-95.0	3.4-14.7	5.0-10.3	3-12.6	32.0-47.5
Epuisé non tamisé	86.0-95.0	5.8-9.3	12.4-16.2	1.1-7.4	32.6-53.3
Tamisé gras	89.0-94.0	10.3-25.3	6.8-9.0	6.9-15.0	12.0-33.5
Epuisé tamisé	88.2-90.5	11.0-22.3	2.0-6.5	2.0-6.5	14.5-23.3

4-4 Valorisation des grignons d'olives

4-4-1 Aliment de bétail

Ce sont des aliments de valeur limitée (**Sansoucy, 1991**). Très hautement lignocellulosique. La dégradabilité des matières azotées est aussi très faible et explicable par le fait que 70 à 80% de l'azote est lié à la fraction lignocellulosique entraînant une faible solubilité de l'azote. Généralement l'azote lié à la fraction pariétale est inaccessible aux enzymes du tractus digestif (**Nefzaoui, 1991**).

4-4-2 Utilisation de grignon comme engrais

Les cendres peuvent être utilisées comme un engrais en raison de leurs teneurs élevées en oxyde de potassium et en phosphore. (**Boudissa, 2012**).

4-4-3 Milieu de culture pour les microorganismes

Les grignons d'olives peuvent être considérés comme un substrat nutritif pour différents microorganismes, grâce à leur richesse en éléments minéraux, en sulfate d'ammonium et en oligo-éléments (**Sahir-Halouane et al., 2015**).

4-4-4 Biocombustible

Avec un pouvoir calorifique de 3500 kcal/kg, les grignons sont utilisés, comme combustibles, pour alimenter en énergie le secteur oléicole et d'autres secteurs (**Fedeli, 1997**). Cette quantité de chaleur est apportée principalement par la coque qui a un pouvoir calorifique relativement élevé (4000 Kcal/kg). La pulpe n'apporte que peu de calories (1400 Kcal/kg). De plus, la coque représente une fraction sans intérêt pour l'animal, ce qui assure tout l'intérêt du tamisage (**Nefzaoui, 1991**).

4-5 La production d'éthanol par les grignons d'olives

La production de bioéthanol à partir de la biomasse lignocellulosique est basée sur l'application des opérations successives afin d'obtenir à la fin le bioéthanol, et qui sont comme suit

- Préparation de substrat.
- Prétraitement.
- Hydrolyse enzymatique.

- Fermentation.
- Distillation.

4-5-1 Préparation de substrat

La biomasse (ou la matière première) doit passer par une série d'opérations : le lavage, le séchage et le broyage à des grains de moyenne taille ou fines.

4-5-2 Prétraitements

Il peut être fait par différentes méthodes qui sont principalement : physiques, et/ou chimiques et/ou biologiques. Il permet de séparer et dégrader les différents composés de la biomasse lignocellulosique en séparant la cellulose et l'hémicellulose de la lignine. D'autres prétraitements existent comme le traitement alcalin, le traitement assisté aux ondes ultrasons, le traitement assisté aux ondes microondes et le traitement par les solvants organiques (**Pratima, 2013**).

4-5-3 Hydrolyse enzymatique

Le procédé de l'hydrolyse enzymatique repose sur l'hydrolyse de la cellulose et l'hémicellulose en sucres simples par des enzymes. La cellulose est décomposée par l'enzyme cellulase en glucose et en cellobiose, tandis que l'hémicellulose est convertie en xylose et d'autres sucres par l'enzyme hémicellulase.

4-5-4 Fermentation

Les conditions de cette étape sont reliées avec le procédé de l'hydrolyse enzymatique, cela dépend de la méthode utilisée. Différents microorganismes sont utilisés dans la fermentation des hexoses et des pentoses. Parmi lesquelles : la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les bactérie *Escherichia coli* et *Zymomonas mobilis* (**Rafael et al., 2011**).

4-5-5 Distillation

Dans cette étape, le bioéthanol est séparé de l'eau et des autres composés par une distillation. Afin d'obtenir une concentration élevée en bioéthanol, une deuxième distillation est indispensable. D'autres procédés sont notés comme la déshydratation présentée par le tamis moléculaire (**Pratima, 2013**).

I-5 La fermentation alcoolique

La fermentation est une opération connue depuis les anciens temps. Elle a été utilisée par divers peuples (égyptiens, sumériens, Babyloniens, ...) pour la préparation de produits alimentaires comme le pain, les fromages, les boissons alcoolisées, etc. Actuellement, la fermentation est utilisée industriellement pour la fabrication de produits d'intérêt alimentaire (yaourts, bière), pharmaceutique (antibiotiques, vitamines, anticorps, etc.) et chimique (bioéthanol, acides gras, etc.) (Riess, 2012).

La fermentation alcoolique consiste à transformer les sucres fermentescibles en anaérobiose par des levures en alcool et gaz carbonique avec dégagement de calories selon la réaction suivante :



5-1 Le bioéthanol carburant

5-1-1 Présentation générale

L'éthanol, l'alcool ou encore l'alcool éthylique (Fig.9) sont toutes les trois des appellations qui désignent la même molécule qui est composée de deux atomes de carbone (C), six atomes d'hydrogène (H) et d'un atome d'oxygène (O). Les formules brutes et semi-développées de la molécule d'éthanol sont respectivement le $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, le $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ et le $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ (Filières de l'Agriculture, 2018). Le bioéthanol est un alcool obtenu par une fermentation microbienne. C'est une énergie renouvelable alternative qui peut remplacer les énergies fossiles comme l'essence, le diesel, et le gaz naturel dans le secteur de transport (Directive Européenne, 2003).



Figure 9: Image tridimensionnelle d'une molécule d'alcool éthylique.

5-1-2 Avantages et inconvénients du bioéthanol

Selon Riess, (2012), le bioéthanol présente des avantages et des inconvénients qui peuvent être résumés comme suit :

Avantage

- Diminution des émissions de dioxyde de carbone et meilleur rendement énergétique des moteurs à explosion.
- Indice d'octane élevé permettant une meilleure efficacité des moteurs à explosions
- Diminution des émissions de particules, de soufre, de benzène et de butadiène 1-3.
- Risque moins élevé de formation d'ozone que l'essence et le diesel.
- Biodégradable.
- Capacité énergétique inférieure à celle de l'essence (21285 kJ kg⁻¹ pour l'éthanol contre 32020 kJ kg⁻¹ pour l'essence).
- Diminution de la dépendance pays producteurs de pétrole.
- Stimulation du milieu rural.

Inconvénients

- Augmentation des émissions d'hydrocarbures par évaporation nécessitant un réglage de la pression de vapeur du carburant.
- Emission d'acide acétique en cas de réaction entre le catalyseur et le carburant résiduel à l'échappement.
- Corrosion des pièces en contact avec l'éthanol.
- Augmentation de la consommation volumique de carburant.
- Prix encore élevé.
- Concurrence entre alimentation et énergie.
- La non compatibilité de certains véhicules.
- Son indice d'octane étant moins élevé que celui de diesel, le bioéthanol ne convient pas comme carburant propre pour les moteurs diesels conventionnels, à moins qu'un accélérateur d'ignition ne soit ajouté.
- Emissions très élevées d'hydrocarbures par évaporation, ce qui requiert un réglage de la pression de vapeur de l'essence de basse à laquelle l'éthanol est ajouté.

5-1-3 Impact de l'utilisation de bioéthanol comme carburant sur l'environnement**5-1-3-1 Pollution de l'air**

La combustion de l'éthanol engendre l'émission de formaldéhyde et d'acétaldéhyde. Ces aldéhydes sont irritants et cancérogènes. Ils peuvent également réagir dans l'atmosphère pour former de l'ozone, de l'acide acétique, de l'acide formique ou de l'eau oxygénée. La

combustion de l'éthanol produit plus d'émission de NOx que l'essence. Pour l'E10 l'augmentation est de 5% de NOx émis par rapport à l'essence (**Heath Effect Institute, 1996**).

Face à cela, l'utilisation de l'éthanol comme carburant permet de diminuer les émissions de composés carbonés cancérigènes produits pendant la combustion de l'essence. L'utilisation de l'E10, par rapport à l'essence, permet la diminution de 5% des émissions d'hydrocarbures, de 13% celles de monoxyde de carbone, de 12% celles de benzène, de 6% celles de 1-3 butadiène, l'éthanol est aussi moins réactif dans l'atmosphère que l'essence (**Gaffney et Marley, 2009**).

5-1-3-2 Emission de gaz à effet de serre

Les biocarburants de 2^{ème} génération sont très prometteuse et permettrait potentiellement de réduire les émissions de gaz à effet de serre, de plus de 100% de certaines procédés qui valorisent les coproduits dans la production de chaleurs et d'électricité mais estimations restent relativement théoriques puisque technologies n'ont pas encore atteint le stade commercial (**Rancourt M, 2017**).

Les émissions de gaz à effet de serre (GES) sont calculées en prenant en compte toutes les émissions de GES du berceau à la tombe d'un produit. Dans le cas des biocarburants, le calcul est réalisé de la production des matières premières jusqu'à la combustion en passant par la transformation et le transport. Les GES, comme CH₄ ou N₂O, sont exprimés en équivalent-CO₂, en utilisant comme coefficients de pondération leur Potentiel de Réchauffement Global.

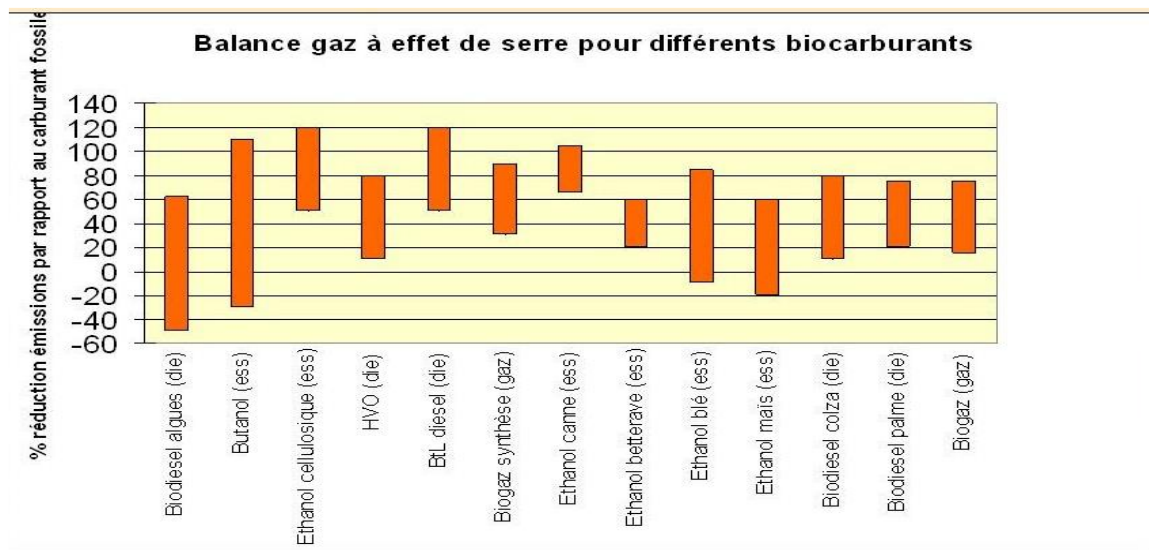


Figure 10 : Balance gaz à effet de serre pour différents biocarburants.

I-6 Généralité sur *Saccharomyces cerevisiae*

6-1 Morphologie et Structure

Les cellules sont généralement ovoïdes. Il se présente sous forme de cellule unique libres indépendantes ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique, à savoir: sphérique, ovoïde, cylindrique, apicule, en bouteille, pyramidale. Sous cette forme unicellulaire les dimensions sont de 2,5 à 10,5µm de large et de 4,5 à 21µm de long. Les dimensions et aspects dépendent fréquemment des conditions de culture et de l'âge des cellules (**Larpen, 1991**). Certaines peuvent formées des associations cellulaires ou se présenter sous forme filamenteuse à certains stades de leur vie (**Bouix et Leveau, 1991**).

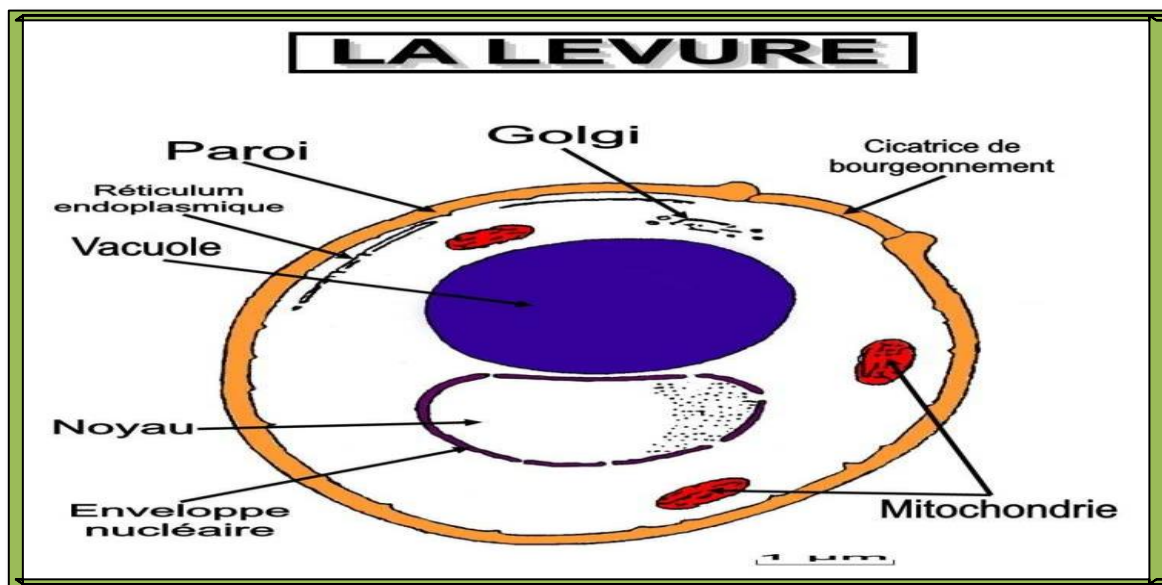


Figure 11 : La structure morphologique et les constituants de la levure type (*saccharomyces cerevisiae*).

6-2 Reproduction

On appelle levures Sporogènes celles qui se reproduisent soit de façon sexuée, soit de façon asexuée, suivant les conditions de milieu, et levures Asporogènes, celles se reproduisent uniquement de façon asexuée (**Pierre, 2004**).

6-2-1 Reproduction asexuée

Cette multiplication végétative se réalise par bourgeonnement ou par scission (**Thuriaux, 2004**).

6-2-1-1 Reproduction asexuée par bourgeonnement

Le noyau de la cellule se déplace vers la paroi, s'étire et se divise en donnant naissance à un petit bourgeon à la surface de la cellule. Celui-ci croît rapidement pour donner naissance à une cellule fille qui peut ou non se détacher de la cellule mère et bourgeonner à son tour (**Thuriaux, 2004**).

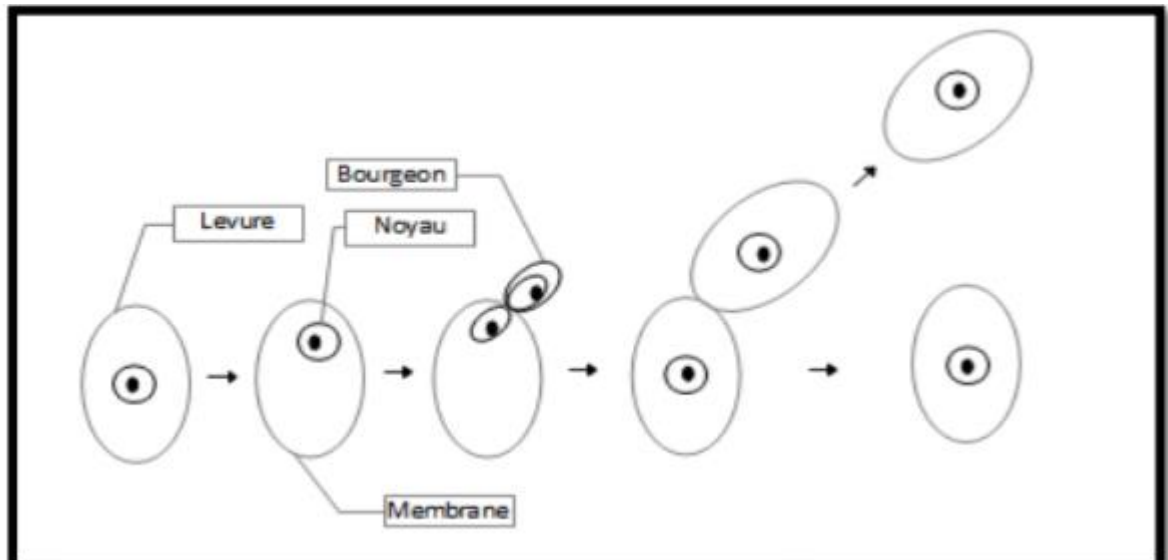


Figure 12: Schéma de la reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure (Thuriaux, 2004).

6-2-1-2 Reproduction asexuée, par scission-Scissiparité

Le noyau s'étire et se casse en deux. Pendant ce temps, une séparation s'amorce au niveau de la paroi, ce qui conduit à la formation de deux cellules (Thuriaux, 2004).

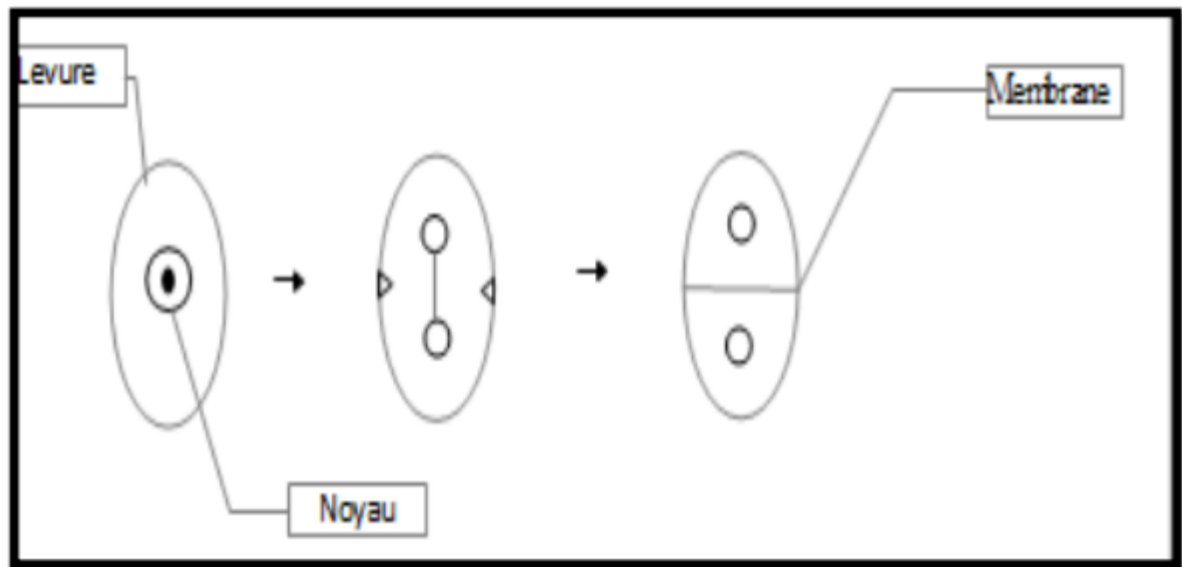


Figure 13: Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure (Thuriaux, 2004).

6-2-2 Reproduction sexuée

Lorsque les conditions de milieu deviennent défavorables (température extrêmes, absence d'éléments nutritifs ...), la levure cesse de se multiplier. Elle produit alors des ascospores. Le noyau subit deux divisions successives, chacun des noyaux fils s'entoure de cytoplasme et la levure mère devient un asque. Elle renferme 2 à 4 ascospores qui sont à l'état de vie ralentie et qui ne reprendront leur vie active que lorsque les conditions de milieu seront

favorables. Les ascospores représentent le mode de survie durant la mauvaise saison (Thuriaux, 2004).

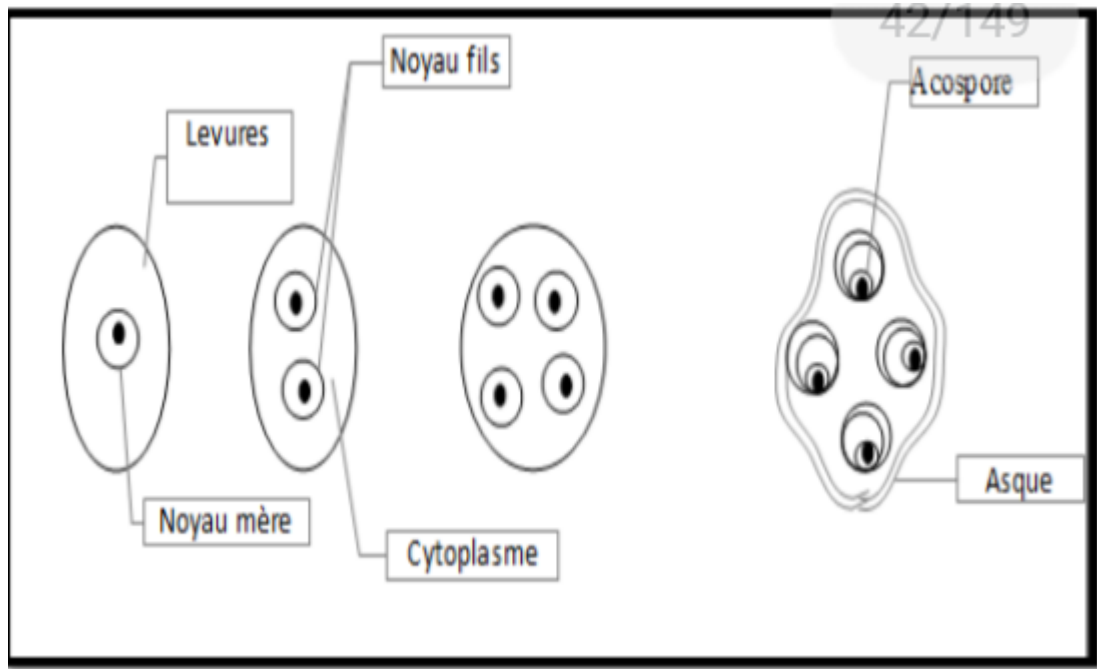


Figure 14: Schéma de la reproduction sexuée d'une levure (Thuriaux, 2004).

6-3 Conditions de croissance

6-3-1 Besoins nutritionnels

Les nutriments sont apportés au milieu de culture de façon graduelle pour maintenir une faible concentration de glucose afin d'encourager la respiration et la reproduction cellulaire des levures. Les éléments chimiques nécessaires à la croissance des levures sont :

6-3-1-1 Sources de carbone

Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques, etc. (Aguilar Uscanga, 2003).

Les levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* peuvent fermenter le glucose, le saccharose, le maltose, le raffinose, le cellobiose et le galactose et peuvent assimiler l'éthanol, l'acide lactique, l'acide citrique (Aguilar Uscanga, 2003)

6-3-1-2 Source d'azote

L'azote joue un rôle capital pour la croissance de la levure, il entre dans la constitution de molécules simples et des macromolécules essentielle au fonctionnement cellulaire. Les levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* sont capables d'utiliser les sources azotées minérales simples, mais aussi des composés organiques divers, tels que les acides aminés et les peptides (Larpent, 1990). En levurière, l'apport d'azote est assuré par l'addition de l'urée,

des sels d'ammonium comme le sulfate d'ammonium ou le dihydrogénophosphate d'ammonium.

6-3-1-3 Oligoéléments et facteurs de croissance

Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (**Suarit et al., 1988**). Les oligo-éléments sont essentiels pour la cellule, puisqu'ils réagissent comme cofacteurs de divers enzymes impliquées dans le métabolisme microbien. Ils sont nécessaires en très petites quantités mais un excès provoquera la dénaturation d'enzymes et une perturbation de la morphologie et de la physiologie cellulaire et de la vitesse de croissance (**Blom et al., 2000**). Les oligo-éléments augmentent la production de l'éthanol de 20% par *Sacharomyces cerevisiae* (**Guiraud, 1996**). De plus, d'autres facteurs sont essentiels comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique), qui interviennent lors des réactions enzymatiques, comme des coenzymes (**Aguilar Uscanga, 2003**).

6-3-2 Besoins physico-chimiques

6-3-2-1 La température

La température courante de culture des levures se situe entre 25 et 35°C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. En effet, la température de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* est située entre 27 et 39°C (**Bouix et Leveau, 1993**).

6-3-2-2 Le pH

Les levures ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. La croissance optimale de *saccharomyces cerevisiae* se fait à des pH acides entre 4,6 à 6,5 (**Bouix et Leveau, 1993**).

6-3-2-3 L'oxygène

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes. *Saccharomyces cerevisiae* aéro-annérobies facultatives préfèrent un métabolisme fermentaire (**Bouix et Leveau, 1991**).

6-4 Voies métaboliques de *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae* utilise comme substrat les hexoses, et peut atteindre des rendements en éthanol de 90—93% par rapport au rendement théorique (**Bai et al., 2008**).

Pour assurer ses dépenses énergétiques, elle peut utiliser différents substrats carbonés, principalement des sucres. Il faut noter que le glucose est l'aliment carboné préférentiel de *S. cerevisiae* (**De queiroz, 1991**).

En se référant au catabolisme du pyruvate formé à partir du glucose, on peut distinguer deux types de métabolismes (**Botton, 1991**).

6-4-1 En aérobiose

Lorsque la levure se trouve en présence d'air, elle produit à partir du sucre et de l'oxygène du gaz carbonique, de l'eau et une grande quantité d'énergie. C'est le processus métabolique de la respiration. Dans ces conditions l'oxydation du glucose est complète (**Guinet et Godon 1994**).

Selon **Scriban, (1988)**, la réaction en aérobiose est la suivante :

Glucose + Oxygène -----> Gaz carbonique + Eau + Energie

En aérobiose, il se forme 13 fois plus d'ATP que par le métabolisme anaérobie (**Vladescu, 1994 ; Bellam et Fould, 1996**).

6-4-2 En anaérobiose

Lorsque la levure ne dispose pas d'oxygène, elle peut néanmoins utiliser des sucres pour produire l'énergie nécessaire à son maintien en vie. Ce processus métabolique a été défini par Pasteur comme étant celui de la fermentation. Les sucres sont transformés en gaz carbonique et en alcool. (**Leyral Vierlin, 2007 ; Lai, 2010**).

L'oxydation du glucose est incomplète on parle de fermentation ou de vie sans air (**Regnault, 1990**). Selon **Scriban (1988)**, **Guinet et Godon (1994)**, **Hesclot et Vladescu (1994)**, **Ferreira et Fennes (1997)**, la réaction est la suivante :

Glucose -----> Gaz carbonique + Alcool + Energie

L'alcool formé contient encore beaucoup d'énergie. Il n'y a donc qu'une partie de l'énergie biochimique potentiellement présente dans le glucose qui a été libérée. Ainsi, on note environ 20 fois moins que pour la respiration. Elle assure un minimum vital à la levure, sans lui permettant de se multiplier rapidement (**Guinet et Godon 1994**).

Le métabolisme en anaérobiose (Fig.11) porte le nom scientifique de glycolyse. Il s'agit de la dégradation des glucides en pyruvate, qui fait intervenir 30 à 65 % des protéines cellulaires que constituent les enzymes. Le glucose qui est un sucre à 6 atomes de carbone pénètre dans la cellule où il subit des phosphorylations consommatrices d'énergie avant d'être scindé en 2 molécules et à 3 atomes de carbone. Ces dernières entreront chacune dans une série de réactions aboutissant au pyruvate, qui en l'absence d'oxygène est transformé en acétaldéhyde puis en éthanol et sera ensuite excrété par la cellule (**Guinet et Godon 1994**).

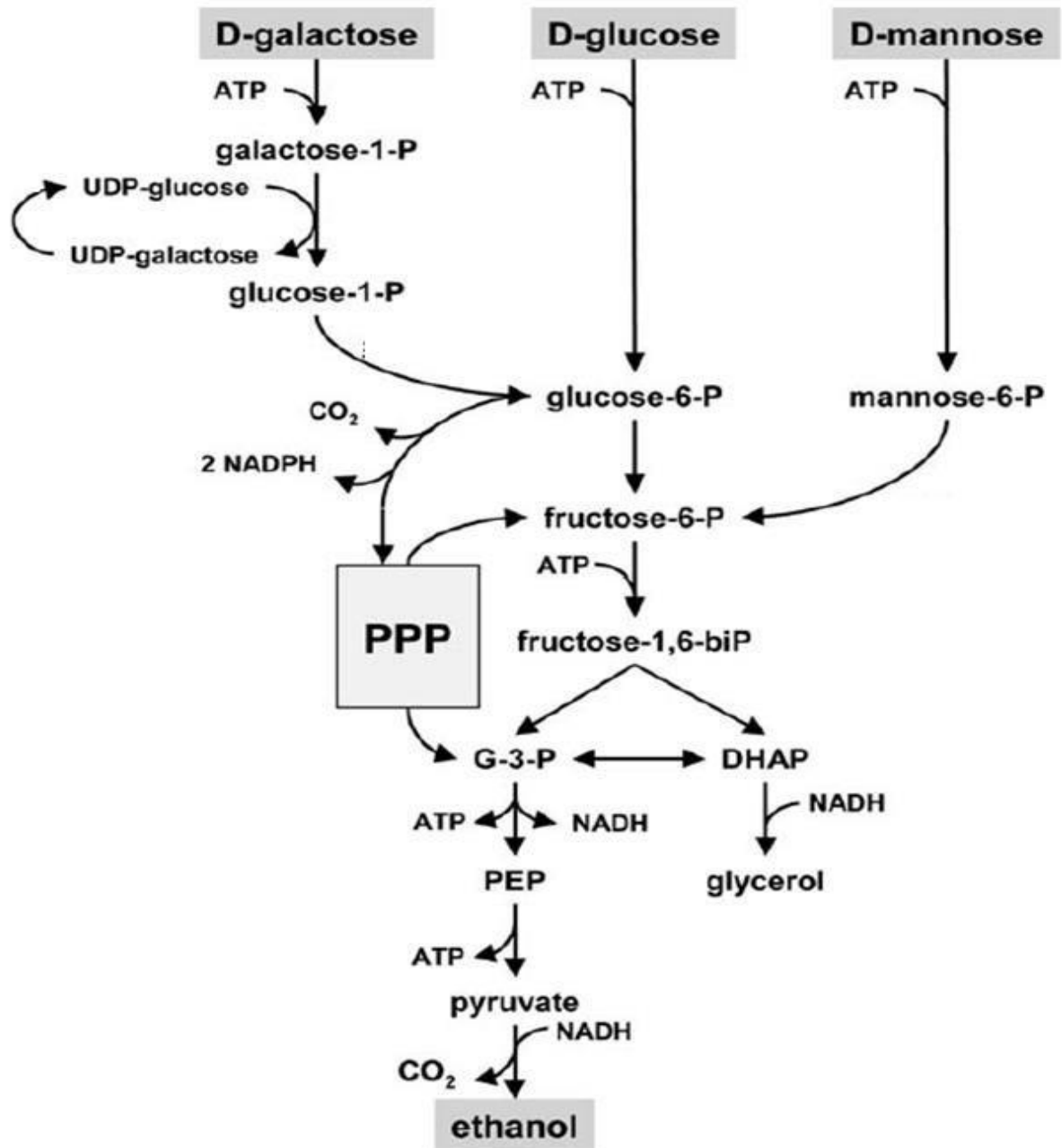


Figure 15: Voie métabolique de fermentation de *S. cerevisiae*. G-3-P : Glycéraldéhyde-3-phosphate, DHAP : d'hydroxy-acétone-phosphate, PEP : phospho-enolpyruvate ; PPP : Voie des Pentoses phosphates, NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (Maris *et al.*, 2006).

I-7 La production de bioéthanol par voie fermentaire

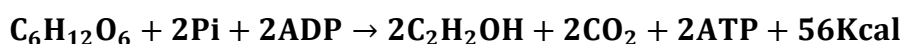
7-1 Présentation générale

La production d'éthanol est contrôlée par différents facteurs qu'on peut regrouper en trois catégories : la matière première ; les microorganismes et les technologies de mise en œuvre.

- ✱ *La matière première* : elle doit être un substrat riche en sucres susceptibles d'être fermentés (saccharose, glucose, fructose ou des composés cellulosiques ou amylacés).

Industriellement, les principales sources de matières premières les plus utilisées sont : les jus de betterave, les mélasses de canne à sucre ou de betterave, les égouts de sucrerie et les jus hydrolysés de diverses céréales (blé, maïs, riz et seigle).

- ✱ *Les microorganismes* : plusieurs microorganismes interviennent dans ce processus de production de bioéthanol. Ce sont les levures et bactéries des genres tels que : *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Bacillus*. Parmi les levures utilisées dans ce processus de fermentation l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.
- ✱ *La fermentation* : c'est un processus de transformation biochimique au cours duquel un substrat organique subit des changements chimiques, provoqués par l'action des enzymes produit par les micro-organismes (Jay, 1996). A partir de cette opération biochimique, l'éthanol va être fabriqué. Cette opération de fermentation est l'étape la plus importante dans le procédé de production du bioéthanol. Cette fermentation est étayée par l'équation de fermentation du glucose suivante :



- ✱ *La distillation* : elle consiste à récupérer du milieu réactionnel, l'alcool qui s'y trouve. C'est l'étape la plus coûteuse dans la fabrication de l'alcool et qui permet de récupérer l'éthanol provenant de la fermentation (Cardona et Sanchez, 1997).

7-2 Effet des paramètres physico-chimiques sur la fermentation

7-2-1 Effet de la température

A température faible, l'activité cellulaire microbienne peut être bloquée, l'élévation de la température augmentera la vitesse de croissance (métabolisme cellulaire sera plus actif à température plus élevée), la température optimale est comprise entre 25°C et 35°C (Kara Ali, 2014).

7-2-2 Effet du pH

Un facteur très important pour la croissance de la levure (*S. cerevisiae*) qui détermine l'activité métabolique de la cellule. Cette levure présente l'avantage de croître sur milieux acides pour lesquels la plupart des bactéries ne se développent pas. La fermentation alcoolique se déroule à un pH acide compris entre 4,5 et 5 (Benaouida, 2008).

7-2-3 Rôle de l'oxygène

L'oxygène est une molécule nécessaire pour la biosynthèse de molécules indispensables pour la cellule tout particulièrement celle des acides gras insaturés et des stérols qui protègent les levures du stress alcoolique (**Scheffers, 1992**).

En fermentation alcoolique chez *S. cerevisiae*, une faible aération est donc indispensable pour assurer la survie des levures et l'épuisement complet des sucres en présence de concentrations élevées en éthanol. De plus dans ces conditions, la vitesse spécifique de production d'éthanol est améliorée (**Sablayrolles, 1992**).

7-2-4 La pression osmotique

Des concentrations élevées en sucres peuvent provoquer un stress osmotique sur les levures en croissance (**Mounir et al., 2016**).

7-3 Les procédés de fermentation

Il est possible d'effectuer les fermentations en *batch* (discontinu), *fed-batch* (semi-continu) ou en continu.

7-3-1 Le mode discontinu (batch)

Dans ce mode de fonctionnement la totalité des éléments nutritifs nécessaires à la croissance biologique est introduite lors du démarrage de la réaction. Aucun apport ni prélèvement n'est réalisé par la suite et la réaction se déroule à volume constant (**Manyri, 2005**).

7-3-2 Le mode semi-continu (fed-batch)

Tout en nécessitant un dispositif de stockage des affluents, ce mode de fonctionnement se distingue du précédent par un apport des différents éléments nutritifs au fur et à mesure des besoins constatés des micro-organismes. La variation du volume du milieu réactionnel est donc une fonction directe de l'état d'avancement de la réaction. Ce mode permet essentiellement d'éviter les problèmes d'inhibition associés au mode précédent, et de fonctionner à des taux spécifiques de croissance proches de leur valeur maximale. A partir d'un volume initial préalablementensemencé, le réacteur est alimenté par un débit augmentant de façon exponentielle, nécessitant un contrôle en boucle fermée. C'est d'ailleurs ce dernier point qui a fortement limité l'utilisation du fed-batch en milieu industriel (**Queinnec, 2000**).

7-3-3 Le mode continu

Caractérisé par un volume réactionnel constant, il est soumis à un soutirage de milieu réactionnel égal au flux d'alimentation en matière nutritive (en employant une régulation de niveau) (**Kara Ali, 2014**).

Les procédés continus fonctionnent en régime permanent, en maintenant, pour des conditions d'alimentation fixées, le système dans un état stationnaire, en évitant tout phénomène inhibiteur grâce à l'effet de dilution dû à l'alimentation (**Queinnec, 2000**).

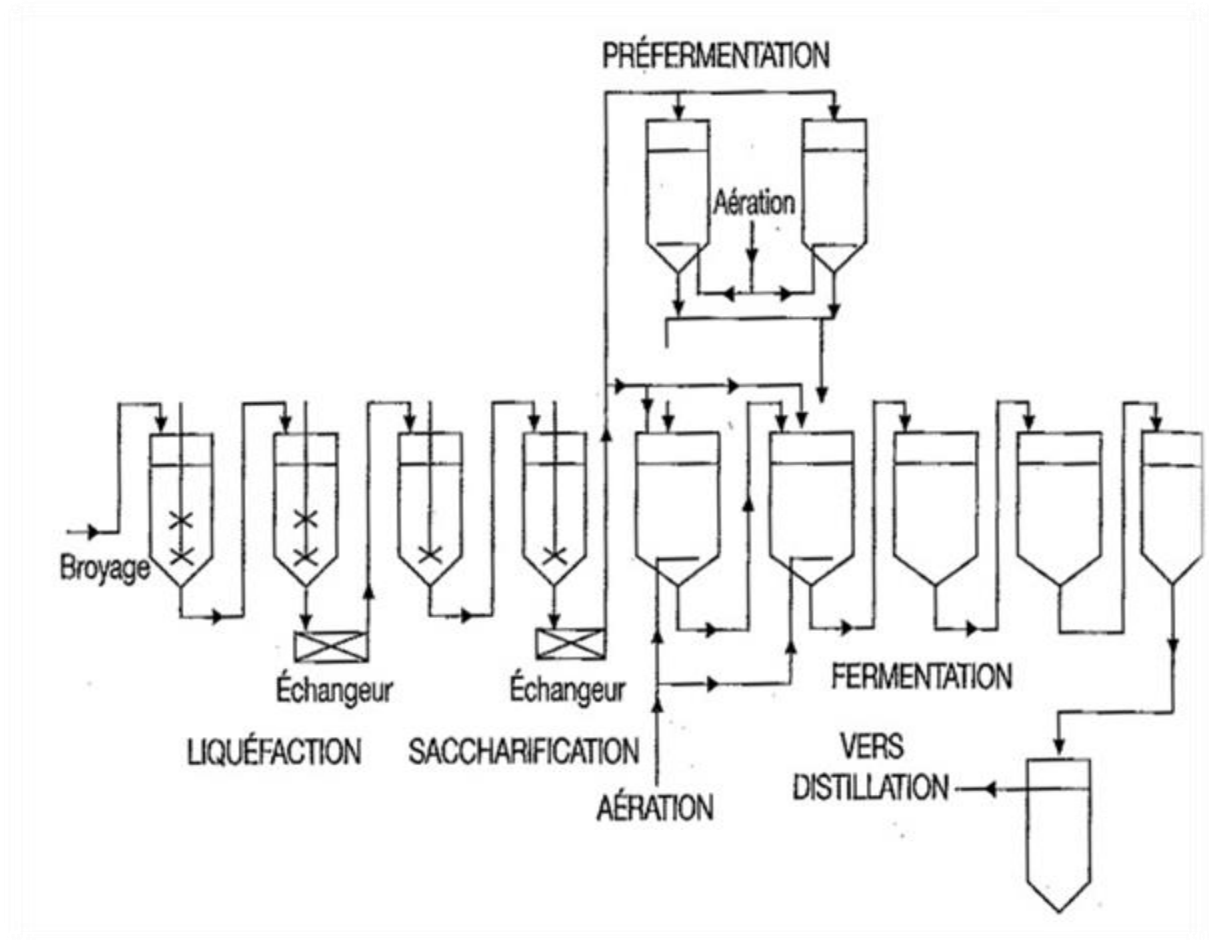


Figure 16:Le procédé de fermentation en continu (Ballerini *et al.*, 2006).

Ces modes de fonctionnement permettent en outre des productions importantes dans des réacteurs de taille réduite et ne nécessitent pas d'importants dispositifs de stockage en amont, contrairement aux modes précédents (Bounoua, 2017).

Matériels et méthodes

Notre travail a été effectué dans le laboratoire de chimie à la faculté des hydrocarbures et de la chimie de l'Université M'HamedBougara (UMBB).

L'objectif principal assigné à cette étude est la valorisation des grignons d'olives comme substrat lignocellulosique dans le processus de fermentation d'une souche levurienne *S.cerevisiae* en vue de production d'un biocarburant « le Bioéthanol ».

II.1. Echantillonnage

Les échantillons de grignons d'olives ont été récupérés dans des sachets en plastique stérilisés durant la campagne oléicole de février 2021 au niveau d'une Måasra moderne située dans la région de Sidi Aich, wilaya de Bejaïa.

II.2. Matériels

Dans le présent travail, nous avons utilisé divers produits, végétal, biologique et chimique. Ainsi que des équipements et de la verrerie (tableau n°5).

Tableau 5 : Matériels utilisés dans l'essai expérimental.

Type de matériels	Matériels
Matériel végétal	Les grignons d'olives
Matériel biologique (Micro-organisme)	Levure boulangère (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Milieu de culture	Sabouraud-Chloramphénicol(5%)
Appareils	-pH-mètre. -Balance. -plaque chauffante IKAMAG. -Thermomètre. -Etuve -Autoclave -Bec Bunsen. -Montage de distillation.
Réactifs chimiques	-Acide sulfurique 0.025M. -Dichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$ (0.5M)
Verreries et autres	-Verre de montre. -Creuset en céramique. -Bécher. -Eprouvette graduée. -Erlenmeyer. -Boîtes de Pétrie. -Pipette Pasteur. -Tubes à essai. -Spatule. -Pipette graduée. -Papier filtre

II.3. Préparation des grignons d'olives

3.1. Séchage

Une fois récupérés, les grignons d'olives ont été étalés et séchés à l'air libre, pendant quatre semaines. Cette procédure a été conduite afin d'obtenir des échantillons de faible teneur en humidité (inférieure à 10%). Une teneur en humidité plus élevée dans les échantillons de biomasse végétale (grignons) modifiera la concentration efficace en acide ou en base dans les étapes d'hydrolyse. L'abaissement de la concentration d'acide ou de base peut entraîner un faible biais dans la teneur en glucides en raison de l'hydrolyse incomplète des sucres polymères en sucres monomères (Ronald *et al*).

3.2. Broyage

Afin d'augmenter la surface spécifique et la réactivité du substrat au cours de l'hydrolyse, les grignons d'olives ont été broyés par mortier et pilon jusqu'à atteindre une granulométrie plus au moins fine. Afin d'éviter des granules de tailles inégales et de composition hétérogène, les grignons ont été tamisés à travers un tamis dont l'ouverture de maille est de 1mm. L'objectif de cette opération est d'obtenir un échantillon avec une granulométrie la plus homogène possible et de déterminer la distribution de la taille des particules. Enfin, le grignon d'olives en poudre a été placé dans un seau bien scellés et stockée à température ambiante jusqu'à son utilisation. Le broyage est considéré comme étant un mécanisme intense améliorant la digestibilité enzymatique de la cellulose (Nefzaoui, 1987).

II.4. Analyse physicochimique des grignons d'olives

4.1. Taux d'humidité ou teneur en eau

La teneur pondérale en eau des grignons est déterminée par la méthode gravimétrique. Elle s'exprime en pourcentage (%) c'est-à-dire en gramme d'eau pour 100 g de grignon déshydraté à 105° C (Federici *et al.*, 2011).

Le taux d'humidité s'exprime en % selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100$$

m₀: poids de la prise d'essai des grignons d'olive (g).

m₁ : poids de la prise d'essai des grignons d'olive à 105°C (g).

▪ **Mode opératoire :**

- On pèse 5g de grignons d'olives qu'on introduit dans un verre de montre (**m₀**), on place ensuite l'échantillon dans l'étuve 105 °C pendant en 2 heures ;
- On pèse de nouveau l'échantillon (**m₁**).

4.2. Taux de cendres

Le taux de cendres détermine la quantité de la matière minérale qui contenue dans les échantillons des grignons d'olives (NM ISO 749-2007).

▪ **Mode opératoire**

- 2g de grignons d'olives sont séchés dans l'étuve pendant 12 heures puis placés dans un creuset en céramique ;

- Ce creuset est mis dans un four pendant 45 min et réglé à 600°C jusqu'à l'obtention d'une couleur grise clair ou blanchâtre (**Figure 17**) ;
- Une fois la carbonisation est terminée, le creuset est retiré du four, refroidi à l'air libre puis pesé. Le taux de cendre est calculé par la formule suivante:

Tel que :

$$C\% = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \times 100$$

P₀ : Le poids du creuset vide en (g).

P₁:Le poids du creuset + échantillon séché à 105°C en(g).

P₂ : poids de creuset + le résidu calciné en(g).



Figure 17: Aspect de cendres obtenues à partir des grignons d'olives après séchage pendant 45 min à 600°C.

4.3. Cellulose brute « CB »

Déterminée par la méthode de Weende. L'échantillon subit une hydrolyse acide (H₂SO₄) et une autre alcaline (KOH). Les deux hydrolyses sont séparées par une filtration et un rinçage à l'eau chaude. Le résidu sec constitue la cellulose brute qui comprend la cellulose vraie, l'hémicellulose et la lignine (**M'SADAK *et al.*, 2015**).

II.5. Production du bioéthanol

La production du bioéthanol dans les grignons d'olives a été réalisée à partir de la biomasse lignocellulosique (les grignons d'olives) en adoptant les différentes étapes selon le protocole suivant: (**Figure 18**).

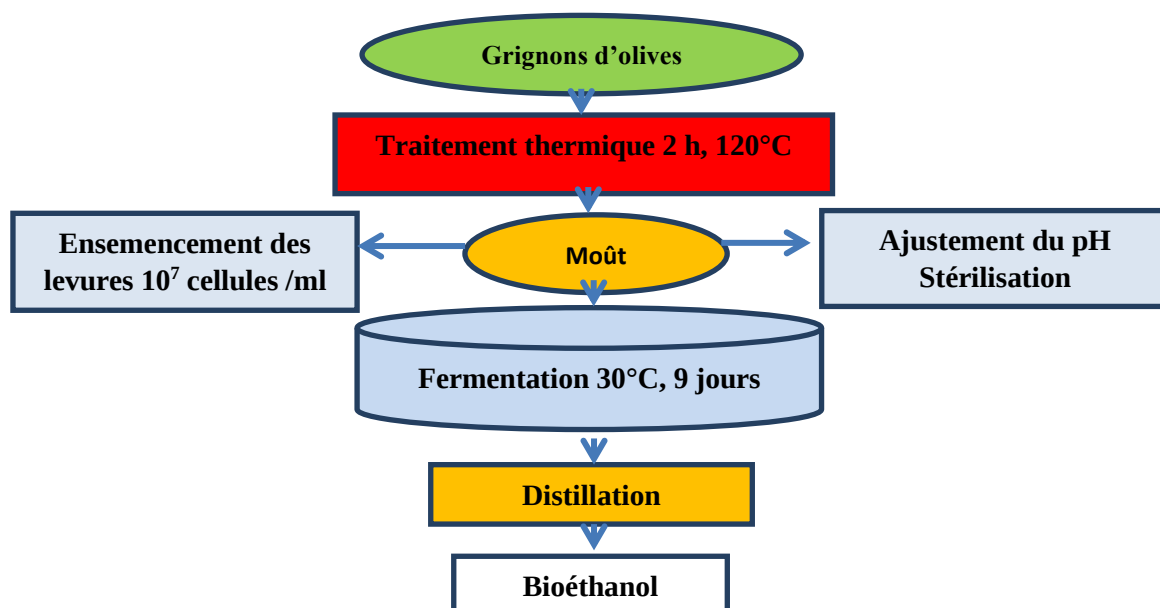


Figure 19: Diagramme de la production du bioéthanol à partir du moût de grignons d'olives (original).

La démarche suivie dans nos essais microbiologiques repose sur les travaux de **Rodier *et al.*, (2005)** ; **Menanne *et al.*,(2010)** et **Faurie,(2019)**

5. 1. Préparation du moût de fermentation à partir des grignons d'olives par un traitement thermique

Un moût est défini comme étant un liquide sucré servant de matière première dans les industries de fermentation

▪ Mode opératoire

- On met 40g de grignons d'olives dans un volume d'eau distillée
- Laissez à bouillir pendant 2h à 120°C.
- Après refroidissement, le mélange obtenu est filtré. On obtient alors le moût qui servira comme milieu de culture.



Figure 20 : Le moût de fermentation ou filtrat obtenu suite à une filtration sous vide.

5.2. Ajustement du pH

Le pH du moût est ajusté à 6 par une solution d'acide sulfurique une fois normale (H_2SO_4 , 1N) ou une solution alcaline d'hydroxyde de sodium une fois normale (NaOH , 1N).

5.3. Stérilisation

Le moût obtenu est stérilisé dans l'autoclave pendant 20 minutes sous une température de 120 °C. La stérilisation à la vapeur d'eau est la méthode de référence dans ce domaine, elle utilise la vapeur d'eau comme agent stérilisant pour l'inactivation des contaminations microbiennes.

5.4. Préparation de l'inoculum (préculture)

La phase de préparation de l'inoculum est la plus importante dans tout le processus de fermentation. Cette étape a pour but d'adapter notre souche de levure au milieu de fermentation utilisé. La souche estensemencée dans un volume bien déterminé du moût stérilisé.

5.4.1. Vérification de la pureté de la souche

L'espèce de levure *S. cerevisiae* sélectionnée dans le présent travail est celle commercialisée en Algérie. Elle doit être stockée à l'obscurité en étant hermétiquement fermée.

Une suspension de levure est préparée en mettant 2g de cette levure commercialisée dans 100 ml d'eau distillée stériles, une goutte de cette suspension est prélevée puis ensemencer dans des boîtes de pétri contenant le milieu Sabouraud. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 48 heures. La pureté de la souche est examinée par des observations sur les aspects macroscopiques ou culturels et microscopiques. Pour cette dernière on réalise un examen à l'état frais après coloration au bleu de méthylène en suivant la démarche en ci-après :

- Déposer une goutte de bleu de méthylène sur une lame propre ;
- Prélever une parcelle de culture à l'aide d'une pipette Pasteur ;
- Mélanger l'échantillon à la goutte de bleu de méthylène ;
- Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulles d'air ;
- Observer rapidement la préparation au microscope, à l'objectif x 40 puis x100 par immersion.

5.4.1. Préparation de l'inoculum

Une fois la pureté de la souche est confirmée, on procède à la préparation de l'inoculum à partir des cellules jeunes âgées de 24 h de la souche *saccharomyces serviciae*.

▪ Mode opératoire

- Préparation d'une suspension de *saccharomyces serviciae* (cellules levuriennes+eau physiologique).
- Réaliser le montage hématimètre de Malassez-lamelle : Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.
- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever 40 µL celle-ci à l'aide d'une micropipette. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la micropipette légèrement inclinée près de la lamelle sur

la plate-forme centrale quadrillée. Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes ;

- Observer au microscope à l'aide de l'objectif X 10 puis objectif X 40, en repérant le quadrillage.
- Contrôler l'homogénéité de l'échantillon.
- Réaliser la numération des levures par le Comptage des cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage pour avoir une suspension à raison de 10^7 levures/ ml.

La numération des cellules est calculée comme suit :

$$C = N \times \frac{1}{v} \times \frac{1}{d}$$

C : nombre de cellules par ml ;

N : nombre moyen des spores de comptage ;

v : volume de comptage ;

d : facteur de dilution.

II.6.Fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique consiste à transformer les sucres fermentescibles en anaérobiose par des levures en alcool et gaz carbonique avec dégagement de calories selon la réaction suivante:



L'étape de fermentation est indispensable dans le procédé global de production d'éthanol, car elle représente la transformation réelle des matières premières conditionnées et prétraitées en produit principal, l'alcool éthylique, à l'aide de bioagents tels que la levure ou d'autres micro-organismes producteurs d'éthanol (**Cardona et al., 2010**).

6.1. Conduite de la fermentation

Après ensemencement du milieu par la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*, la fermentation est conduite en batch dans des erlenmeyers de 500 ml à l'état statique. Chaque Erlen correspond au moût de fermentation (filtrat grignon) inoculé par 10ml d'une solution de *S. cerevisiae* concentrée à 10^7 Cellules/ml.

6.2. Suivi de la fermentation

Des prélèvements de moût de fermentation sont effectués chaque 03 jour pour mesurer le pH et le dénombrement de la biomasse levurienne.

6.2. 1. Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH est déterminé selon la norme **AFNOR X 31-103 (AFNOR, 1994)**, consiste en la mesure d'une différence de potentiel, elle s'effectue à l'aide d'un dispositif potentiométrique.

▪ Mode opératoire

- Mettre dans un bécher 10 ml du moût de fermentation préalablement prélevé
- Laisser agiter la solution pendant 5 min ;

- Rincer l'électrode abondamment avec de l'eau distillée ;
- Placer le bécher sous agitation magnétique ;
- Introduire l'électrode dans la solution à analyser ;
- Mettre en marche le potentiomètre.

▪ Lecture

Lire la valeur affichée par le potentiomètre après stabilisation, ainsi que la température de l'échantillon.

6.2. 2. Estimation de la biomasse

6.2. 2.1. La préparation des dilutions décimales

Chaque 3 jour, on prélève 10 ml du moût de fermentation qui sera considéré comme étant la solution mère. A l'aide d'une pipette stérile, on prélève 1ml de la solution mère qu'on introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, c'est la dilution 10^{-1} . De cette dernière, on prélève encore 1ml qu'on introduit dans un autre tube a 9ml d'eau physiologique c'est la dilution 10^{-2} . La même opération est répétée, jusqu'à obtention de la dilution 10^{-4} . Toutes les opérations sont réalisées aseptiquement à proximité du bec Bunsen.

6.2. 2. 2. Ensemencement

Le milieu Sabouraud est retenu pour ensemer notre levure en respectant les étapes suivantes (**Figure n**).

- Préparation de la gélose Sabouraud en le faisant fondre sur bain marie.
- Couler 10 à 15 ml de milieu.
- Laisser refroidir (maintenir le milieu à 47°C).
- Homogénéiser parfaitement.
- Couler le milieu dans les boites de Pétrie stériles.
- Transférer 0.1 ml de la solution mère et ses dilutions décimales (moût de fermentation) dans le milieu Sabouraud.
- Avec une pipette pasteur stérile étaler chaque goutte tout le long de la boite de Pétri
- Incuber à 30°C pendant 48 heures.

6.2. 2. 3. Dénombrement

Les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies. Les boites considérées et retenues sont celles dont le nombre de colonies est compris entre $30 \leq n \leq 300$. Le nombre de colonies par ml de moût est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte du facteur de dilution, selon la formule suivante :

$$N = n \times \frac{1}{v} \times \frac{1}{d}$$

N : nombre moyen de colonies en UFC/ml ;

n : nombre de colonies dénombrées ;

v : volume prélevé 0,1 ml ;

d : dilution.

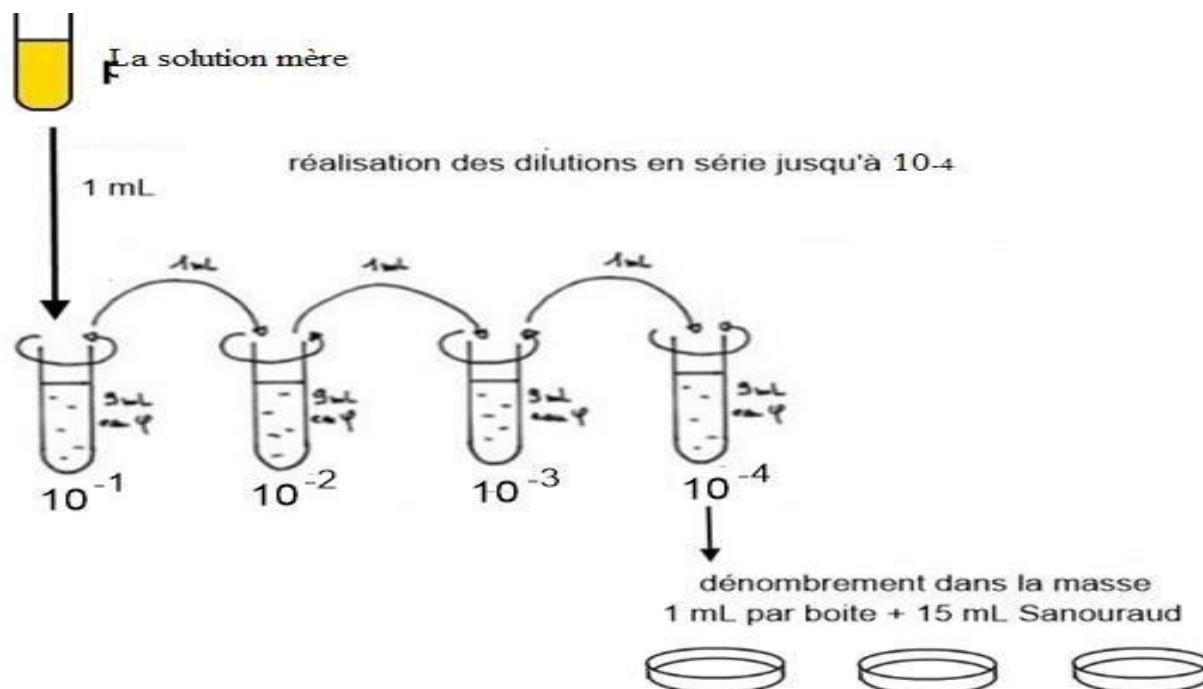


Figure 21: Etapes de la méthode de dénombrement indirect sur milieu solide (après dilutions décimales)

II.7 Détermination de la cellulose brute dans le mout de fermentation

Nous avons estimé la teneur de la cellulose brute au cours de la fermentation. A cet effet, on a effectué 2 prélèvements de mout de grignons (au 1^{er} et au 9^{ème} jour).

La teneur en cellulose brute est déterminée par la méthode conventionnelle de Weende comme déjà indiqué plus haut (M'SADAK *et al.*, 2015).

II.8. Séparation et récupération du bioéthanol par distillation

A la fin de la fermentation, le milieu de culture obtenu est distillé afin d'extraire l'éthanol. La température de distillation est de l'ordre de 78 °C (Pendant 2 heures). Dans notre cas on a utilisé un évaporateur rotatif de type *Heidolph*.

▪ Principe :

Le principe d'un évaporateur rotatif est basé sur la distillation sous vide (partiel). La solution est mise en rotation pour augmenter la surface d'évaporation puis la pression est diminuée grâce généralement à une pompe à eau. La vitesse de rotation et le vide créés permettent l'évaporation à des températures inférieures aux températures d'évaporation des solutions à évaporer (Offoumou *et al.*, 2019).

La préparation de l'évaporateur rotatif pour la distillation du moût de fermentation se fait en chauffant d'abord l'eau du Bain-marie en réglant sa température à 78 °C à l'aide du thermostat : cette température sera adaptée au point d'ébullition de l'éthanol. (Figure n°22). Cette opération est suivie d'une évaporation puis d'un arrêt d'évaporation.

8.1. Evaporation

- Faire circuler l'eau dans le réfrigérant.
- Déclencher la pompe à eau : le robinet doit être au maximum de son débit.
- Graisser très légèrement le rodage du ballon d'évaporation à l'huile de silicone.
- Fixer le ballon, contenant le solvant à extraire sur le conduit le conduit de vapeur à l'aide d'un clic adapté.
- Fermer doucement le robinet de mise sous vide pour mettre l'ensemble de l'appareil sous pression réduite.
- Mettre le ballon en rotation.
- Descendre le ballon pour mettre en contact avec l'eau du bain-marie.
- Adapter la vitesse de rotation à la vitesse d'évaporation.
- Fermer la vitre de protection de la hotte.

8.2. Arrêt de l'évaporation

- A la fin de l'évaporation, retirer le ballon du système de chauffage du bain-marie,
- Attendre le refroidissement du ballon,
- Couper la rotation,
- Remettre l'ensemble à la pression atmosphérique en ouvrant doucement le robinet de mise sous vide,
- Enlever le clip et retirer le ballon dans le prolongement du conduit,
- Poser le ballon bouché sur le valet,
- Fermer la trompe à eau et la circulation d'eau dans le réfrigérant.



Figure 22: Montage de distillation par un évaporateur rotatif

8.3. Récupération du bioéthanol

La récupération du bioéthanol est faite en vidant le contenu du ballon récepteur dans un bécher propre pour effectuer un test qualitatif confirmant la production de

bioéthanol.

II.9. Estimations qualitatives du Bioéthanol

L'analyse qualitative de la production de bioéthanol a été examinée par le réactif de Jones ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{SO}_4$) (**Jones *et al.*, 1953**). 2 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (2%), 1 ml H_2SO_4 concentré a été ajouté à 1 ml d'échantillon distillé. L'éthanol s'oxyde en acide acétique avec un excès de dichromate de potassium en présence d'acide sulfurique et donne une couleur bleu-vert. La formation de couleur verte indique que la source de carbone utilisée produit de l'éthanol sur fermentation (**Periyasamy *et al.*, 2009**).

Résultats et discussion

III.1. Analyses physicochimiques des grignons

Les résultats des analyses physicochimiques conduites sur les grignons d'olives issus de la station de trituration de Béjaia sont portés sur le tableau en ci-dessous.

Tableau 6: Paramètres physicochimique des grignons d'olives.

Paramètres physicochimiques	% en poids sec	Résultats antérieures	Références
Ph	6.4	6 à 8	Mennane <i>et al.</i> , 2010).
Taux de cendres	1,76%	4,16%	Mennane <i>et al.</i> , 2010).
Taux d'humidité	7%	34.87% à 7%	Mennane <i>et al.</i> , 2010) et Draï et Kabour (2011)
Cellulose brute	41%	43,51%	M'sadak,(2015).

La composition physico chimique des grignons dépend des facteurs intrinsèques de la variété et du stade de maturité de fruit, du procédé d'extraction de l'huile et aussi de l'épuisement par les solvants (Nefzaoui ,1985),

Une bonne multiplication et croissance des bactéries et des champignons se réalisent pour un pH proche de la neutralité (6 à 8) ou légèrement acides (Mennane *et al.* 2010). Notre échantillon de grignon, présente un pH de 6,8 très comparable aux résultats des travaux déjà effectués et donc favorable au maintien en vie et à la croissance et au développement des microorganismes chimioorganotrophes. Selon les littératures, les teneurs en humidité et en matière sèche varient dans de très large limite et sont en étroite relation avec le type des grignons d'olive, les systèmes d'extraction d'huile d'olive, aux conditions de stockage ainsi que le stade de maturation d'olives.

Le taux d'humidité de nos grignons est très faible (7%), il est similaire à celui enregistré par Draï et Kabour (2011), qui ont travaillé sur les grignons issus de la région de Béjaia (la même que la nôtre) et trop bas comparativement au taux d'humidité signalé par Mennane *et al.* 2010 travaillant sur des grignons issus des maâsra en Tunisie.

Les cendres représentent le résidu inorganique restant après que l'eau et la matière organique ont été éliminées par combustion, ce qui fournit une mesure de la quantité totale de minéraux dans la biomasse. Le taux de cendre (fraction minérale) enregistré pour nos grignons est très faible et est évalué à 1.76 %, Selon la littérature, la teneur en cendre des grignons est normalement faible (doit être comprise entre 3% à 5%) et varie selon la zone géographique, la méthode de cueillette des olives, leurs lavages au niveau des huileries avant la trituration et aussi les procédés d'extraction d'huile d'olive. Par ailleurs, les valeurs élevées en cendres sont probablement dues au manque de lavage et à la présence des fractions de sol avec les olives lors de la trituration (Bouknana *et al.*, 2014).

III.2. Conduite de la fermentation

2. 1. Vérification de la pureté de la souche *Saccharomyces cerevisiae*

Après 24h d'incubation, de petites colonies blanches ont apparues sur milieux Sabouraud de consistance crémeuse, brillantes, lisses et peu extensives (Fig. 23). Une description donnant les caractéristiques macroscopiques de la levure *S. cerevisiae* comme décrite dans la littérature.



Figure 23: Aspect macroscopique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* après 24 de culture sur milieu Sabouraud.

De point de vue microscopique, les cellules levurienne se présentent sous une forme globuleuse ovoïde, allongées avec un mode de reproduction par bourgeonnement bien apparent. (Fig. 24)

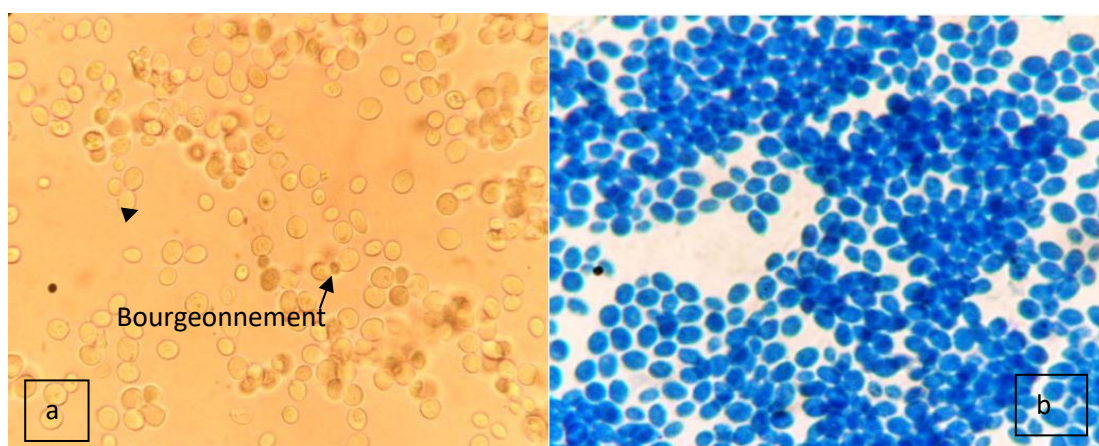


Figure 24: Aspect microscopique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* observée par le microscope photonique (grossissement x 100).

a) À l'état frais, b) après coloration au bleu de Méthylène.

2.2. Suivi de la fermentation

Au cours de la fermentation de *S. cerevisiae* sur le moût des grignons, nous avons suivi l'évolution des paramètres pH, biomasse cellulaire du 1^{er} au 9^{ème} jours à travers 4 prélèvements (1^{er} jour, 3^{ème} jour, 6^{ème} jour et 9^{ème} jour) (Fig. 20) et l'évolution de la source de carbone (cellulose brute) avec 2 prélèvements : au 1^{er} jour et au 9^{ème} jour (Fig.25).

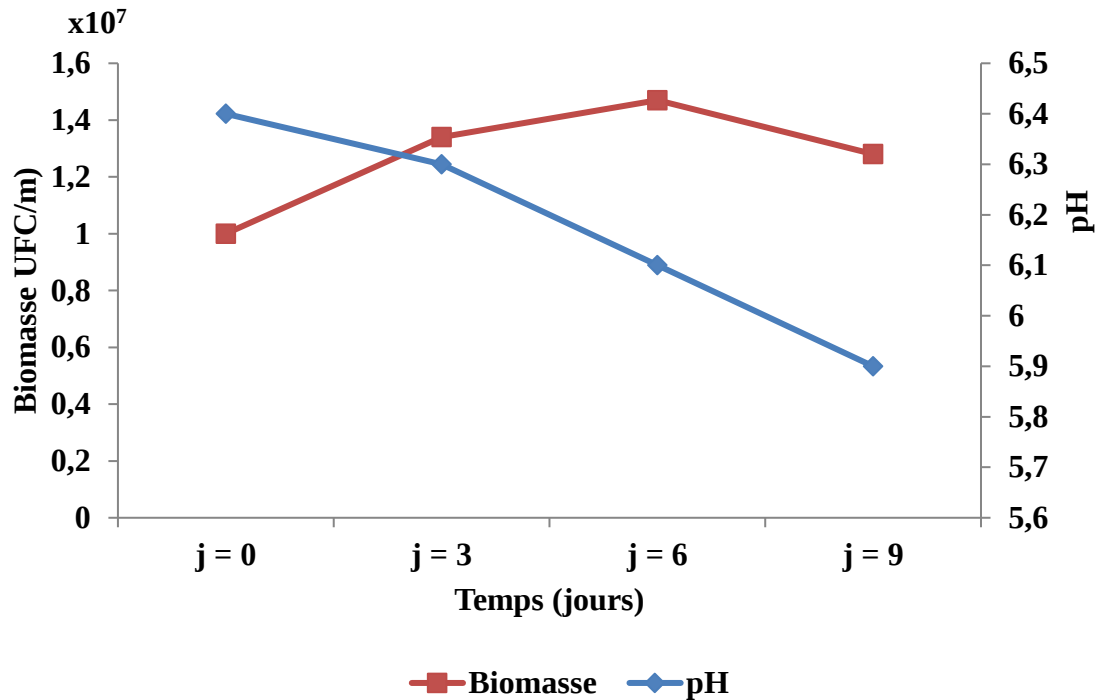


Figure 25: Evolution du pH et de la concentration cellulaire de *S. cerevisiae* au cours de la fermentation sur moût de grignons.

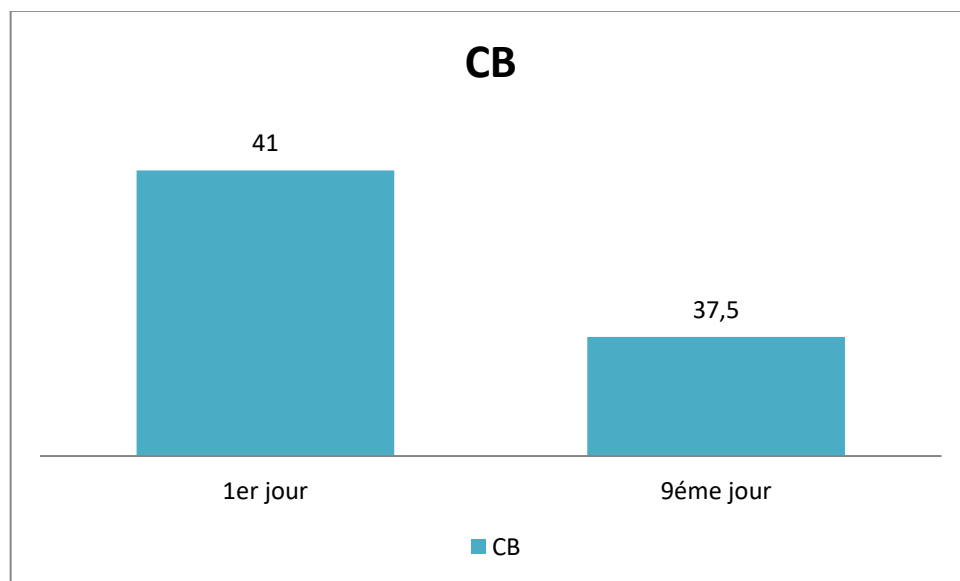


Figure 26 : Taux de cellulose brute relevé au 1^{er} et au 9^{ème} jours de la fermentation de *S. cerevisiae* sur moût de grignons d'olive.

2.2.1 Evolution du pH

L'évolution du pH de la levure *S. cerevisiae* au cours de la fermentation sur moût des grignons d'olive est représentée dans le graphique suivant (Fig.25).

Au cours de la fermentation, le pH de moût de notre grignon n'a pas cessé de diminuer pour atteindre la valeur de 5,9 au 9^{ème} jours de fermentation. Cette chute du pH s'explique par l'assimilation des sucres par la levure (cellulose). La diminution du pH peut être tributaire à l'excrétion ou la synthèse des produits acides issus du métabolisme des éléments nutritifs qui rentrent dans la composition du milieu de culture utilisé, notamment les sources de carbone telles que les sucres (cellulose).

La production d'alcool à partir des sucres entraine une modification des dissociations des constituants du mout et principalement des acides organiques présents initialement dans le mout. En présence d'éthanol, la dissociation est moins importante et il en résulte alors un pH plus bas.

2.2.2. Evolution de la biomasse

L'évolution de la biomasse fongique non mycélienne au cours de la fermentation sur moût de grignon est représentée sur les figures 27.



Figure 27 : Evolution de la biomasse de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation sur moût de grignons.

Le suivi de production de biomasse de *S. cerevisiae* sp. Au cours de la fermentation sur les grignons d'olives montre une augmentation progressive de nombre de spores du 1^{er} au 6^{ème} jour. L'augmentation de la biomasse signifie le développement du champignon qui se traduit par l'utilisation de la source de carbone contenu dans le milieu de culture qui est la cellulose.

Le nombre de cellules levurienne contenues dans le milieu de fermentation a connu une augmentation progressive allant de 10^7 à 5.61×10^7 spores/ml. Au 9^{ème} jour, on assiste à un ralentissement de la croissance de *S. cerevisiae* ceci est dû probablement à l'épuisement et l'appauvrissement du substrat en éléments nutritifs et l'accumulation des toxines dans le milieu (Branger *et al.*, 2007). Pour notre cas, cette diminution s'explique par l'arrêt de la fermentation et les levures ne se multiplient plus à cause de l'accumulation des déchets essentiellement

l'éthanol qui joue un rôle important dans l'inhibition de l'activité des microorganismes et de la levure *S. cerevisiae*.

2.2.3 Evolution de la cellulose brute

Les résultats obtenus sur le graphique de la figure n°21, montrent une diminution de la teneur en cellulose durant la fermentation. En effet, elle est passée de 41% à 37.5% du 1^{er} jour au 9^{ème} jour. Ceci explique que le substrat lignocellulosique a été utilisé et qu'il y a eu une hydrolyse de la CB par les hydrolases (cellulases) secrétées par notre levure.

Selon la littérature, cette forte diminution de la teneur correspondant de la quantité d'enzyme dégradant la carboxyle méthyl cellulose en carbohydrates réduit (1 μ mol de glucose/mn). (Raimbault, 1998).

Nos résultats sont similaires au résultat obtenu par (Ghoumraça, 2012) sur l'étude de production de biomasse d'*Aspergillus Niger* sur les grignons d'olives ; allant de 41,06% à 35,25%.

2.3. Mise en évidence de la production de bioéthanol

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

Après le test du l'acide sulfurique et de dichromate, a conduit à l'apparition de la couleur verte (Fig. 28) indicatrice de la présence d'éthanol excrété par la levure *S. cerevisiae* durant la fermentation sur moût de grignons.



Figure 28: Test confirmatif de la production du bioéthanol à partir du moût de grignons d'olive par la levure *S. cerevisiae*

Contrairement aux autres fermentations, la fermentation alcoolique, à base de levures, ne concerne encore aujourd'hui qu'une catégorie bien précise de déchets organiques

La formation de coulure verte indique que la source de carbone utilisé produit de l'éthanol sur fermentation (Periyasamy *et al.*, 2009). (L'éthanol s'oxyde en acide acétique avec un excès de dichromate de potassium en présence d'acide sulfurique et donne une couleur bleu-vert).

Conclusion générale

Conclusion générale

Les activités agricoles et agro-industrielles génèrent des quantités importantes de déchets qui constituent une nuisance certaine pour l'environnement et une perte de matière recyclables. Une attention particulière doit être accordée à une meilleure gestion des déchets organiques et en particulier les sous-produits provenant de ces deux secteurs. Le présent travail a montré que la valorisation des sous-produits de l'olivier « grignon d'olive », en vue de leur éventuelle transformation en bioéthanol. Ce substrat est très riche en biomasse lignocellulosique (BLC), dont la transformation par voie fermentaire semble prometteuse. Les résultats de la caractérisation physicochimique fait ressortir un pH neutre, un taux d'humidité de 7 %, un taux de cendres de 1,76 % et un taux de CB de 41 %.

Le suivi de la fermentation a révélé que la levure *S. cerevisiae* a pu utiliser la cellulose comme source de carbone pour accomplir ses besoins de croissance. En effet, au cours de la fermentation, on a enregistré une diminution du pH de moût de grignon et une baisse de la quantité de CB (32,5%). En fin de fermentation (9ème jour) on a pu détecter la présence de bioéthanol excrété par notre levure.

En perspective, il y a lieu d'optimiser la fermentation alcoolique sur grignons d'olive ainsi que d'explorer et valoriser d'autres sources de déchets agricoles. Aussi, il serait intéressant et judicieux de quantifier la fraction de bioéthanol produit, de le caractériser et le purifier.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Aguilar Uscanga, B.R., (2003). Influence des paramètres de croissance et des conditions de mise en oeuvre sur la composition et l'architecture de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse INSA Toulouse.

- **Aurélié Amic et Cécile Dalmasso** Unité de valorisation complète de déchets oléicoles par lombricompostage : Production de produits à haute valeur ajoutée : lombricompost, savon, collagène et lombrics 2013 Mém.Master. Univ.Ex. Marseille, Paris, 50p.

- **Bai F, Anderson W et Mooyoung M**, « Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks », *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, n° 1, p. 89-105, janv. 2008.

- **Ballerini D, Casanave D, Forestière A, Lacombe S et Montagne X**, « Chapitre 2 : L'éthanol et l'ETBE », in *Les biocarburants*, Editions TECHNIP, 2006.

- **Bellam et Fould Springer (1996)** ; Levure et panification -Nathan Communication Paris, - 73

- **Benaouida K., (2008).** Étude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées dans un milieu à base de lactosérum. Mémoire de magistère. Université mentouri Constantine. Algérie, 104 pages.

- **BERRICHE A et LARBI M. (2019).** Production d'éthanol à partir de grignon d'olive par procédé de Saccharification et de Fermentation Simultanées (SFS). Mémoire. Université Akli MOHAND OULHADJ. Bouira.

- **Bianchi G. (2003).** Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipids and Science Technology*, 105: 229-242.

- **Blom, J., Mattos, M.J.T.D., et Grivell, L.A., (2000).** Redirection of the Respiratory Fermentative Flux Distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by Overexpression of the Transcription Factor Hap4p. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, pp 1970 - 1973.

- **Boskou D. (2006).** Olive Oil: Chemistry and Technology, Second Edition (AOCS Publishing).

- **Botton B., (1991)** - La physiologie des levures Ds.

- **BOUCHERBA N. (2015).** Valorisation des résidus agro-industriels. . Mémoire. Université Abderrahmane Mira. Bejaia.

- **BOUDISSA F, 2012.** Influence des radiations micro-ondes sur l'extraction de l'huile de grignon d'olive imprègne de margines. Mémoire de Master, faculté des sciences, université MOULOUD MAMMERI, Tizi-Ouzou, 90p.

- **Bouix M et Leveau J.Y. (1999).** Production des enzymes. In : Scriban R. (Ed) : Biotechnologie. Ed. Lavoisier. P : 334.

- **Bouix, M et Leveau, J.Y., (1993).** Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Technique et documentation-Lavoisier-Apria. Paris, pp 523.

- **BOUKNANA D, HAMMOUTI B, SALGHI R, JODEH S, ZARROUK A, WARAD I, AOUNITI A et SBAA M (2014).** Physicochemical characterization of olive oil mill wastewaters in the eastern region of Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.*, 5 (4), 1039-1058.

- **Bounoua, F. (2017).** Production de bioéthanol à partir des déchets de l'industrie de transformation de pomme de terre. *Chimie et environnement*, 22.

- **Cardona, C. A et Sanchez, O. J. (2007).** Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour. Technol.* 98: 2415-2457.

- Cardona, C. A, Sanchez, O. J et Gutierrez, L. F. *Process Synthesis for Fuel Ethanol Production*. CRC Press, 2010.
- Carol L, Williams, Anju Dahiya et Pam Porter. *Bioenergy: Biomass to Biofuels*, chapter Introduction to Bioenergy, pages 5 – 36. Elsevier Inc., 2015.
- Conseil Oléicole International. (2015). Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive.
- Cortesi N., Rovellini P., et Fedeli E. (2000). Cultivars, technologie et qualité des huiles d'olive. *Olivae*, 81 : 26-3.
- Covas M.I. (2007). Olive oil and the cardiovascular system. *Nutritional Pharmacology*, 55 (3) :175-186.
- Datta, R. (1981). Energy Requirements for Lignocellulose Pretreatment Processes. *Proc. Biochem.*, juin-juillet, 16-19.
- Della Greca M. Monaco P, Pinto G, Polio A, Previtera L et Temussi F (2001); phytotoxicity of low molecular-weight phenols from olive mill waste waters; bulletin of Environmental contamination and toxicology, 67, p352-359.
- Dhyani Vaibhav et Bhaskar Thallada (2018). A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Renewable Energy*, 129, Part B, pp. 695-716.
- Ducom Gaëlle, Gautier Mathieu, Pietraccini Matteo, Tagutchou Jean-Philippe, Lebouil David et Gourdon Rémy (2020). Comparative analyses of three olive mill solid residues from different countries and processes for energy recovery, by gasification. *Renewable Energy*, 145, pp. 180-189. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.116>.
- El Antari A., El Moudni H., AjanaH et Cert A. (2003). Etude de la composition lipidique de deux compartiments du fruit d'olive (pulpes et amandes) de six variétés d'oliviers cultivées au Maroc. *Olivae*, 98 : 20-28.
- Fedeli Enzo, technologie de production et de conservation de l'huile, encyclopédie mondiale de l'olivier. 1997, P253-283.
- Fedeli, E, et camurati, F : valorisation des margines et des grignons épuisés par récupération de quelques composants. In séminaire International sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. PNND/FAO/COL. Monastir, Tunisie, Décembre 1981.
- Ferreira Fennesy ; (1997). *Saccharomyces cerevisiae* : importance dans le développement des sociétés humaines. Rôle dans l'industrie agro-alimentaire et en thérapeutique. - 119 p. Thèse : Pharmacie : Paris XI.
- Filières de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche, et Actions du Ministère de l'Agriculture de l'Elevage et de la Pêche » ; p 4-6 Juillet 2004 (juin 2018).
- Ghedira K. (2008). L'olivier. *Phytothérapie* 6, 83–89.
- GHOU MRASSA BAYA, 2012 : essai préliminaire pour la culture d'une souche locale d'*Aspergillus niger* sur grignons d'olive. mém. mast. umbb.boumerdes.algérie.86p.
- Gong, C.S, Maun C.M., et Tsao, G.T. (1981) Direct Fermentations of Cellulose to Ethanol by a Cellulolytic Filamentous *Fungus Monilia sp.* *Biotech. Lett.* 3, 2, 131-144.
- Guinet R et Godon B. (1994) ; La panification Française Ed. Tec & Doc. -521 p.
- Guiraud, J.P., (1996). Microbiologie alimentaire. (Ed) Dunod. Paris, pp 9 – 320.
- Jay, J. (1996). *Modern Food Microbiology*, 5th ed. London: Chapman and Hall. 661p.

- **Jeremy Boucher** "Etude des possibilités de production d'éthanol hémicellulosique dans le cadre d'une bioraffinerie papetière". Thèse de doctorat ; Université de Grenoble (juin 2014) vol 209 pages 17-58.
- **Jones-Jones reagent.** (1953). Chromic acid oxidation of cyclohexanols to cyclohexanones J Chem Soc 457:2548–3019.
- **Jørgensen Henning; Kristensen Jan Bach et Felby Claus Felby.** Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: Challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1 :119–134, 2007.
- **Kaidi F et Touzi A., 2001.** production du bioéthanol à partir des déchets de dattes. Revue Energie Renouvelable. : Production et Valorisation – Biomasse, pages 75-78.
- **Kailis., S.G. (2017).** Olives. In Encyclopedia of Applied Plant Sciences, (Elsevier), pp. 23–245.
- **Kara Ali M., (2014).** Isolement et caractérisation de souches levuriennes des milieux arides productrices de l'éthanol sur différents substrats. Thèse de doctorat, Université Constantine 1, Algérie. 129 pages.
- **Koutsaftakis A. et Stefanoudakis E. (1995).** L'extraction de l'huile d'olive par un décanteur à deux phases : résultats obtenus. *Olivae*, 56 : 44-47.
- **Lai Q.P (2010).** Utilisation des levures non saccharomyces en œnologie : études des interactions entre *Torulaspora delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes, thèse de doctorat, université de Toulouse.
- **Larpent J.P. (1991).** Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris. P : 266-373.
- **Larpent, J.P., (1990).** Biotechnologie des levures masson, Paris, pp 132 - 315.
- **Leyral G. et Vierling É., 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires. 4ème édition, Doin, pp 20-36.
- **Manyri L.** Analyse automatique d'images de populations microbiennes. Thèse de Doctorat, Institut National des sciences Appliquées de Toulouse, France, (2005).
- **Maris A.J. A, Abbott D. A, E. Bellissimi E, Brink J, Kuyper M, Lutik M. A. H, Wisselink H. W, Scheffers W. A, Dijken J. P, et Pronk J. T,** « Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status », *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 90, n° 4, p. 391-418, oct. 2006.
- **Martilotti et Fernanda-** use of olive by-products in animal feeding In Italy. Division de la production et de la santé Animale FAO, Rome ; 1983.
- **McMillan, J.D. (1994)** Pretreating Lignocellulosics Biomass: a Review. In *Enzymatic Conversion for Fuels Production*, M.E. Himmel, J.O. Baker, and R.P. Overend, eds., ACS Symposium Series 566, chap. 15, American Chemical Society, 411-437.
- **Mennane Z, Tada S, Aki I, Faid M, Hassani S et Salmaoui S (2010)** Physicochemical and microbiological characterization of the olive residue of 26 traditional oil mills in Beni Mellal, Technologies of Laboratory, 5: 4-9.
- **MOHAMMEDI H., 2004.** Diagnostique phytoécologique et des espaces productifs et naturels en Algérie occidentale. Thèse de doctorat en Ecologie appliqué à Sidi Bel Abbès, p 204.
- **Mounir M, Shafiei R, Zarmehrkhoshid R, Hamouda A, Delvigne F et Ismaili Alaoui M (2016).** Optimization of biomass production of *Acetobacter pasteurianus* KU710511 as a potential starter for fruit vinegar production. *African Journal of Biotechnology* 15 :1429- 1441.

- **M'SADAK Y, MAKHLOUF M et S. EL AMROUNI S 201** : Évaluation qualitative et possibilités de valorisation biologique de la biomasse oléicole reprise dans le Sahel Tunisien. Jour.New.Science.Vol. 18(4).
- **Nefzaoui A, (1985)** : "Valorisation des lignocelluloses dans l'alimentation des ruminants par les traitements aux alcalis. Application aux grignons d'olive". Thèse de doctorat d'Etat, Université Catholique de Louvain.
- **Nefzaoui A. (1984)** : Utilisation des grignons d'olive en alimentation animale dans le bassin méditerranéen. Publication du laboratoire de biochimie de la nutrition U.C.L, Belgique.
- **Nefzaoui A.** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'olivier (CEE. CIHEAM. TUNISIE). Tunis, du 20 au 22 janvier 1987.
- **Nefzaoui Ali,** valorisation des sous-produits de l'olivier, CIHEAM-Options méditerranéennes. Série seminars- N° 16- 61-65, 1991.
- **Paraskeva P et Diamadopoulos E., (2006).** Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology **81**, 1475–1485.
- **Periyasamy S, Venkatachalam S, Ramasamy S, et Srinivasan V (2009):** Production of bioethanol from sugar molasses using *Saccharomyces cerevisiae*. Mod. Appl. Sci 3(8) :32–3
- **Pierre T. (2004).** Les organismes modernes. La levure, édition belin, Paris.
- **PILON G., 2013.** Étude de production et de caractérisation de bio charbon de panic érigé (*panicum virgatum* L) obtenus par pyrolyse. Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke, Canada, 192 pages.
- **Pourquié, J. et Vandecasteele, J.P. (1993)** Conversion de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzymatique et fermentation. *Biotechnologie*, 4e édition, René Scriban, coordinateur Lavoisier TEC & DOC, Paris, 677-700.
- **Pratima Bajpai** "Advances in Bioethanol" Springer 2013, vol 100 pages 79-86.
- **Queinnec I., (2000).** Contribution à la commande de procédés biotechnologiques : application au traitement biologique de la pollution. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- **Rafael Luque et Juan Campelo and James Clark** "Handbook of Biofuels production" vol 674 Woodhead Publishing Limited, 2011 pages 204-215.
- **Raimbault, M 1998:** General and microbiological aspects of solid substrate. Electronic Journal of Biotechnology, vol. 1, n°3, p.174188.
- **Ralph J, Brunow G, et Boerjan W,** « Lignins », in *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- **Regnault IP. (1990)** ; Microbiologie générale - Vol. Ed. Vigot -859 p.
- **Riess J., 2012.** intensification de la brique « fermentation alcoolique » des Substrats.
- **Sablayrolles, J. M. (1992).** Importance de l'azote assimilable et de l'oxygène sur le déroulement de la fermentation alcoolique. Biologie. Og. VI (1-2). 155-160.
- **Sahir-Halouane F, Benzina Farida, Kebour S. and Draï S. 2015** -Test of Culture and Biomass Production of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Bals. -Criv.) (Vuil., 1912) on Lactoserm, Margine and Olive Pomace. Journal of Environmental Science and Engineering B 4 (2015) 547-552.
- **Sansoucy Rene,** Problèmes généraux de l'utilisation des sous-produits agro industriels en alimentation animale dans la région méditerranéenne, CIHEAM-Options méditerranéennes. Série séminaires- N° 16- 75-79, 1991.

- **Scheffers, W. A.** (1992). Contaminants in Baker's yeast, proceeding of the COMMET course on Microbial Contaminants. Helsinki 1991 and 1992. Ed. By *M. Korhola and V. Bacstrom.* *Research.* 7 : 19-36.
- **Scriban R. (1988)** ; Les Industries Agricoles Alimentaires Ed. Tec & Doc, 1988.
- **Sébastien Veillet, 2010** : Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation, thés. Doc.Univ. Avignon, France,151p.
- **Suarit, R., Gopal, P.K., et Sherped, M.G., (1988).** Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol*, 134, pp 2359 - 2368.
- **Thuriaux P. (2004).** Les organismes modèles de la levure. Ed. Belin. P: 15, 17, 23, 24, 27, 42 et 44.
- **Tirigui AX4hmed, PNUD-Tnisie/ANME** Etude en vue de l'élaboration d'un plan d'action pour l'utilisation énergétique des sous-produits de l'oliveraie tunisienne, Projet.
- **Vladescu B. (1994)** ; La levure dans les industries alimentaires Ed. Tec & Doc, Lavoisier. - 56 .