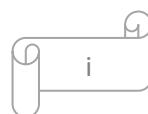


## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	i
LISTE DES FIGURES .....	iv
LISTE DES TABLEAUX .....	vi
LISTE DES ANNEXE .....	vii
LISTE DES ABREVIATIONS .....	viii
INTRODUCTION .....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I : MANIOC .....	3
I. GENERALITE SUR LE MANIOC .....	3
I.1. ORIGINE .....	3
I.2. DESCRIPTION BOTANIQUE .....	3
I.3. REPARTITION GEOGRAPHIQUE .....	4
I.4. MILIEU NATUREL DE LA PLANTE .....	4
I.5. COMPOSITION BIOCHIMIQUE DU MANIOC .....	4
I.6. UTILISATION DU MANIOC .....	5
II. L'AMIDON .....	6
II.1. DESCRIPTION .....	6
II.3. CARACTERISTIQUES DE L'AMIDON DES TUBERCULES DE MANIOC .....	8
CHAPITRE II : ETAPE DE PRODUCTION D'ETHANOL A PARTIR DU MANIOC .....	9
I. HYDROLYSE .....	9
I.1. HYDROLYSE ENZYMATIQUE .....	10
I.2. HYDROLYSE ACIDE .....	10
I.3. LES SUCRES REDUCTEURS .....	11
II. FERMENTATION .....	12
II.1. PRINCIPE DE LA FERMENTATION .....	13
II.2. FERMENTATION ALCOOLIQUE .....	13
II.3. LA LEVURE SACCHAROMYCES .....	13



II.4. PARAMETRE PHYSICO-CHIMIQUES DE LA FERMENTATION.....	14
II.5. LES DIFFERENTS PRODUITS FORMEES PENDANT LA FERMENTATION .....	14
II.6. MECANISME REACTIONNEL DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE.....	16
III. DISTILLATION .....	17
IV. LE BIOETHANOL.....	17
IV.1. CARACTERISTIQUE D'ETHANOL.....	17
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	
I. PREPARATION DE LA FARINE DE MANIOC .....	18
II. DETERMINATION DU TAUX D'HUMIDITE DE LA FARINE DE MANIOC....	18
II.1 PROCESSUS DE DETERMINATION DE TAUX D'HUMIDITE .....	19
II.2. EXPRESSION DU RESULTAT .....	19
III. DETERMINATION DE LA TENEUR EN AMIDON DE LA FARINE .....	19
III.1. DETERMINATION DU POUVOIR ROTATOIRE TOTAL P .....	20
III.2. DETERMINATION DU POUVOIR ROTATOIRE P' DES SUBSTANCES SOLUBLES DANS L'ETHANOL .....	20
IV. HYDROLYSE ENZYMATIQUE .....	20
IV.1. PRETRAITEMENT DE L'AMIDON DE MANIOC .....	21
IV.2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'AMIDON DE MANIOC PROPREMENT DIT .....	21
IV.3. DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR LE D.N.S.....	22
IV.4. RENDEMENT D'HYDROLYSE.....	23
V. FERMENTATION ALCOOLIQUE .....	24
V.1. PREPARATION DE SOUCHE MICRO-ORGANISME (LEVURE SACCHAROMYCES).....	24
V.2. PRE CULTURE .....	25
V.3. CULTURE DISCONTINUE.....	25
V.4. COMPTAGE DE LA BIOMASSE PENDANT LA FERMENTATION .....	26
VI. LA DISTILLATION.....	29

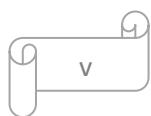
## RESULTATS ET DISCUSSION

I.	COMPOSITION CHIMIQUE DE LA MATIERE PREMIERE.....	30
I.1.	HUMIDITE ET MATIERE SECHE .....	30
I.2.	TENEUR EN AMIDON .....	30
II.	HYDROLYSE ENZYMATIQUE.....	31
II.1.	TENEUR EN SUCRES REDUCTEURS.....	31
II.2.	DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN SUCRE REDUCTEURS ..	32
II.4.	RENDEMENT D'HYDROLYSE .....	34
III.	FERMENTATION .....	35
III.1.	EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE SUCRE REDUCTEUR .....	35
III.2.	COMPTAGE DE LA MICRO-ORGANISME PENDANT LA FERMENTATION .....	36
III.3.	EVOLUTION DE LA DENSITE DU MOUT .....	38
III.4.	EVOLUTION DE DEGAGEMENT DE GAZ CO <sub>2</sub> .....	39
IV.	DISTILLATION .....	40
CONCLUSION .....	41	
BIBLIOGRAPHIES .....	43	
ANNEXE .....	I	
I.	MECANISME REACTIONNEL DE LA FERMENTATION .....	I
II.	PREPARATION DES SOLUTIONS DE CARREZ .....	II
III.	TABLEAU DE DENSIMETRE POUR DETERMINER LE DEGRE ALOOLIQUE ..	II
IV.	UNE AUTRE METHODE POUR DETERMINER LE DEGRE ALCOOLIQUE AVEC UN ALCOOLISEUR .....	III

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Racines fraîches de manioc Variété douce .....	5
Figure 2: Racines fraîches de manioc Variété amère .....	5
Figure 3: Amidon de manioc.....	6
Figure 4: Formes et tailles des granules d'amidon de manioc, d'après ATKIN (1999) .....	6
Figure 5: Structure et ultra structure d'un grain d'amidon classique d'après LEVEQUE et al .....	7
Figure 6: Photographie et représentation schématique d'un grain d'amidon d'après JENKINS ; DONALD (1998) .....	7
Figure 7: Structure moléculaire de l'amylose, source Parker, 2001 .....	8
Figure 8: Représentation chimique de l'amylopectine : source Shinnosuke Onuki .....	8
Figure 9: Processus de production d'éthanol .....	9
Figure 10: Représentation chimique du maltose .....	11
Figure 11: Projections du D-glucose .....	11
Figure 12: Les trois types de mode de fermentation .....	12
Figure 13: Molécule d'alcool éthylique [Source : Tiré de Leiden Observatory (2007)] .....	17
Figure 14: Diagramme de fabrication de la farine de manioc .....	18
Figure 15: Prétraitement de l'amidon de manioc .....	21
Figure 16: Hydrolyse enzymatique .....	21
Figure 17: préparation de la levure saccharomyces .....	25
Figure 18: Fermentation alcoolique .....	26
Figure 19: Lame de Malassez.....	26
Figure 20: Microscope Optique.....	26
Figure 21: Distillation .....	29
Figure 22: Courbe étalon de la densité optique en fonction de la concentration de glucose .....	32
Figure 23: Courbe de la concentration de glucose en fonction du temps pour le cas de poudre manioc sans écorce .....	33
Figure 24: Courbe de la concentration de glucose en fonction du temps pour le cas de poudre manioc avec écorce .....	33
Figure 25: Courbe de la concentration de Glucose en fonction du temps pour le cas Poudre de manioc sans écorce.....	35
Figure 26: Courbe de la concentration de Glucose en fonction du temps pour le cas Poudre de manioc avec écorce .....	35
Figure 27: Représentation de courbe MONOD.....	37

Figure 28: Courbe représentant la densité du mout de manioc en fonction du temps pour la poudre manioc sans écorce.....	38
Figure 29: Courbe représentant la densité du mout de manioc en fonction du temps pour la poudre manioc avec écorce .....	38
Figure 30: Courbe représentant l'évolution de gaz .....	39
Figure 31:Densimètre .....	III
Figure 32: Utilisation de Densimètre .....	III



## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1: Composants des tubercules de manioc .....	5
Tableau 2 : Gamme d'étalonnage de glucose.....	23
Tableau 3: Taux d'humidité de la matière sèche de la féculle de manioc.....	30
Tableau 4: Taux du pouvoir rotatoire P et P' du tubercule de manioc.....	30
Tableau 5: Mesure de la concentration de glucose .....	31
Tableau 6: Mesure des densités optiques de la gamme étalon .....	31
Tableau 7: Evolution de la concentration en sucres réducteurs (g/l) .....	33
Tableau 8: Résultat du rendement d'hydrolyse.....	34
Tableau 9: Evolution de la concentration en sucres réducteurs (g/l) et augmentation taux d'éthanol.....	35
Tableau 10: Résumé des effets de la concentration .....	36
Tableau 11: Vitesse spécifique de la croissance de biomasse.....	36
Tableau 12: comptage de la micro-organisme .....	37
Tableau 13: évolution de la densité du mout pendant la fermentation.....	38
Tableau 14: évolution de dégagement de gaz CO2 .....	39
Tableau 15: Degré alcoolique et rendement des distillats.....	40
Tableau 16: Densité pour déterminer le degré alcoolique.....	II

## LISTE DES ANNEXE

I. MECANISME REACTIONNEL DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE .....	I
II. PREPARATION DE SOLUTION CARREZ.....	II
III. TABLEAU DE DENSIMETRE POUR DETERMINER LE DEGRE ALCOOLIQUE .....	II
IV. UNE AUTRE METHODE POUR DETERMINER LE DEGRE ALCOOLIQUE .....	III

## LISTE DES ABREVIATIONS

HCN : Acide cyanhydrique

HCl : Acide chlorhydrique

CH<sub>3</sub>COOH : Acide acétique

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : Acide phosphorique mono potassique

Zn (CH<sub>3</sub> COO)<sub>2</sub> : Acétate de zinc

CaCO<sub>3</sub> : Carbonate de calcium

S<sub>0</sub> : Concentration de substrat a l'instant t<sub>0</sub>.

[SR] g/l : Concentration de sucre réducteur en gramme par litre

°C : Degré Celsius

°GL : Degré Gay Lussac

DO : Densité optique

dX : Différentiel de la concentration de la biomasse entre X<sub>2</sub> et X<sub>1</sub>.

DNS : Dinitro 3,5 - salicylate de sodium

H<sub>2</sub>O : Eau

ED : Eau distillé

E : Essai

K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>, : Ferrocyanure de potassium

g : Gramme

g/l : Gramme par litre

h : Heures

L : Litre

μ : Micron

ml: Millilitre

mol L<sup>-1</sup> : Mole par litre

X : Moyenne

nm: Nanomètre

% : Pourcentage

P/P : Poids par poids

P/V : Poids par volume

pH : Potentiel Hydrogène

H (%) : Pourcentage de l'humidité

MS (%) : Pourcentage de la matière sèche

P : Pouvoir rotatoire total

P' : Pouvoir rotatoire des substances solubles dans l'éthanol

PE: Productivité d'éthanol

R(%) : Rendement d'hydrolyse

$Y_{X/S}$  : Rendement de conversion du substrat en biomasse

$Y_{P/S}$  : Rendement de conversion du substrat en produit

rpm : Rotation par minute

A(%) : Teneur en amidon

tr / min : Tour par minute

R<sub>x</sub> : Vitesse de formation de la biomasse

$\mu X$  ou  $\mu_{max}$ : Vitesse spécifique de formation de biomasse ou taux de croissance.

R<sub>s</sub> : Vitesse volumique de consommation du substrat (ou disparition)

q<sub>S</sub> ou R<sub>smax</sub>: Vitesse spécifique de consommation (ou de disparition) du substrat

R<sub>p</sub>: Vitesse volumique de formation de produit

v<sub>P</sub> ou V<sub>max</sub>: Vitesse spécifique de formation de produit (éthanol)

V/V : Volume par volume

P : Quantité de produit formé à l'instant t en g l<sup>-1</sup>

## INTRODUCTION

La diminution des ressources en énergie non renouvelable et la préoccupation grandissante devant l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre entraînent la nécessité de trouver des nouvelles sources d'énergies alternative.

L'éthanol est l'un de l'énergie renouvelable, tel que le manioc permet de produire de la farine de manioc et de l'éthanol. L'alcool éthylique est un produit très recherché. Son utilisation touche différents domaines : alcool de bouche, alcool pharmaceutique, alcool combustible, alcool carburant et alcool pour les transformations industrielles. Cette production, déjà bien implantée au Brésil, a connu un développement rapide au cours des dernières années en Amérique du Nord, en Europe et en Afrique. Les Etats-Unis sont ainsi devenus, en 2006, le principal producteur d'éthanol au monde. [1]

A Madagascar, la production d'alcool est encore insuffisante. Les besoins des autres utilisateurs tels l'industrie pharmaceutiques, les laboratoires de recherche et médicaux, les confiseries, sont ainsi loin d'être satisfaits. [2]

Cependant notre île possède de nombreuses ressources naturelles pouvant être transformées en alcool étant donné que la voie la plus connue pour sa fabrication utilise les plantes riches en hydrate de carbone en fermentation obtenue à partir d'un jus sucré suivie d'une distillation.

Les sucres fermentescibles proviennent directement de plantes et les matières premières utilisées peuvent être soit des plantes saccharifères comme la canne à sucre soit de céréales comme le maïs, soit de tubercules comme le manioc.

Le manioc est une plante tropicale cultivée pour ses amidons et ses racines tubéreuses. C'est un produit de subsistance en Afrique et un produit industriel en Amérique Latine. Ce produit est la quatrième grande source d'hydrates de carbone des pays tropicaux après le riz, la canne à sucre et le maïs. Comme le manioc a une large adaptation aux différentes variétés et conditions climatiques, il pousse sur le sol relativement pauvre, demande moins d'eau et d'engrais que la canne à sucre et le maïs et a une bonne résistance aux prédateurs. En effet la comparaison des conditions de transformation de la canne à sucre et celles du manioc en alcool semble être nettement l'avantage de cette dernière dans le cas de Madagascar bien qu'il n'existe actuellement que quelque unité fonctionnelle de production d'éthanol à partir de Manioc.

A cet effet, l'objectif de notre travail est de produire de l'éthanol à partir du manioc quel que soit le teneur en cyanure qu'il renferme : les variétés douces, et amères suite à la demande d'une industrie Malagasy

Le présent mémoire se divise en trois grandes parties :

- Dans une première partie, nous présenterons une étude bibliographique.
- Dans une seconde partie, nous mettrons en évidence les matériels et méthodes
- Et enfin la troisième partie, nous mettrons sur les résultats et discussions

# **PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE I : MANIOC

### I. GENERALITE SUR LE MANIOC

#### I.1. ORIGINE

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz), plante à racines riches en amidon et originaire de l'Amérique du Sud (Celis, 1982), est devenu une culture importante sous les tropiques [1] Il a été introduit à Madagascar en 1875, cultivé sur les hauts plateaux de l'Imerina central. Le manioc est en ce jour cultivé dans toutes les régions tropicales où ses tubercules deviennent une principale source d'amidon [2]

#### I.2. DESCRIPTION BOTANIQUE

C'est un Arbuste de 1 à 4 mètres de hauteur environ, il est cultivé pour ses tubercules et ses feuilles. Les tubercules sont très riches en amidon. Les tiges sont quant à elles utilisées comme matériel de plantation. Consommé tant pour l'alimentation humaine qu'animale, le manioc est très utilisé dans l'industrie alimentaire (pâtisseries, tapioca, pâtes alimentaires, cossettes, ...) [3]. Le manioc est un végétal qui contient beaucoup d'amidon, ses tubercules sont surtout constitués de glucides. L'augmentation de la production mondiale de manioc depuis 2000 est estimée à 100 millions de tonnes par ans [4].

Il est connu botaniquement sous le nom de « *Manihot esculenta* Crantz » et sous le nom vernaculaire de « mangahazo, balahazo, kajaha » dans la vie quotidienne. Il présente plus de 300 variétés groupées dans deux variétés : douces et amères. [7]

Ce classement est lié au pourcentage d'acide cyanhydrique (HCN) présent dans le manioc, extrêmement toxique et reconnu facilement d'un gout amer.

Variétés douces : 0,010 à 0,012%

Variétés amères : 0,012 à 0,014%

**La classification du manioc est la suivante :**

**Règne :** VEGETAL

**Sous règne :** PHANEROGAMES

**Embrachement :** ANGIOSPERMES

**Classe :** DICOTYLEDONES

**Ordre :** EUPHORBIALES

**Famille :** EUPHORBIACEAE

**Genre :** *Manihot*

**Espèce :** *esculenta crantz*

### **I.3. REPARTITION GEOGRAPHIQUE**

Le manioc est cultivé dans toutes les régions de Madagascar et constitue le deuxième aliment énergétique de base de la population. Il occupe la deuxième place aussi bien en superficie cultivée qu'en volume de production annuelle après le riz. [5]

Cependant cette plante (de même que les produits transformés qui sont issus est connue sous des noms très divers, selon les pays, par exemple :

- En Amérique de langue espagnole : manioca, rumu ouyuca
- Au Brésil : manioca ou aipun ;
- En Afrique francophone et Madagascar : manioc
- En Inde et Malaisie : tapioca
- En Afrique anglophone (Thaïlande, Sri Lanka) : cassava ou cassado

Le manioc est appelé « mangahazo» dans l’Imerina, «balahazo» chez les Bara et Antandroy, «kazaha» chez les Betsileo, « mahogo» chez les Sakalava.

### **I.4. MILIEU NATUREL DE LA PLANTE**

Le manioc est une plante qui ne pousse que dans les régions tropicales et tempérées chaudes. L'optimum de rendement peut être obtenu avec 1000-2000 mm de pluie, une température moyenne de 23°C-25°C. Au-dessous de 10°C et au-dessus de 40°C la végétation est réduite. La culture du manioc s'étend entre 30° Nord et 30° Sud et peut réussir jusqu'à 2000 m d'altitude.

Sur le plan édaphique, le manioc pousse sur des types de sols extrêmement variés (alluviaux, ferralitiques, tourbeux) à condition que les textures et les structures permettent la circulation de l'air et de l'eau ainsi que le développement des tubercules (sols légers, meubles, profonds et de pente faible). Les pH des sols doivent être compris entre 4 et 7,5.

Ces conditions étant remplies à Madagascar, la culture du manioc est pratiquée dans toutes les régions et constitue le deuxième aliment énergétique de base de la population. [6]

### **I.5. COMPOSITION BIOCHIMIQUE DU MANIOC**

La maturité, la variété et les modes de cultures influencent la composition chimique du manioc. Les tubercules de manioc renferment de l'amidon à une teneur élevée et une faible teneur en protéine et en lipide ainsi qu'en éléments minéraux. Par ailleurs une concentration d'acide cyanhydrique considérable est présente dans le tubercule. [8]

Le tableau II suivant donne une estimation sur les composants des tubercules de manioc.

Tableau 1: Composants des tubercules de manioc

Composant	Tubercules (matière fraîche en %)	Matière sèche (en %)
Eau	66,2	0,009
Amidon	2705	81,5
Saccharose	1	3
Glucose	0,4	1,1
Fructose	0,3	0,8
Protéines	0,4	1,3
Matières grasses	0,2	0,6
Eléments minéraux	0,8	2,5

Source : DEA RANDRIAMANGA ANDONIRINA Cathérine Jane Rica Ingénieur en Génie Chimique

## I.6. UTILISATION DU MANIOC

Les tubercules de manioc sont très utilisés comme matières premières dans le domaine industriel pour la fabrication de divers produits : adhésif, textile, papier et du bioéthanol.

La figure ci-dessous montre les deux variétés de manioc



Figure 1: Variété douce  
Racines fraîches de manioc



Figure 2: Variété amère  
Racines fraîches de manioc

## II. L'AMIDON

L'amidon est un hydrate de carbone se présentant sous forme d'une poudre blanche, insoluble dans l'eau froide ou tiède mais fermentescible. L'amidon est un polysaccharide constituant la principale forme sous laquelle les plantes accumulent des réserves énergétiques. Il représente une fraction pondérale importante dans de nombreuses matières agricoles, telles que les céréales (représentent 30 à 80% de la matière sèche) et les tubercules. L'amidon est un mélange de deux polysaccharides: l'amylose molécule linéaire (20%) et l'amylopectine molécule ramifiée (80%). Il se présente sous la formule générale :  $(C_6H_{10}O_5)_n$



Figure 3: Amidon de manioc

### II.1. DESCRIPTION

La structure des grains d'amidon est formée de couches concentriques alternées claires et sombres entourant un centre plus foncé appelé « hile » qui est le centre initial de croissance du grain ANGELLIER (2005). Les granules d'amidon ont la forme d'une croix noire dite « croix de Malte », d'où leur organisation semi-cristalline ADRIAN *et al*, (1995). Les zones amorphes contiennent un ensemble cristallin composé d'amylopectine, ces ensembles dispersés dans l'amylose constituent avec les complexes amylose-lipides les parties amorphes du granule. L'analyse par diffraction au rayon X montre que l'amidon est un polymère semi-cristallin V

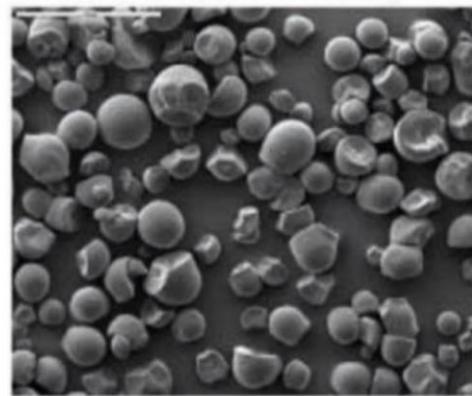


Figure 4: Formes et tailles des granules d'amidon de manioc, d'après ATKIN (1999).

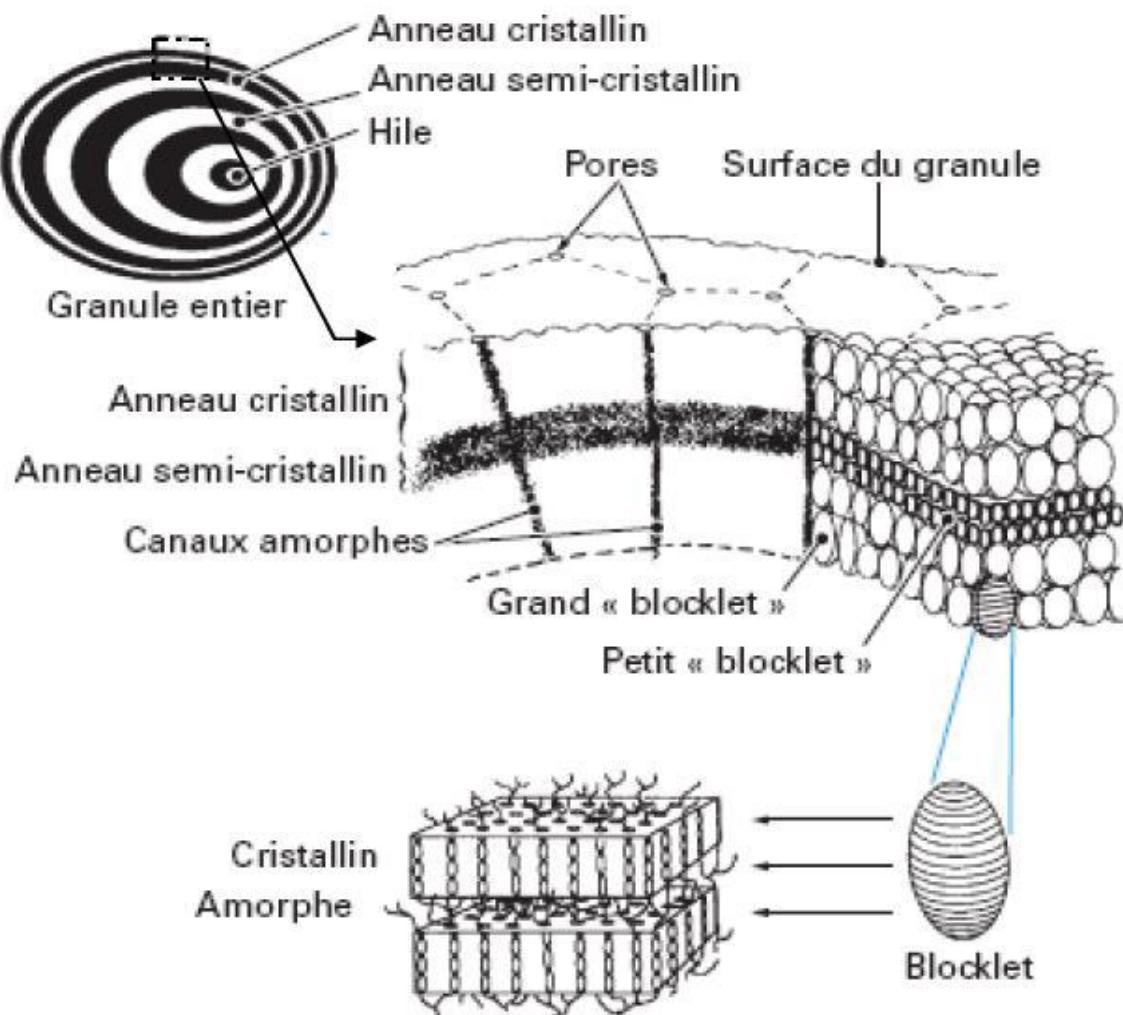


Figure 5: Structure et ultra structure d'un grain d'amidon classique d'après LEVEQUE et al.

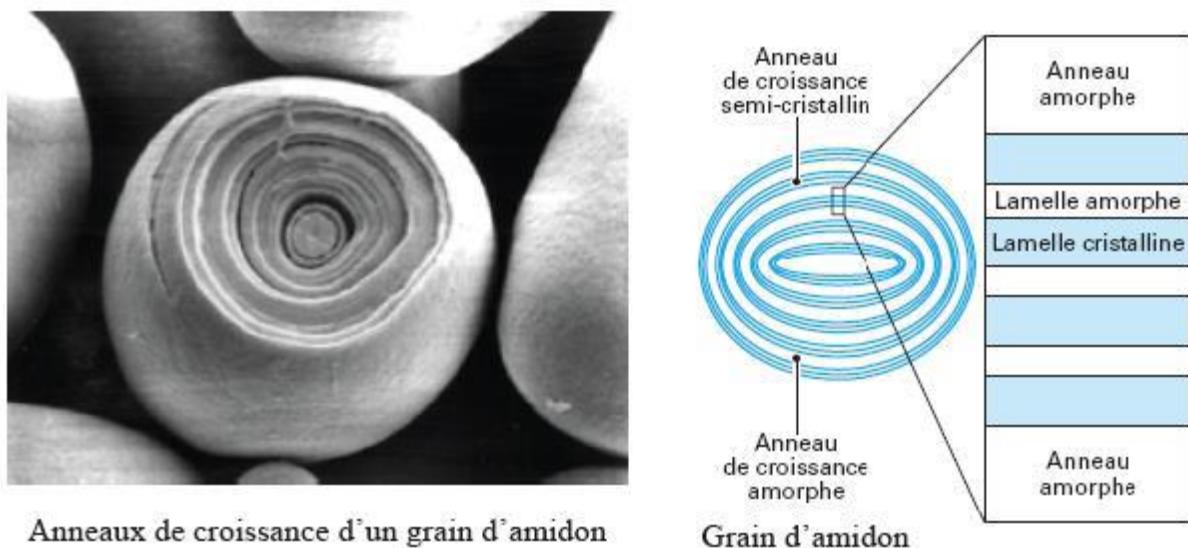


Figure 6: Photographie et représentation schématique d'un grain d'amidon d'après JENKINS ; DONALD (1998).

## II.2. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'AMIDON

### II.2.1. Amylose

L'amylose est un polymère linéaire de structure hélicoïdale formé de molécules d'anhydro-D glucose liées par des liaisons de type  $\alpha$ - 1,4. Elle représente 20 à 30 % des amidons classiques. Son degré de polymérisation est compris entre 500 et 1000 unités glucose. [9][10]

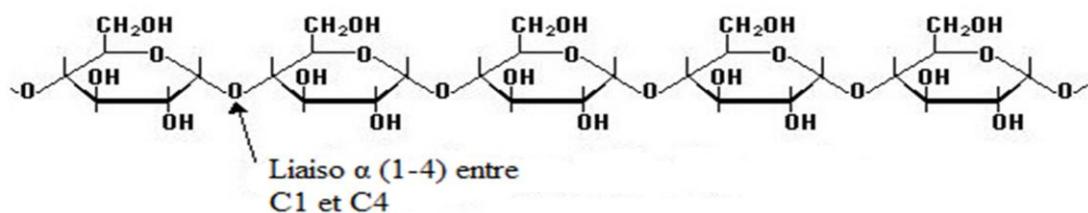


Figure 7: Structure moléculaire de l'amylose, source Parker, 2001

### II.2.2. Amylopectine

L'amylopectine est le principal constituant glucidique de l'amidon. Il s'agit d'une molécule ramifiée dans laquelle les unités D - glucoses sont principalement reliées par des liaisons  $\alpha$  (1-4) et de quelques liaisons  $\alpha$  (1-6) qui représente environ 5 à 6% du nombre total de liaisons. [9]

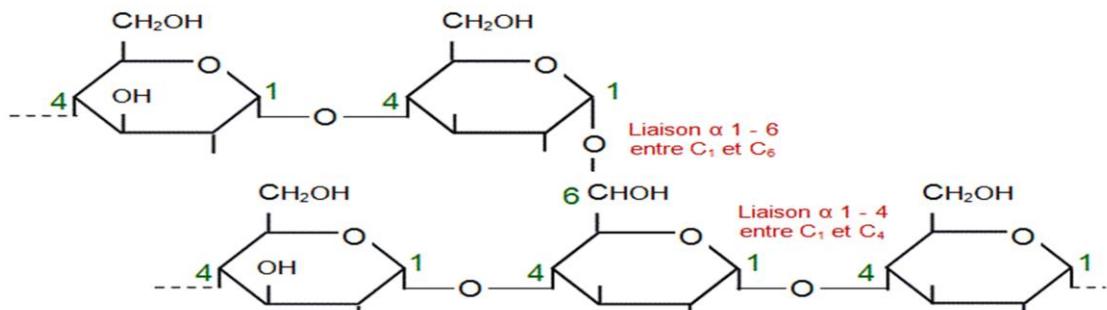


Figure 8: Représentation chimique de l'amylopectine : source Shinnosuke Onuki

## II.3. CARACTERISTIQUES DE L'AMIDON DES TUBERCULES DE MANIOC

Le manioc est caractérisé par sa haute teneur en amidon et sa teneur élevée en humidité jusqu'à 16%, en fonction de la manière dont il est traité et stocké. L'amidon contient de petites quantités de protéines, de minéraux, de fibres et de graisses alimentaires. L'amidon de manioc se transforme en un état gélatineux relativement rapide lors de la cuisson à l'eau, et reste relativement fluide après refroidissement. Cette caractéristique le rend attractif pour une utilisation dans le secteur industriel. L'amidon de manioc est connu pour sa viscosité, ceci le rend approprié pour des applications industrielles. [7]

## CHAPITRE II : ETAPE DE PRODUCTION D'ETHANOL A PARTIR DU MANIOC

Le processus de fabrication d'éthanol nécessite plusieurs étapes qui sont schématisées par le diagramme suivant :

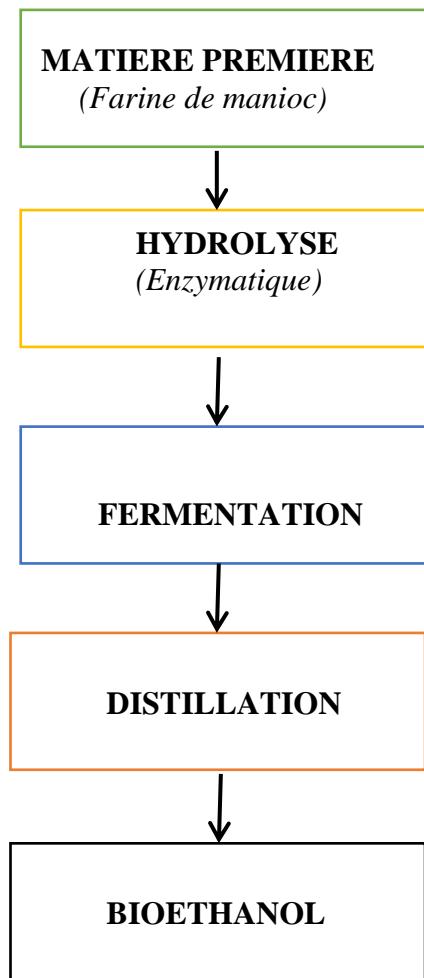


Figure 9: Processus de production d'éthanol

### I. HYDROLYSE

L'hydrolyse est une réaction chimique au cours de laquelle une molécule d'eau est utilisée pour permettre la rupture d'une liaison covalente en se dissociant en  $\text{OH}^-$  et  $\text{H}^+$ . L'hydrolyse de l'amidon conduit par exemple à la formation de sirop de glucose.

Dans le cas de l'hydrolyse de l'amidon, le but est d'obtenir des monomères, principalement des glucoses.

Il existe deux grands types d'hydrolyse :

- hydrolyse acide
- hydrolyse enzymatique.

L'hydrolyse de l'amidon peut être améliorée par l'ensemble de modifications physiques, chimiques et/ou enzymatiques, afin de répondre à des besoins technologiques et nutritionnels spécifiques. La gélification des granules d'amidon par la température est indispensable pour permettre l'action des agents d'hydrolyse.

Ce traitement hydrothérapique provoque le gonflement des granules qui se poursuit jusqu'à l'éclatement puis à la dispersion complète de molécules.

L'hydrolyse peut s'effectuer chimiquement (en utilisant un acide ou une base dilué ou concentré) ou biochimiquement par des enzymes. Actuellement, l'hydrolyse enzymatique est préférée pour éviter la corrosion et les coûts opératoires et environnementaux des procédés chimiques. L'efficacité de l'hydrolyse enzymatique dépend non seulement du prétraitement utilisé, mais également de l'activité des enzymes sélectionnées. [16]

### **I.1. HYDROLYSE ENZYMATIQUE**

L'hydrolyse enzymatique s'est imposée pour la production d'éthanol à partir d'amidon. Elle est cependant encore loin d'être efficace pour l'éthanol de seconde génération. Elle est utilisée jusqu'à l'échelle pilote pour l'hydrolyse de la cellulose

### **I.2. HYDROLYSE ACIDE**

Un acide minéral peut être ajouté pour augmenter la célérité de l'autohydrolyse. Elle peut être effectuée à l'aide d'un acide concentré à faible température ou à l'acide dilué à température élevée. L'hydrolyse à l'acide concentré (30 à 70% d'acide) s'est montrée efficace, mais son utilisation à l'échelle industrielle est compliquée. L'utilisation d'acide dilué est donc prédominante. La réaction d'hydrolyse nécessite un prétraitement avant d'entamer l'hydrolyse proprement dite. [17]

- ***Prétraitement***

Le prétraitement de la biomasse lignocellulosique est le deuxième poste de coût dans le procédé de conversion par voie biochimique. Il a pour but de déstructurer la rigidité macroscopique de la biomasse, de réduire la barrière physique au transfert de masse des agents chimiques ou enzymatiques et de lever les limitations dues à la structure physicochimique et à la nature des composés de la biomasse. Pour cela, il doit notamment permettre :

- d'améliorer l'accessibilité à la cellulose en rompant la structure de l'hémicellulose et de la lignine;
- d'augmenter la surface accessible et la porosité en diminuant la taille des particules ;
- de diminuer le degré de polymérisation, plus particulièrement ;
- de réduire le taux de cristallinité de l'amidon ;
- d'augmenter la concentration des sucres dans la solution. [19]

- **Invertase**

L'**invertase** est une glycoside hydrolase qui catalyse l'hydrolyse du saccharose alimentaire (sucre) en fructose et en glucose ; ce mélange est appelé sucre inverti, d'où le nom de l'enzyme. Les invertases clivent la liaison O–C (fructose) tandis que les sucrases clivent la liaison O–C (glucose). [24]

### I.3. LES SUCRES REDUCTEURS

Un ose est réducteur si sa forme à chaîne ouverte comporte une fonction aldéhyde ou un groupe hémiacétal libre. Les aldoses, monosaccharides contenant une fonction aldéhyde qui peut être oxydée. [22]

➤ **Dextrines**

Les dextrines sont des glucides solubles et amorphes, de formule brute  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Ce sont des produits incolores en solution et dextrogyres. Elles sont obtenues par dessiccation, hydrolyse acide ou enzymatique de l'amidon.

➤ **Le maltose**

Le maltose ou  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1,4-D-glucopyranose, sa formule brute est  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Le maltose appelé aussi sucre de malt, est un produit de la dégradation enzymatique de l'amidon. Le maltose est un sucre réducteur. Son pouvoir sucrant est faible (40 % de celui du saccharose). [23]

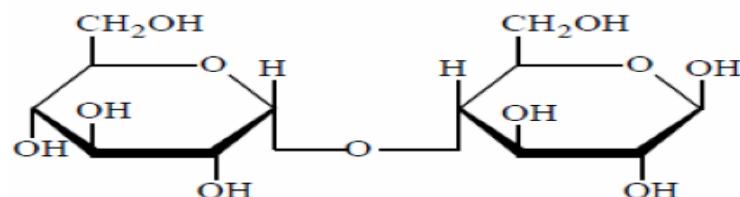


Figure 10: Représentation chimique du maltose

➤ **Le D-glucose**

Le D-glucose est le sucre physiologique par excellence de formule brute  $C_6H_{12}O_6$ , il est sous forme polycondensée dans l'amidon. Le D-glucose est obtenu par hydrolyse enzymatique du maltose. Chimiquement, le D-glucose possède un pouvoir réducteur élevé. Le pouvoir sucrant du D-glucose ne représente que 70 % de celui du saccharose. [23]

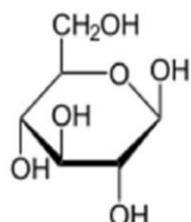


Figure 11: Projections du D-glucose

## II. FERMENTATION

La fermentation est une modification chimique de substance organique, sous l'action d'enzyme. Cette définition générale inclut en pratique toutes les réactions chimiques d'importance physiologique. Les scientifiques réservent souvent ce mot à l'action d'enzymes spécifiques appelées ferment, produits par des micro-organismes tels que les moisissures, les bactéries et les levures.

On distingue trois types de procédés de fermentation [30]:

- le mode *batch* ou fermentation discontinue ;
- le mode *feed-batch* ou fermentation discontinue alimentée ;
- le mode de culture continue.

- ***Le mode discontinu (ou Batch)***

La cuve est remplie par le milieu de culture stérilisé, puis l'inoculum. La fermentation se déroule ensuite sans addition supplémentaire de milieu. Le volume reste constant et la productivité est relativement faible. En fin de fermentation, le fermenteur est vidé et son contenu est remplacé.

- ***Le mode semi-continu (ou Fed-batch)***

Le substrat est apporté au fur et à mesure de sa consommation par les microorganismes. Ces systèmes employés dans la production de la pénicilline. En effet, celle-ci est soumise à une répression catabolique lors de la présence d'une forte concentration de substrat carboné (le glucose). On procède à l'ajout du substrat au fur et à mesure de sa consommation afin d'éviter l'accumulation de substrat dans la réaction.

- ***Le mode continu (ou chemostat)***

Les éléments nutritifs sont introduits de manière continue et le milieu de culture est soutiré continuellement, de telle façon que le volume du milieu de culture reste constant. Les débits d'alimentation et de soutirage ne sont pas donc nuls. La solution de nutriment est apportée en continu au réacteur mais une quantité équivalente de solution fermentée est prélevée. Le volume est donc constant.

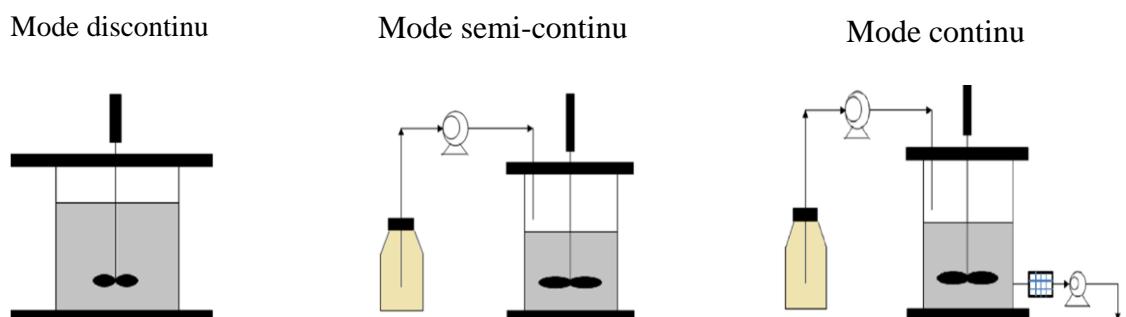


Figure 12: Les trois types de mode de fermentation

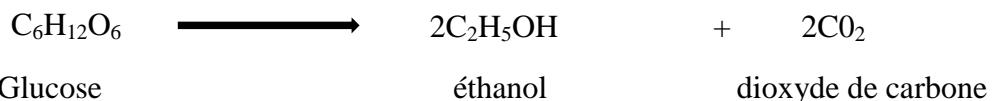
## II.1. PRINCIPE DE LA FERMENTATION

La fermentation est un phénomène naturel. Dans notre cas, la fermentation alcoolique est une réaction qui se fait par l'intermédiaire de levures, et qui va transformer les sucres fermentescibles en alcool et en gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ). L'alcool que l'on veut obtenir est l'éthanol. La fermentation produit d'autres alcools potentiellement dangereux comme le méthanol (hautement toxique) que nous écarterons lors de la distillation.

La fermentation alcoolique se fait à l'abri du dioxygène. Il faudra donc éviter que nos matières soient en contact avec l'air, ce qui pourrait entraîner d'autres réactions qui nuiraient au rendement et au pureté du produit recherché.

## II.2. FERMENTATION ALCOOLIQUE

La fermentation alcoolique est la conversion du sucre en éthanol et en anhydride carbonique par l'action des levures en milieu anaérobiose, selon le bilan chimique suivant



L'un des microorganismes le plus utilisé est la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle effectue la fermentation alcoolique dont les produits terminaux sont l'alcool et le gaz carbonique.

### II.3. LA LEVURE *SACCHAROMYCES*

### II.3.1. Classification de la levure :

## Règne : VEGETAL

## **Sous règne : THALLOPHYTES**

## Embranchement : EUMYCETES

## Classe : ASCOMYCETES

## Ordre : ENDOMYCETALES

## Famille : SACCHAROMYCETACEAE

### Genre : *Saccharomyces*

### Espèce : *cerevisiae*

### II.3.2. Propriété générale

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un champignon unicellulaire (microscopique) présentant une forme elliptique, légèrement allongée dont la taille peut varier de 8 à 9 $\mu$ . Les *Saccharomyces cerevisiae* sont dits des levures hautes (ale), la fermentation se déroule dans le haut du fermenteur. Elles sont utilisées pour la production d'éthanol relativement fort en goût et en taux d'alcool. Les températures de fermentation sont comprises entre 15°C et 25°C et ces levures sont utilisées pour produire des bières plus aromatiques que celles en fermentation basse. [30]

## II.4. PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA FERMENTATION

### I.4.1. La concentration en substrat

L'activité fermentaire dépend de la teneur en substrat dans le milieu de culture, et ce substrat sert à la fois aux levures de sources de carbone et de source énergétique nécessaire à leur développement. A une concentration supérieure à 5g/l, les enzymes respiratoires sont inhibées, le métabolisme devient fermentaire.

### II.4.2. La température

La levure *saccharomyces cerevisiae* est une espèce mésophile qui peut se développer dans un intervalle de température de 0 à 48°C. La température optimale de croissance varie d'une variété à une autre. En général, elle se situe au voisinage de 30°C.

### II.4.3. Le pH

Pour la fermentation alcoolique, les levures préfèrent le milieu relativement acide 3 à 6 pour éviter la multiplication des contaminants.

### II.4.4. L'agitation

L'agitation assure l'homogénéisation entre les phases liquide, solide et gazeuse du milieu réactionnel.

## II.5. LES DIFFERENTS PRODUITS FORMES PENDANT LA FERMENTATION

En tant qu'une réaction biochimique, l'éthanol et le gaz carbonique ne sont pas les seuls produits formés lors de la fermentation alcoolique. En effet, elle donne lieu à la formation des produits secondaires. Certains proviennent de la réaction elle-même, d'autre du métabolisme azote des levures et enfin des réactions enzymatiques parallèles.

#### ➤ L'éthanol

L'éthanol est le produit principal formé au cours de la fermentation alcoolique bien que d'autres substances puissent être produites. Il est reconnu toxique vis à avis des cellules. A partir d'une concentration 12,50°GL, c'est-à-dire 100g/l d'alcool, les levures meurent.

#### ➤ Le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>)

En fermentation, des pressions très élevées en gaz carbonique inhibent la croissance des levures. Ainsi, des pressions en gaz carbonique, déclenche cette inhibition.

#### ➤ Glycérol

La fermentation du glucose par la levure s'accompagne toujours de la formation de petite quantité de glycérol.

#### ➤ Acide succinique (COOHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-COOH)

Il peut provenir de l'acide pyruvique par oxydoréduction

### ➤ **Acide acétique**

Sa formation est due à la décarboxylation de l'acide pyruvique mais, il peut également provenir de l'oxydation de l'éthanol. Les conditions suivantes favorisent sa biosynthèse : la température élevée et les milieux fermentaires non distillés, immédiatement après la fin de la fermentation alcoolique.

### ➤ **Alcools supérieurs**

Ils se trouvent dans toutes les fermentations pures, surtout l'alcool amylique. D'une façon générale, ces alcools supérieurs se forment à partir des acides issus de la désaimantions des acides contenus dans le milieu de fermentation suivant la réaction d'EHRLICH.

### ➤ **Esters**

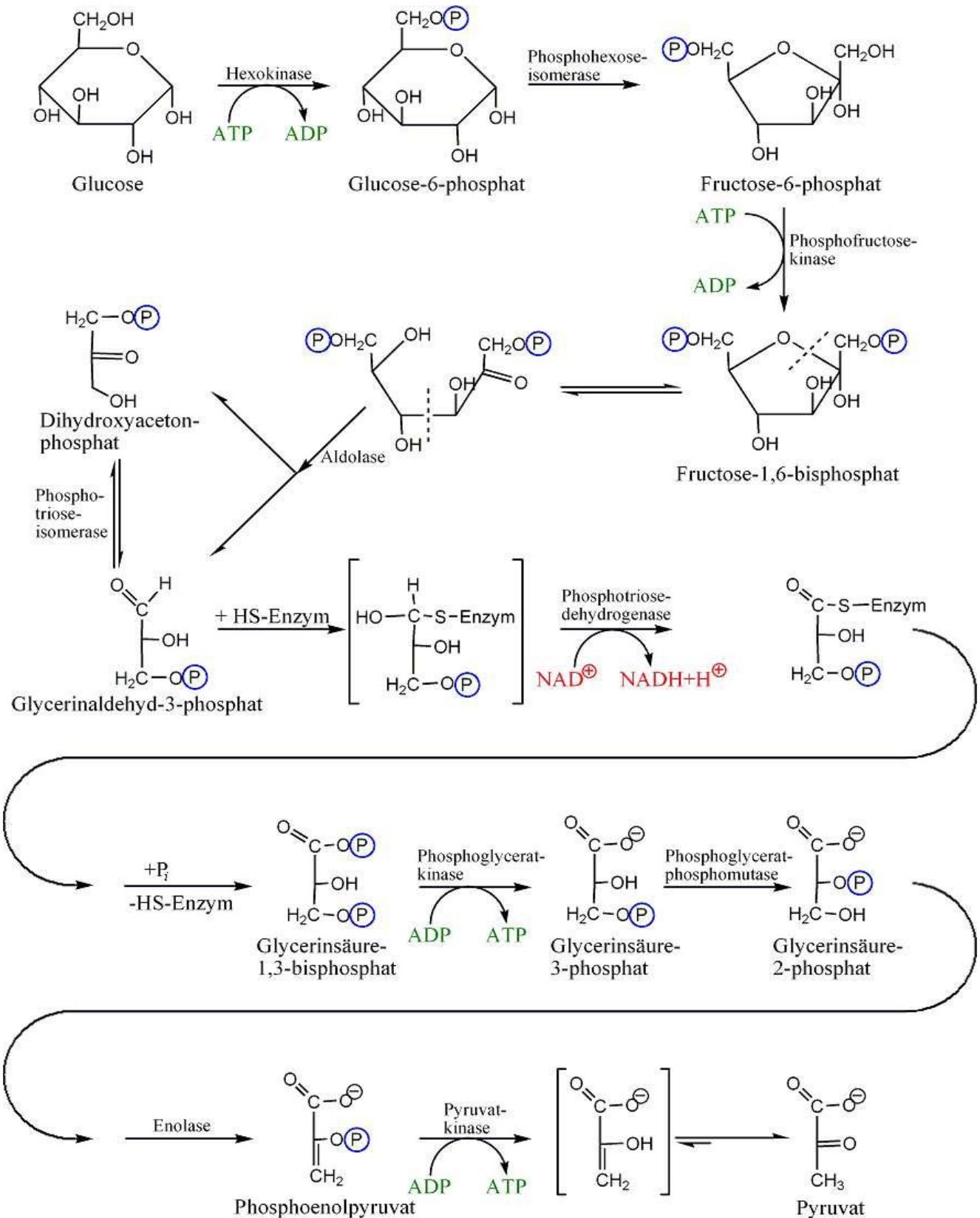
Ils résultent de l'action d'un acide sur l'alcool. L'acétate d'éthyle provient ainsi de l'action de l'acide acétique sur l'alcool éthylique.

### ➤ **Méthanol**

Sa formation est engendrée par la richesse en matières pectiques du milieu de fermentation.

## II.6. MECANISME REACTIONNEL DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Le mécanisme réactionnel de la fermentation alcoolique se fait en deux étapes qui sont la glycolyse suivie de la décarboxylation de l'acide pyruvique.



### III. DISTILLATION

La distillation est un procédé de séparation du mélange de substances liquides dont les températures d'ébullition sont différentes. Elle permet de séparer les constituants d'un mélange homogène. Sous l'effet de la chaleur ou d'une faible pression (loi des gaz parfaits), les substances se vaporisent successivement, et la vapeur obtenue est liquéfiée pour donner le distillat. [25]

### IV. LE BIOETHANOL

Le bioéthanol est un alcool éthylique obtenu grâce à des transformations de biomasse : céréales et tubercules. C'est un liquide incolore, volatil, inflammable et miscible à l'eau [26]. Le bioéthanol est un sous-produit du métabolisme des levures, et est donc présent dans l'habitat de ces organismes.

#### IV.1. CARACTERISTIQUE D'ETHANOL

L'éthanol est un alcool primaire à deux carbones de formule brute  $C_2H_6O$  et de formule semi-développée  $CH_3CH_2OH$  ou  $CH_3-CH_2-OH$ , indiquant que le carbone du groupe méthyle ( $CH_3-$ ) est attaché au groupement méthylène ( $-CH_2-$ ) qui est attaché au groupement hydroxyle ( $-OH$ ). C'est un isomère de constitution de l'éther méthylique. L'éthanol est usuellement désigné par l'abréviation « Et-OH », le groupement éthyle ( $C_2H_5-$ ) étant communément abrégé « Et » en chimie organique. [27]

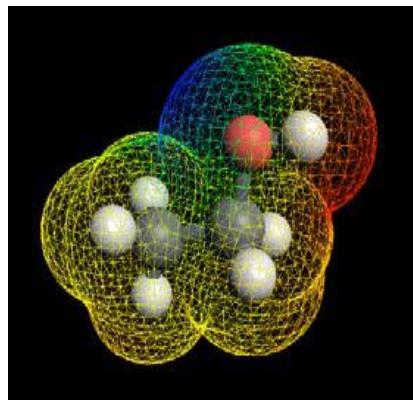


Figure 13: Molécule d'alcool éthylique [Source : Tiré de Leiden Observatory (2007)]

## **PARTIE II : MATERIELS ET METHODES**

## **I. PREPARATION DE LA FARINE DE MANIOC**

La préparation des échantillons de farine utilisée lors des expériences en laboratoire et en milieu artisanal est identique, en effet, plusieurs étapes sont affectées aux tubercules de manioc pour être transformé en farine.

La matière première utilisée pour la préparation de la farine de manioc est le Tubercule de manioc sec.

Le diagramme suivant montre les étapes à suivre pour l'obtention de la farine de manioc.

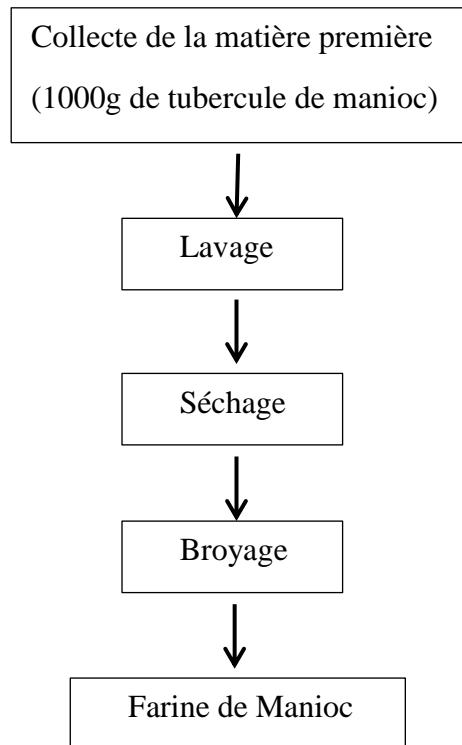


Figure 14: Diagramme de fabrication de la farine de manioc

## **II. DETERMINATION DU TAUX D'HUMIDITE DE LA FARINE DE MANIOC**

La teneur en eau est la quantité d'eau perdue par la substance lorsqu'on l'amène en équilibre vrai avec une pression d'eau libre dont les conditions telles que, les réactions perturbatrices éventuelles soient évitées [29]

Les matériels utilisés pour déterminer le taux d'humidité de la farine de manioc sont :

- Echantillon
- Etuve
- Boite à humidité
- Balance de précision

## II.1 PROCESSUS DE DETERMINATION DE TAUX D'HUMIDITE

La boite contenant la poudre doit être mise dans l'étuve à une température de 103 +/-2°C pendant 1h. Et doit être retirée de l'étuve, laissée se refroidir dans le dessiccateur et ensuite tare avec précision. 3 a 5g d'échantillon ont été introduits dans la boite et le tout est mis dans l'étuve a 103 +/- 2°C pendant 6h. A la sortie de l'étuve, la boite est immédiatement placée dans le dessiccateur pour être refroidie à température ambiante. La boite contenant l'échantillon est ensuite pesée.

## II.2. EXPRESSION DU RESULTAT

Le taux d'humidité est donné par la formule suivante.

$$H(\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100$$

m1 : masse de la boite tarée après 1 h d'étuvage à 103 + 2°C.

m2 : masse de la boite tarée avec l'échantillon avant l'étuvage.

m3 : masse de la boite tarée avec l'échantillon après l'étuvage 103 + 2°C.

H (%) : pourcentage de l'humidité

MS (%) : pourcentage de la matière sèche

$$MS = 100 - H(\%)$$

## III. DETERMINATION DE LA TENEUR EN AMIDON DE LA FARINE

Le taux d'amidon est déterminé par la méthode de polarimétrie d'EWERS.

L'amidon est dispersé par traitement à chaud de l'échantillon avec de l'acide chlorhydrique dilué. Après purification et filtration, le pouvoir rotatoire de la solution est mesuré à l'aide d'un polarimètre. Le même traitement est effectué sur l'extrait éthanolique à 40% afin d'éliminer les glucides solubles susceptibles d'interférer en polarimétrie. La teneur en amidon est obtenue par la différence entre les deux mesures polarimétriques qui sont multipliées par un facteur spécifique de l'échantillon. La détermination s'effectue par la mesure du pouvoir rotatoire total P de la farine et celui P' des substances solubles dans l'éthanol de l'échantillon.

Pendant la détermination de teneur en amidon, les matériaux utilisés sont les suivants :

- Farine de Manioc
- Ballon jaugé de 250 ml avec réfrigérant ascendant
- Balance de précision
- Fioles de 100 ml
- Bain-marie

### **III.1. DETERMINATION DU POUVOIR ROTATOIRE TOTAL P**

Deux virgule cinq gramme de farine ont été introduits dans un ballon jaugé de 100ml, puis ajoutés deux volumes de 25ml d'acide chlorhydrique 1,128%. Le ballon a été plongé dans un bain bouillant pendant 15 minutes. Toutes les 3 minutes, des agitations énergiques ont été effectuées pour éviter la formation d'agglomérats. Ensuite, retiré au bain, le refroidissement a été accéléré par l'ajout de 30ml d'eau froide dans la préparation, puis le volume final a été ramené à 100ml avec de l'eau distillée. Après filtration, le pouvoir rotatoire P a été mesuré au polarimètre.

### **III.2. DETERMINATION DU POUVOIR ROTATOIRE P' DES SUBSTANCES SOLUBLES DANS L'ETHANOL**

Deux virgule cinq gramme de farine ont été introduits dans un ballon jaugé de 100ml et ajoutés de 80ml d'éthanol 40%. Ensuite, le ballon a été laissé à la température ambiante pendant 1heure au cours de laquelle six agitations énergiques ont été effectuées afin de bien mélanger le contenu. Le volume de la préparation a été ensuite ramené à 100ml avec de l'éthanol 40% puis, filtré après homogénéisation. 50 ml du filtrat ont été versés dans un erlenmeyer de 250 ml puis, ajoutés 2,1ml d'acide chlorhydrique 25%. L'ensemble a été placé dans un bain-marie bouillant pendant 15 minutes. Retiré du bain, le contenu a été transvasé dans un ballon jaugé de 100ml. La défécation à partir des solutions CARREZ I et CARREZ II a été effectuée lorsque la température de la préparation est de 20°C. Ensuite, le volume a été complété avec de l'eau distillée et une nouvelle filtration a été effectuée, ainsi le pouvoir rotatoire du filtrat a été mesuré au polarimètre. Le taux d' amidon est calculé à partir de la formule suivante :

$$A(\%) = \frac{(P - P')}{[\alpha] * D * B * d} * 100$$

Ou :

A(%) : Teneur en amidon

P : pouvoir rotatoire total

P' : pouvoir rotatoire des substances solubles dans l'éthanol

$[\alpha]^{20^\circ} D = 184$  : Pouvoir rotatoire spécifique de l'amidon pur à 20°C pour le manioc

B : Poids sec de la prise d'essai et d : Longueur du tube de polarimètre en dm (100mm = 1dm)

### **IV. HYDROLYSE ENZYMATIQUE**

Cette méthode consiste à hydrolyser la féculle de manioc pour transformer l'amidon en maltose, en dextrine et en glucose sous l'action de l'enzyme hydrolase d'invertase

#### IV.1. PRETRAITEMENT DE L'AMIDON DE MANIOC

Cent gramme d'amidon ont été dissous dans 1litre d'eau ou de 0,016 mol L-1 sodium tampon acétate, pH 4,5. Cette solution d'amidon a été chauffée à 60 °C sous agitation mécanique à 390 tr / min en 60 min.

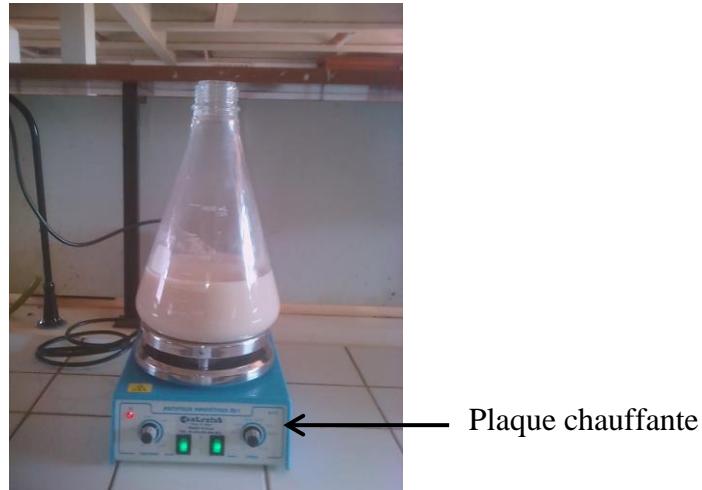


Figure 15: Prétraitement de l'amidon de manioc

#### IV.2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'AMIDON DE MANIOC PROPREMENT DIT

La féculle de manioc bien gélifiée pendant le prétraitement est mélangé directement avec 64ml d'invertase en ajustant le pH à 4,5.

L'ensemble est incubé à 50°C et à 250rpm sur une plaque chauffante agité, 5ml du milieu réactionnel, au temps  $t = 0$  et puis toutes les 24 heures, sont prélevés pour faire le dosage des sucres réducteurs formés durant l'incubation.



Figure 16: Hydrolyse enzymatique

### **IV.3. DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR LA METHODE D.N.S**

Les sucres réducteurs sont dosés par le dinitro 3,5 - salicylate de sodium (DNS) selon la méthode calorimétrique

Les sucres réducteurs en présence du DNS et à chaud sont colorés en rouge et l'intensité de cette coloration est proportionnelle à la concentration en sucres dans la solution et est appréciée par la mesure de la densité optique à 540nm au spectrophotomètre.

La concentration en sucre réducteurs formés est déterminée en se référant au courbe étalon de glucose de concentration de 2 g/l.

#### **IV.3.1. Défécation**

La défécation est un processus effectué avant le dosage de sucres réducteurs pour éliminer les impuretés et les protéines du milieu. Pour cela, 1g de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) a été mélange avec 5 ml l'hydrolysat prélevé dans une fiole jaugée de 100ml. Après l'agitation, le mélange est laissé au repos pendant 15 minutes. Ensuite, 1ml de ferrocyanure de potassium ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) à 15% et d'acétate de plomb ( $\text{Pb} [\text{CH}_3\text{COO}]_2$ ) à 30 % sont ajoutés dans la mélange.

Le volume final de la solution est ajusté à 100ml avec de l'eau distillée et l'ensemble a été laissé en attente pendant 15 minutes .Après ce repos, la solution a été filtrée.

#### **IV.3.2. Préparation des solutions de la gamme étalon de glucose**

Les solutions suivantes sont préparées : 1000ml de glucose à 2 g/l ; 500 ml de DNS à 1g/l, 159g de tartrate double de sodium et de Potassium, 8g de soude et de l'eau distillée.

La dilution en cascade a été effectué à partir de la solution mère de glucose, allant de 0 à 1 g/l (différence de quantité de 0,1g/l) dans 07 tubes à essai, Dans le premier tube à essai 1ml d'eau distillée et 1ml de D.N.S ont été versés (le premier tube est considéré comme témoin), dans le deuxième tube : 0,1ml de glucose de concentration 2 g/l, 0,9 ml d'eau distillée et 1 ml de D.N.S, dans le troisième tube : 0,2 ml de glucose 2 g/l ; 0,8 ml d'eau distillée et 1ml de D.N.S, dans le quatrième tube : 0,3 ml de glucose 2 g/l ; 0,7 ml d'eau distillée et 1ml de D.N.S, et dans le cinquième tube : 0,4 ml de glucose 2 g/l, 0,6 ml d'eau distillée et 1 ml de D.N.S. dans le sixième tube : 0,5 ml de glucose 2 g/l ; 0,5 ml d'eau distillée et 1ml de D.N.S, dans le septième tube : 0,6ml de glucose 2 g/l ; 0,4ml d'eau distillée et 1ml de D.N.S.

Les tubes sont mis dans un bain-marie *FISHER BLOCK SCIENTIFIC* à une température de 100 °C pendant 5 minutes, après cela les tubes sont placés dans un bain glacé. Après refroidissement, ajoutés dans chaque tube 10 ml d'eau distillée. La concentration des sucres réducteurs des gammes étalons est lue sur un spectrophotomètre à 540 nm. Le tableau ci-dessous indique les solutions de gamme étalon de glucose.

Tableau 2 : Gamme d'étalonnage de glucose

N° tube	1	2	3	4	5	6	7
<b>Solution mère 2g/l (ml)</b>	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
<b>ED (ml)</b>	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4
<b>DNS (ml)</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>ED (ml)</b>	10	10	10	10	10	10	10
<b>[SR] g/l</b>	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
<b>DO a 540nm</b>	0	0,152	0,296	0,460	0,596	0,748	0,892

Les différentes concentrations dans chaque tube sont données par la relation suivante :

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$C_i$  : Concentration initiale de la solution mère de glucose 2g/l

$V_i$  : Volume initial de la solution mère utilisée

$C_f$  : Concentration finale en glucose dans chaque tube que nous avons calculée

$V_f$  : Volume final dans chaque tube

#### IV.3.3. Dosage des sucres réducteurs proprement dit

Dans un tube à essai, 0,1ml de filtrat déféqué, plus 0,9ml d'eau distillée ont été mis dans un tube à essai. Puis, ajouté 1ml de DNS. L'ensemble a été ensuite incubé pendant 5 minutes à 100°C dans un bain-marie.

Après refroidissement, 10ml d'eau distillée ont été ajoutés à la préparation. La densité optique a été mesurée au spectrophotomètre à 540 nm.

**Remarque** : Ce dosage des sucres réducteurs a été effectué pour chaque prélèvement réalisé toutes les 24 heures, l'expérience a été arrêtée lorsqu'aucune augmentation des valeurs de densité optique n'était plus constatée (valeurs constantes).

#### IV.4. RENDEMENT D'HYDROLYSE

Le rendement d'hydrolyse enzymatique de la farine manioc a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{[SR]t - [SR]to}{[Amidon]to} * 100$$

Ou

$[SR]t$  : Concentration en sucres réducteurs au temps t

$[SR]to$  : concentration en sucres réducteurs au temps t= 0

$[Amidon]to$  : teneur en amidon à l'instant t = 0

## V. FERMENTATION ALCOOLIQUE

La fermentation transforme les sucres présents dans l'hydrolysat en alcool. C'est une décomposition d'une substance sous l'influence de micro-organismes. Dans notre cas, la levure convertit le sucre en alcool et en dioxyde de carbone et se nourrissant d'une série de sucres complexes existant dans les substances à fermenter.

Les outils utilisés pour faire la fermentation sont les suivants :

### ➤ Bioréaction

L'incubateur utilisé pour la fermentation est de type HAAKE K15. C'est un bain thermostaté, agité, permettant d'effectuer plusieurs cultures en même temps dans les erlenmeyers, et dans les mêmes conditions. Les sirops de glucose concentrés obtenus lors de l'hydrolyse du manioc sert de substrat pour les micro-organismes, mais ils sont dilués selon les concentrations voulues.

### ➤ Souche de micro-organisme

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est la souche de levure dont nous disposons. Elle est connue pour sa capacité à métaboliser le sucre simple. La levure *Saccharomyces cerevisiae* consomme les sucres réducteurs dans le moût pour former à la fin de la réaction de l'éthanol ainsi que du dioxyde de carbone gazeux.

### ➤ Milieu de culture

Le milieu de culture est préparé à partir du sirop de glucose concentré. Ce dernier est dilué avec de l'eau distillée selon la concentration voulue, il sert de source de carbone pour les micro-organismes. Le milieu est stérilisé à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes.

L'addition des sels tels que : (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) : 5g /l

Extrait de levure : 1g/l a été réalisée

Préalablement stérilisés dans leur milieu de culture, ces éléments apportent des éléments nutritifs nécessaires aux micro-organismes.

### V.1. PREPARATION DE SOUCHE MICRO-ORGANISME (LEVURE SACCHAROMYCES)

Seize virgule cinq gramme de mannitol Salt agar ont été ajouté dans 150ml d'eau et chauffés le mélange jusqu'à l'ébullition à 100°C. Puis, posé dans un flacon et stérilisé à 120°C pendant 20mn. Dix millilitres de gélose bien préparé ont été versé dans la boite de Pétri, ajouté 1ml de jus de canne à sucre et laissé au repos pendant 48 heures.

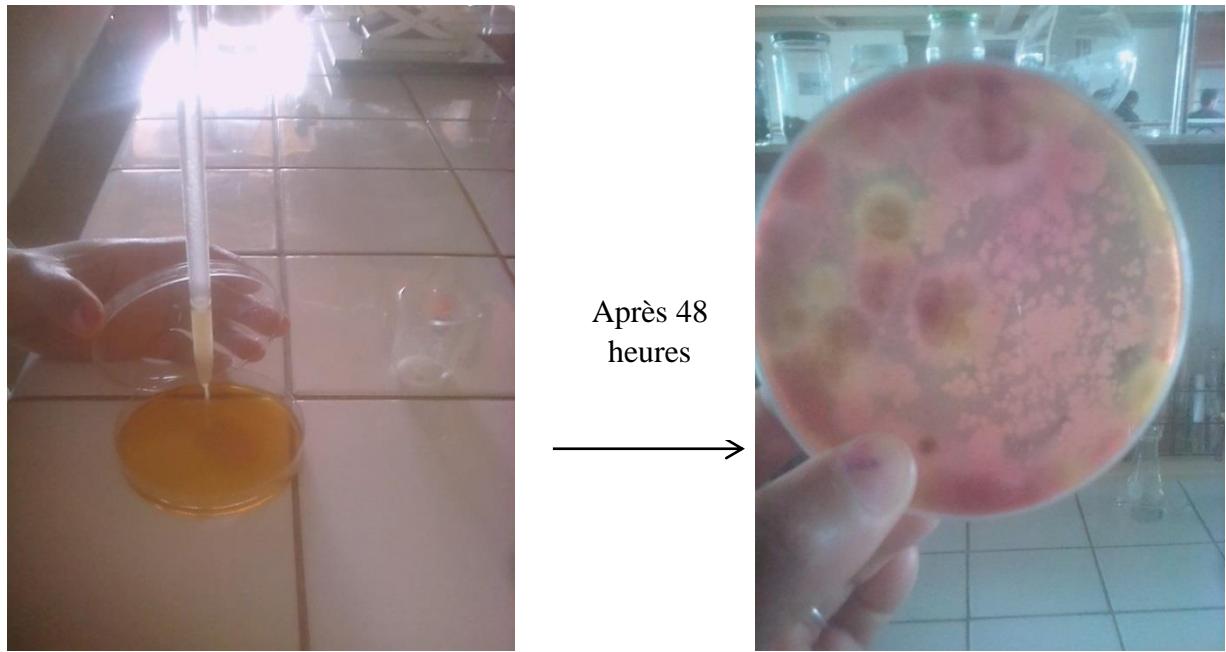


Figure 17: Préparation de la levure *Saccharomyces*

## V.2. PRE CULTURE

Le but de cette pré-culture est de réanimer la levure *Saccharomyces cerevisiae* et de produire de la biomasse s'adaptant facilement au milieu de culture.

La souche est ensemencée dans une solution de glucose ayant une concentration de 30g/l avec 10% (v/v) du milieu de culture.

Les 100ml du milieu de culture de 30 g/l prélevés sont ensuite introduits dans un erlenmeyer de 250ml. 4,2 g/l de levure obtenue à la culture sont ensemencées. La pré-culture est incubée à 30°C sous agitation pendant 48heures.

## V.3. CULTURE DISCONTINUE

La culture discontinue est une culture qui s'effectue dans un système clos sans apport nouveau de substrat avec un volume bien défini et qui se déroule dans une condition de stérilisation stricte jusqu'à l'épuisement du substrat ou jusqu'à l'arrêt spontané de la réaction. Elle permet d'étudier les paramètres de fermentation tels que la concentration du substrat initial, la température, le pH et l'agitation. La pré-culture de 48 heures est inoculée dans le milieu de culture ainsi préparé et la culture est incubée suivant les conditions de température, du pH et d'agitation que nous allons démontrer dans la figure suivante.



Figure 18: Fermentation alcoolique

#### V.4.COMPTAGE DE LA BIOMASSE PENDANT LA FERMENTATION.

La lamelle utilisée pendant le comptage est rincé à l'eau distillée. Le quadrillage de Malassez a été repéré à l'œil nu sur le centre de la lame, et recouvré avec la lamelle. Puis, rempli le quadrillage par capillarité. La culture a été déposée à l'aide d'une pipette pasteur (une goutte) ou une micropipette à l'extrémité de la lamelle et légèrement inclinée sur la plate-forme centrale. Après ; laissé les cellules à sédimenter environ 1 à 2 min avant l'observation microscopique.

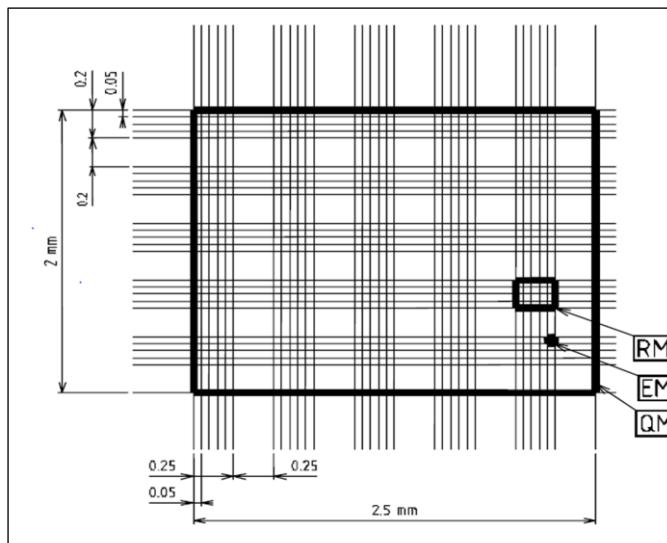


Figure 19: Lame de Malassez



Figure 20: Microscope Optique

Où :

RM : rectangle de Malassez

QM : Quadrillée de Malassez

CM : Cellule de Malassez

Les cellules présentes dans chaque rectangle ont été comptées par le carré après carré: Comptés les cellules dans 4 rectangles de Malassez au minimum et faisons la moyenne de ce résultat.

Y=nombre de cellules\*volume du rectangle

Y × 100 = nombre de cellule /mm<sup>3</sup> (à multiplier par le coefficient de dilution)

Donc :

$$\boxed{\text{Nombre de cellule} = (Y/V) \cdot d}$$

Ou :

Y : nombre de cellules comptées

V : volume du rectangle 1/100 mm<sup>3</sup>

d : facteur de dilution

#### V.4. TRAITEMENT DES RESULTATS EN SYSTEME DISCONTINU

Pour une culture homogène fonctionnant en discontinu, plusieurs paramètres, tels que l'évolution de la biomasse, la consommation du substrat sont pris en compte.

##### V.4.1. Etude cinétique de la formation de la biomasse

- *Vitesse de formation de la biomasse Rx*

C'est une vitesse volumique qui représente l'augmentation de la biomasse par unité de volume et par unité de temps.

$$Rx = \frac{dx}{dt} = \frac{X_2 - X_1}{dt} \text{ (g.l}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)}$$

Ou

dX : différentiel de la concentration de la biomasse entre X2 et X1.

- *Vitesse spécifique de formation de biomasse ou taux de croissance  $\mu X$*

La vitesse spécifique est égale à la vitesse de la formation de biomasse qui est donnée par la relation suivante :

$$\mu X = \mu_{\max} = \frac{dX}{Xdt} = \frac{1}{X} * Rx \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

##### V.4.2. Etude cinétique de l'utilisation du substrat

- *Vitesse volumique de consommation du substrat* (ou disparition) et qui est exprimée par la relation qui suit :

$$Rs = \frac{dS}{dt} = \frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} \text{ (g.l}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)}$$

Ou S2 et S1 étant les concentrations aux instants t2 et t1.

- *Vitesse spécifique de consommation (ou de disparition) du substrat  $qS$*

C'est la vitesse volumique rapportée à l'unité de concentration en biomasse.

$$qS = Rs_{\max} = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = \frac{1}{X} Rs \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

### V.4.3. Etude cinétique de formation des produits

C'est l'évolution de la culture des concentrations en produits formés

- **Vitesse volumique de formation de produit**

$$R_p = \frac{dP}{dt} = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} \text{ (g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}\text{)}$$

Ou

P1 et P2 sont les produits aux instants t1 et t2

- **Vitesse spécifique de formation de produit (éthanol)  $v_p$**

Elle est donnée par la formule suivante :

$$v_p = V_{\max} = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = \frac{1}{X} R_p \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

### V.4.4. Rendement de conversion du substrat

- **Rendement de conversion du substrat en biomasse :  $Y_{X/S}$**

Il est défini par la formule suivante :

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

- **Rendement de conversion du substrat en produit :  $Y_{P/S}$**

Les rendements de conversion du substrat en produit sont données par les relations ci-dessous :

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f}$$

P : est la quantité de produit formé à l' instant t en g l<sup>-1</sup>

S0 : Concentration de substrat à l'instant t<sub>0</sub>.

- **Productivité d'éthanol**

C'est la quantité d'éthanol formé au cours du temps qui est exprimée par la relation suivante :

$$PE = \frac{P}{t} \text{ (g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}\text{)}$$

P : la quantité du produit formé (éthanol)

t : temps

## VI. LA DISTILLATION

La distillation est un procédé de fractionnement et de purification des corps organiques.

Après la fermentation, le mout à distiller a été versé dans un ballon à fond rond portant une tubulure latérale. Chauffé à l'aide d'une chauffe ballon : fixé un thermomètre de telle sorte que son extrémité se trouve juste au-dessus de l'entrée de la tubulure latérale et un courant d'eau froide a été envoyé dans le manchon du réfrigérant. A l'issue de la distillation, le distillat obtenu est récupéré dans un ballon ou erlenmeyer. Le point d'ébullition de l'alcool éthylique est 85 °C.

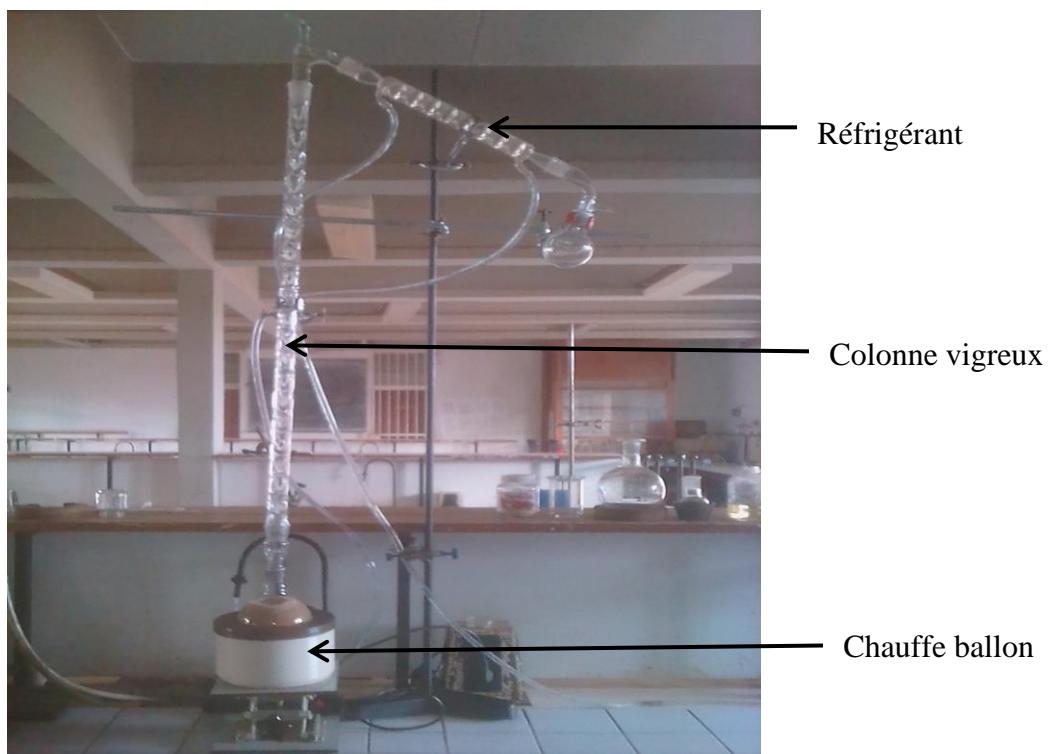


Figure 21: Distillation

# **PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## I. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA MATERIE PREMIERE

### I.1. HUMIDITE ET MATERIE SECHE

Trois essais ont été réalisés et les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 3: Taux d'humidité et de la matière sèche de la féculle de manioc

Essai	m <sub>1</sub> (g)	m <sub>2</sub> (g)	m <sub>3</sub> (g)	H(%)	MS(%)
E1	12.2239	22.6481	21.3515	12.4384	87.516
E2	12.2596	27.7334	25.7460	12.8437	87.1563
E3	12.2036	24.2936	22.7460	12.8007	87.1993
X	12.2290	24.8918	23.2811	12.7200	87.2800

Ou

E : Essai

X : Moyenne

Nous avons trouvé comme humidité moyenne de la féculle du " manioc ", 12.7200% et du pourcentage de la matière sèche, 87.2800%

Cette teneur en eau a une grande importance dans la détermination et la conduite des opérations de récolte, du séchage, du stockage et de la transformation industrielle afin d'évaluer et de maîtriser les risques d'altération par les insectes ou les moisissures.

### I.2. TENEUR EN AMIDON

Le taux de la féculle de tubercules est obtenu par la méthode polarimétrique d'EWERS.

Le résultat est décrit dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4: Taux du pouvoir rotatoire P et P' du tubercule de manioc

Pouvoir rotatoire	1ere	2eme	3eme	4eme	5eme	Moyenne
P	13°60'	11°06'	10°45	10°30'	11°06'	11°46'
P'	6°51'	4° 07'	4°15'	5°33'	5°07'	5°37'

$$1^\circ = 60'$$

$$P = 11^\circ 07' = 667'$$

$$P' = 5^\circ 06' = 306'$$

$$[\alpha] D^{20^\circ C} = 184$$

$$D'où \beta = 2,1725g$$

Donc A (%) = 90.30%

Le taux d'amidon obtenu est de 90.30% par rapport aux matières sèches montre que l'amidon est la principale réserve énergétique dans le tubercule du manioc.

La teneur en amidon constitue est un facteur principal pour classer le degré de saccharification. En effet, plus la teneur en amidon est élevée, plus la variété considérée est apte à être utilisée en hydrolyse pour la production de sirop de glucose. Alors, cette poudre de manioc peut avoir une grande utilisation industrielle intéressante.

D'après KETIKA et AL en 1970. GIRAUD et al en 1991, le tubercule de manioc peut contenir 83 à 90% d'amidon.

## II. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Le manioc est la matière végétale principale utilisée lors de l'hydrolyse enzymatique.

### II.1. TENEUR EN SUCRES REDUCTEURS

#### Application de la gamme étalon

Sept tubes à essai ont été préparés, lesquels contiennent une solution de glucose à différentes concentrations de 0 à 1,2g/l issue d'une solution mère de glucose de 2g/l. Le dosage a été effectué selon la méthode au DNS. La préparation de la gamme étalon présentée par le tableau suivant :

Tableau 5: Mesure de la concentration de glucose

N° tube	0	1	2	3	4	5	6
[Glucose]=2g/l	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
E.D (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4
D.N.S (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Bain Marie à 100°C pendant 5minutes							
E.D (ml)	10	10	10	10	10	10	10
[Glucose] g/l	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2

La mesure des densités optiques de la gamme étalon est présentée dans le tableau suivant

Tableau 6: Mesure des densités optiques de la gamme étalon

[Glucose]g/l	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
D.O (540nm)	0	0.152	0.296	0.460	0.596	0.748	0.892

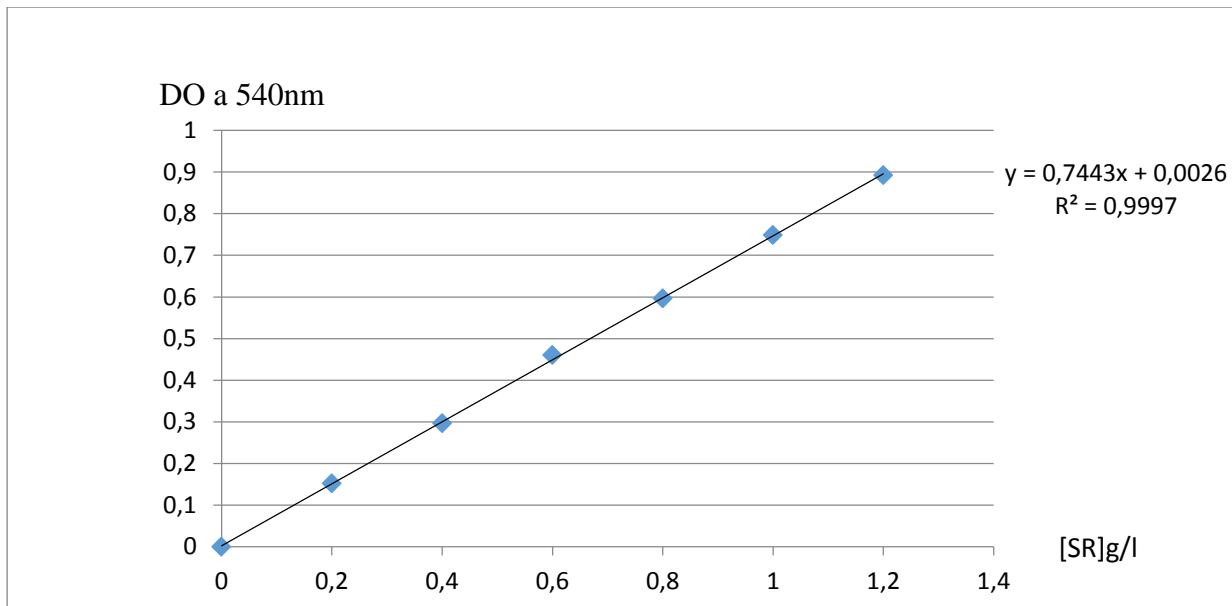


Figure 22: Courbe étalon de la densité optique en fonction de la concentration de glucose

## II.2. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN SUCRES REDUCTEURS

En utilisant la régression linéaire, la concentration en sucres réducteurs est déterminée par la relation suivante :

$$Y = \frac{X}{0.7443} - 0.0026$$

, avec  $r^2 = 0.9997$

Où

$Y = [SR]$  : Concentration des sucres réducteurs

$X = D.O \text{ à } 540\text{nm}$  : Densité optique

Lors de la défécation et le dosage proprement dit, deux dilutions ont été effectuées (1/20 et 1/10). En tenant compte de ces dilutions, la concentration de sucres réducteurs obtenue est multipliée par le facteur de dilution (1/200).

D'où :

$$[SR] = \left( \frac{D.O}{0.7443} - 0.0026 \right) * 200$$

Dans cette expérience, la température, le pH et la concentration sont maintenues respectivement à 50°C, 4.5 et 100g/l et la vitesse d'agitation à 250rpm.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 7: Evolution de la concentration en sucres réducteurs (g/l)

Poudre manioc sans écorce			Poudre manioc avec écorce		
Temps (h)	Densité	[SR] g/l	Temps (h)	Densité	[SR] g/l
0	0,12	31,725063	0	0,09	18,983797
24	0,2	53,221771	24	0,13	29,732151
48	0,23	61,283036	48	0,18	43,167594
72	0,44	117,7119	72	0,23	56,603036
96	0,41	109,65063	96	0,25	61,977213
120	0,34	90,84101	120	0,21	51,228859
144	0,27	72,031391	144	0,19	45,854682

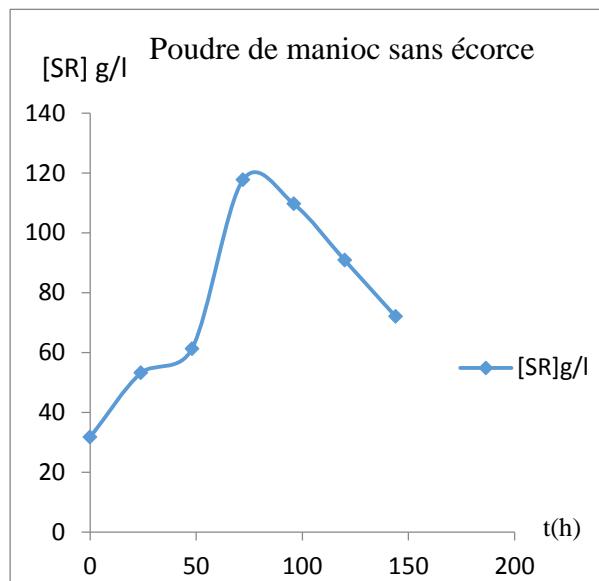


Figure 23: Courbe de la concentration de glucose en fonction du temps pour le cas de poudre manioc sans écorce

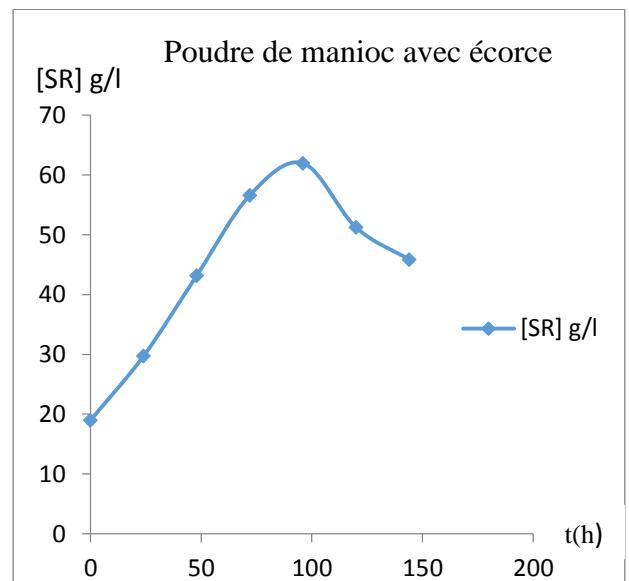


Figure 24: Courbe de la concentration de glucose en fonction du temps pour le cas de poudre manioc avec écorce

Le suivi de la concentration de sucre réducteur est très important pour la production d'éthanol.

\*Pour la figure 23, cas de poudre de manioc sans écorce : durant 72 heures d'hydrolyse, la vitesse de la catalyse enzymatique augmente très rapidement. Cette augmentation indique une transformation intense de la féculle de manioc en sucres réducteurs. Après 72heures, on constate qu'il y a une diminution des sucres formés ou presque constante (une liaison covalente est rompue par action d'une molécule d'eau et l'enzyme). Le temps maximum de la formation de sucre avec l'invertase est atteint à 72heures avec les conditions favorables telles que pH= 4.5, tour de rotation 250rpm ce qui correspond à la concentration en sucres réducteurs de 117.71 g/l.

\*\*Pour la figure 24, cas de poudre de manioc avec écorce : durant 96heures d'hydrolyse, la vitesse de la catalyse enzymatique augmente lentement et la concentration de sucre augmente. Et à partir de 96heures, la concentration de sucre diminue donc, l'activité enzymatique est faible. Les deux cas sont même condition mais le rendement maximum pour le cas de manioc avec écorce atteint aux 96 heures, ce qui correspond à la concentration en sucres réducteurs 61.9772g/l. La poudre de manioc sans écorce montre le rendement plus élevé par rapport à la poudre de manioc avec écorce.

En général, ce courbe présente des allures similaires, et montrent l'évolution des concentrations en sucres réducteurs au cours de l'hydrolyse.

#### II.4. RENDEMENT D'HYDROLYSE

Le rendement en sucres réducteurs obtenu pour une température de 50°C, à pH= 4,5 et de vitesse d'agitation 250rpm.

Le tableau suivant résume le rendement en sucres réducteurs obtenu.

$$R(\%) = \frac{[SR]t - [SR]to}{[Amidon]to} * 100$$

Tableau 8: Résultat du rendement d'hydrolyse

	Poudre manioc sans écorce	Poudre manioc sans écorce
Rendement(%)	85.9918	42.9934

Les résultats des essais effectués permettent de conclure que la féculle de manioc est hydrolysable directement par l'enzyme hydrolase (invertase). L'hydrolyse de la féculle de manioc permet d'améliorer le gain de rendement.

Les rendements d'hydrolyses sont de 85.9918% pour la poudre manioc sans écorce et 42.993416% pour la poudre manioc avec écorce avec la vitesse d'agitation de 250rpm et un pH= 4.5. L'hydrolyse enzymatique nécessite une forte agitation pour favoriser la cinétique de formation du complexe enzyme – substrat.

L'activité maximale de ces enzymes s'obtient pour 64ml d'invertase dans 100g/l de mélange à pH = 4,5 et à la température de 50°C. Ce rendement devrait être amélioré par rapport à celui trouvé par ANDRIANARISON, (1999) qui est égal à 90,46% et Carlos Martín, décembre (2016) qui a obtenu 95.3%.

### III. FERMENTATION

La fermentation permet de transformer des sucres réducteurs en éthanol par l'intermédiaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Pendant la fermentation, la variation de la densité est contrôlée après chaque 24 heures de fermentation et les restes de sucres non fermentés ou sucres résiduels sont à déterminer. La variation de la densité et de la concentration des sucres résiduels des essais effectués avec les paramètres optimums identifiés est donc détaillée ci-dessous.

#### III.1. EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE SUCRE REDUCTEUR

Tableau 9: Evolution de la concentration en sucres réducteurs (g/l) et augmentation taux d'éthanol

Poudre manioc sans écorce				Poudre manioc avec écorce			
Temps (heures)	D.O	[SR] g/l	P (g/l)	Temps (heures)	D.O	[SR] g/l	P (g/l)
0	0,4	107,1516	46,424199	0	0,24	64,082961	14,95852
24	0,37	99,076232	50,4618843	24	0,2	53,315801	26,3421
48	0,21	56,007591	71,9962046	48	0,17	45,240431	42,379785
72	0,19	50,624011	74,6879946	72	0,15	39,856851	59,071575
96	0,11	29,08969	85,4551548	96	0,11	29,08969	74,455155
120	0,09	23,70611	88,1469448	120	0,09	23,70611	88,146945
144	0,07	18,32253	90,838735	144	0,08	21,01432	89,4928399

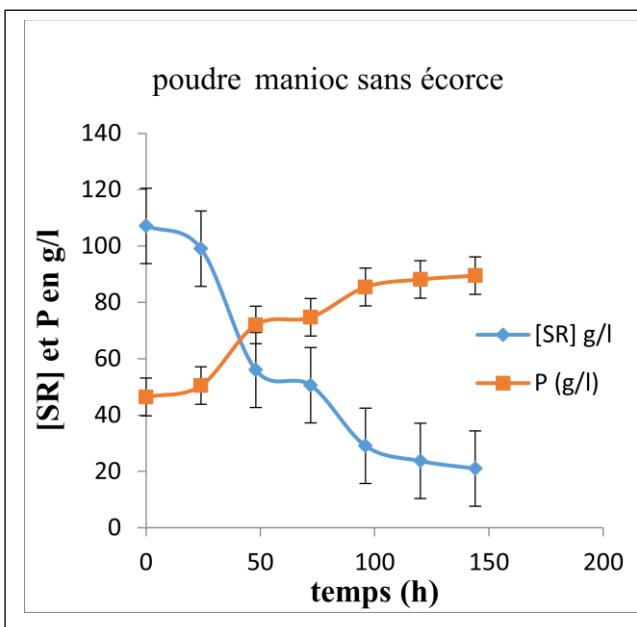


Figure 25: Courbe de la concentration de Glucose en fonction du temps pour le cas Poudre de manioc sans écorce

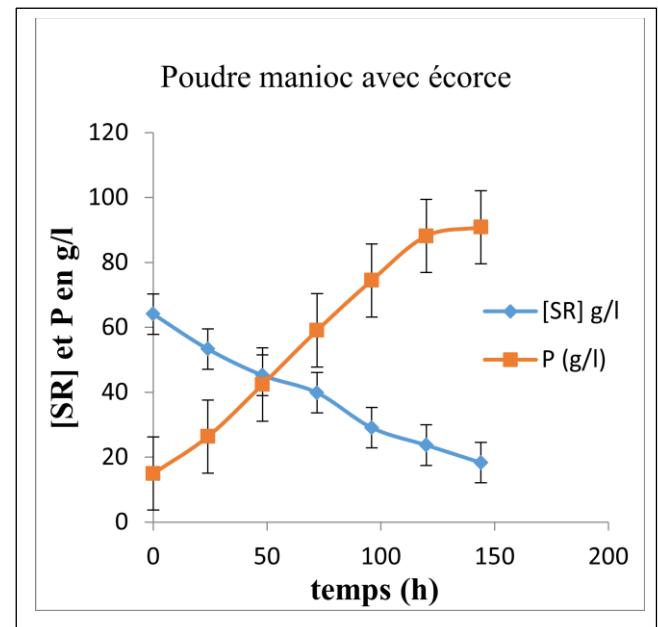


Figure 26: Courbe de la concentration de Glucose en fonction du temps pour le cas Poudre de manioc avec écorce

L'évolution de la concentration montre une diminution de la teneur en substrat tandis que celle de la biomasse et de l'éthanol augmentent. Le substrat a été consommé dès le premier jour de la culture parallèlement à la croissance de la biomasse. La consommation de sucres est ralentie après 24 heures de culture. Pendant la fermentation, la concentration de glucose diminue. Cette diminution est due à l'action de la levure *Saccharomyces*.

**Résumé des effets de la concentration initiale en substrat sur l'activité fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* sur l'hydrolysat d'amidon de manioc.**

Tableau 10: Résumé des effets de la concentration

Poudre manioc	S <sub>0</sub> (g/l)	R <sub>s</sub> (g/l)	R <sub>p</sub> (g/l)	R <sub>x</sub> (g/l)	X (g/l)	qS (h-1)	vP (h-1)	μ <sub>x</sub> (h-1)	Y <sub>X/S</sub>	Y <sub>P/S</sub>	PE (g/l/h)
Sans écorce	100	0,1622	0,3244	0,0061	3,2049	0,051	0,101	0,019	0,0099	0,4998	1.124
Avec écorce	100	0,075	0,15	0,0031	4,2638	0,018	0,035	0,007	0,0056	0,2801	1.117

S <sub>0</sub> : Concentration de substrat à l'instant t <sub>0</sub> R <sub>s</sub> : Vitesse volumique de consommation du substrat R <sub>p</sub> : Vitesse volumique de formation de produit R <sub>x</sub> : Vitesse de formation de la biomasse X : Nombre des biomasses formées	qS: Vitesse spécifique de consommation du substrat vP: Vitesse spécifique de formation de produit μ <sub>x</sub> : Vitesse spécifique de formation de biomasse Y <sub>X/S</sub> : Rendement de conversion du substrat-biomasse Y <sub>P/S</sub> : Rendement de conversion du substrat en produit PE: Productivité d'éthanol
---	--

**III.2.COMPTAGE DES MICRO-ORGANISMES PENDANT LA FERMENTATION**

Les micro-organismes sont cultivés en milieu liquide, ils se développent habituellement dans un système fermé en « batch » ou discontinue. Ils sont incubés dans un erlenmeyer contenant de milieu de culture

Equation de la croissance suivant la loi de MONOD

$$\mu = \frac{\mu_{\max}[S]}{K_s + [S]} ; \text{ et } \mu_{\max} = \frac{dX}{X dt} = \frac{1}{X} * R_x$$

$\ln(x) = \ln(x_0) + \frac{\ln 2}{G} t$  avec  $\frac{\ln 2}{G}$  est le taux de croissance ou vitesse spécifique de croissance  $\mu_{\max}$

D'où G est le temps de génération, la valeur de  $\mu_{\max}$  est dans le tableau suivant

Tableau 11: Vitesse spécifique de la croissance de biomasse

Poudre manioc	μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )
sans écorce	0,019
avec écorce	0,007

Le tableau suivant montre le logarithme du nombre de cellules en fonction du temps d'incubation.

Tableau 12: comptage du micro-organisme

temps (h)	Nombre de cellule	Log de nombre de cellule
0	7800	3,892
24	8000	3,903
48	14500	4,1613
72	16000	4,2041
96	15800	4,1986
120	15700	4,1958
144	10200	4,0086

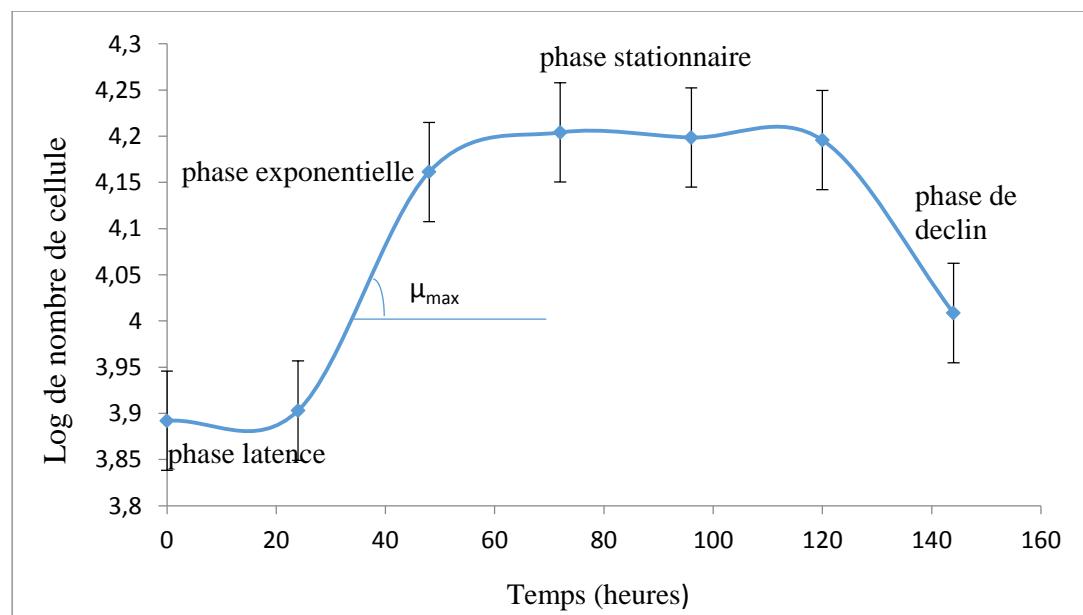


Figure 27: Représentation de courbe MONOD

La courbe du micro-organisme est débuté par la phase latence au premières 24heures de culture, il n'y a pas d'augmentation de nombre de cellule. La phase latence est une phase d'adaptation des levures. La durée de cette phase dépend de l'âge des levures et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la levure pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat.

A partir de 24heures jusqu'à 72heure, une forte croissance des levures est constatée, c'est la phase exponentielle. Dans cette phase, il y a une division cellulaire à un taux maximal et le taux de croissance est maximum. Les levures se multiplient sans entrave. La mortalité est faible.

La phase stationnaire a été atteinte à partir de 72heures, la croissance de la cellule est constante. La dernière phase s'agit de la phase de déclin où la capacité limite du milieu est atteinte. Elle correspond à une période où les levures ne se divisent plus, meurent et sont lysées par les enzymes qu'elles libèrent.

### III.3. EVOLUTION DE LA DENSITE DU MOUT

Le tableau suivant montre l'évolution de la densité du mout pendant la fermentation en fonction du temps

Tableau 13: évolution de la densité du mout pendant la fermentation

Poudre manioc sans écorce		Poudre manioc avec écorce	
Temps (heures)	Densité	Temps (heures)	Densité
0	0.99451	0	0.99280
24	0.99213	24	0.99175
48	0.99001	48	0.98789
72	0.9864	72	0.98545
96	0.97952	96	0.97825
120	0.97670	120	0.96785
144	0.97430	144	0.96763

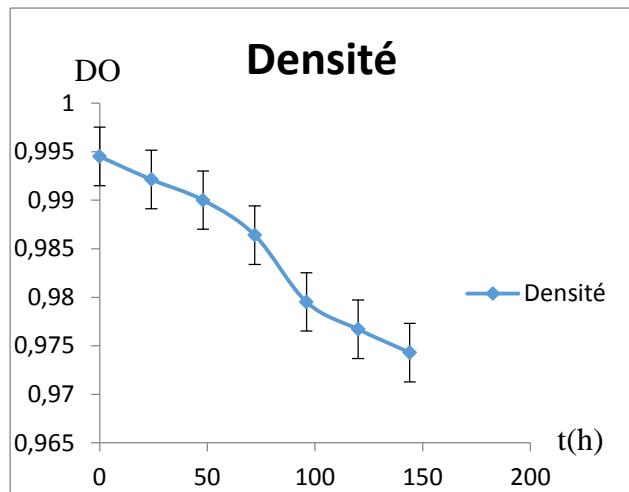


Figure 28: Courbe représentant la densité du mout de manioc en fonction du temps pour la poudre manioc sans écorce

D'après la figure 28 et la figure 29, on constate une diminution progressive de la densité du mout à partir du deuxième jour. Celle-ci se traduit par la formation de l'éthanol après 24 heures de fermentation.

Les deux courbes ci-dessus montrent que la consommation en substrat est indiquée par la croissance de la biomasse et la formation du produit (éthanol).

Lorsque la fermentation se déroule normalement, la densité de mout décroît visiblement durant la fermentation.

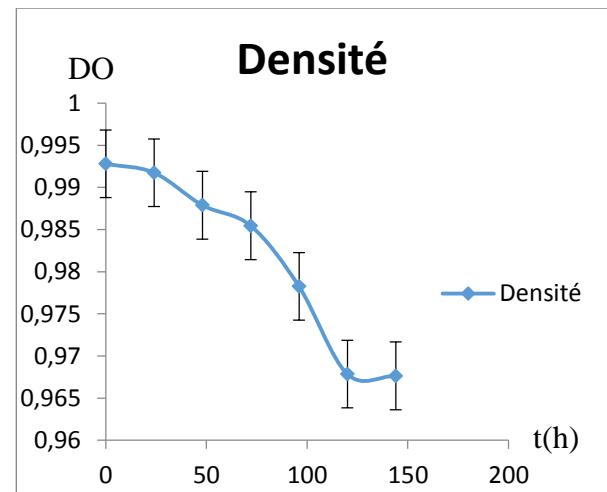


Figure 29: Courbe représentant la densité du mout de manioc en fonction du temps pour la poudre manioc avec écorce

Les levures en fermentation fonctionnent bien car l'adaptation des levures en milieu de culture a été déjà achevée durant la revivification des levures. La diminution significative de la densité au deuxième jour de fermentation justifie l'augmentation de la vitesse de la fermentation. Le pH, la température et la vitesse de rotation sont des effets directs sur l'activité fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae*.

### III.4. EVOLUTION DE DEGAGEMENT DE GAZ CO<sub>2</sub>

Pendant la fermentation il y a un dégagement de gaz CO<sub>2</sub>

Tableau 14: évolution de dégagement de gaz CO<sub>2</sub>

Temps (jours)	CO <sub>2</sub> (ml)
1	11
2	45
3	80
4	150
5	165
6	172
7	190

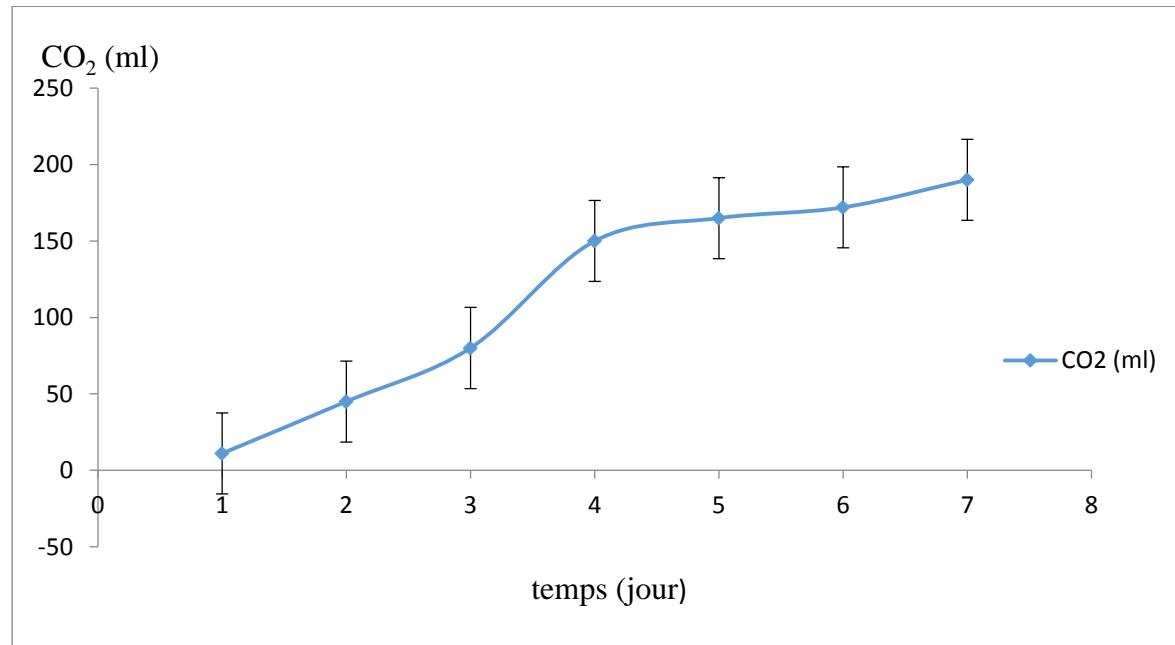


Figure 30: Courbe représentant l'évolution de gaz

La courbe sur la figure 30 ci-dessus montre une augmentation de la production de gaz. Ce fort dégagement de gaz signifie que le système de fermentation alcoolique fonctionne bien. La vitesse de fermentation augmente avec le volume de gaz dégagé. La production d'éthanol par la levure *Saccharomyces* pendant la fermentation est donc témoignée par un dégagement de CO<sub>2</sub>.

#### IV. DISTILLATION

La distillation permet de séparer le bioéthanol des produits secondaires formés et l'eau lors de la fermentation. Le tableau ci-dessous résume les degrés alcooliques et les rendements d'éthanol obtenus lors des distillations.

<b>Densité alcoolique</b>	<b>Rendement d'éthanol</b>
$D = \frac{\text{Masse de produit obtenue}}{\text{Volume de produit obtenu}}$	$R(%) = \frac{\text{masse de produit obtenue}}{\text{masse de produit initial}} * 100$

Tableau 15: Degré alcoolique et rendement des distillats

	Poudre manioc sans écorce	Poudre manioc avec écorce
Masse de produit initial (g)	100	100
Masse de produit obtenue (g)	23.4600	19.6900
Volume de produit obtenu (ml)	29.7866	25.00
Densité alcoolique	0.7876	0.7876
Degré alcoolique (°GL)	98	98
Rendement d'éthanol (%)	23.46	19.69

Le tableau 15 ci-dessus montre que le degré alcoolique du distillat pour la poudre de manioc sans écorce est presque le même à celui du distillat pour la poudre manioc avec écorce qui est de 98°GL. Le degré alcoolique indique la pureté de l'éthanol obtenu. Le rendement de bioéthanol à base de poudre de manioc sans écorce 23.46% est supérieur à celui du rendement de bioéthanol à base de poudre de manioc avec écorce 19.69%. Cette différence est dû à la concentration en sucres fermentescibles consommés par les levures dans le moût.

Le rendement de bioéthanol à base de poudre de manioc sans écorce est proche à celui des auteurs ANDRIAMANANTSOA Ainavalonjaka qui ont eu un rendement alcoolique de 23.48 % lors de leur travail sur la Fabrication de bioéthanol à partir d'amidon de manioc et étude des facteurs influant sur l'hydrolyse enzymatique de l'amidon(2017). Monica et Al qui ont eu un rendement alcoolique 23% lors de leur travail sur Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch for Production of Bioethanol with a Colombian Wild Yeast Strain, (2011).

Nous pouvons dire que nos résultats sont prometteurs. Il se trouve que cela pourrait aider l'industrie Malagasy à la promotion de son investissement.

## CONCLUSION

Le tubercule de manioc est riche en amidon, cette teneur en amidon varie de 84 à 87.76% de la matière sèche. Le manioc est classé parmi les produits amylacés, au même rang que le fruit à pain. Le tubercule de manioc présent une teneur maximale en amidon, soit 87.76% de la matière sèche et la transformation de tubercule de manioc en sirop de glucose et en éthanol est réalisable grâce aux procédés d'hydrolyse, fermentation et la distillation.

Lors de l'hydrolyse enzymatique, deux paramètres ont été étudiés : la concentration initiale en substrat et le pH du milieu. Les rendements de conversion de l'amidon en sucres réducteurs de 85,99% pour le cas de poudre manioc sans écorce et 42.99% pour le cas de poudre manioc avec écorce ont été obtenus dans les conditions où la valeur optimale de la concentration initiale en substrat a été de 100g/l avec la valeur du pH 4.5. La température et l'agitation ont été maintenues respectivement à 50°C et à 250rpm.

Le procédé de la fermentation alcoolique consiste à la transformation des sucres réducteurs par la souche de levure *Saccharomyces Cerevisiae*. Deux paramètres ont été étudiés : le pH dont la valeur optimale trouvée a été égale à 4.5 et avec la concentration du substrat initial de 30g/l. La température a été maintenue à 30°C. Dans ces conditions, les rendements en éthanol de 23.46% pour le cas de poudre manioc sans écorce et 19.69% pour le cas de poudre manioc avec écorce ont été obtenus.

Le sirop de glucose après concentration et purification de l'hydrolysat de l'amidon de tubercule de manioc présente un intérêt multiple au niveau industriel (alimentaire ou pharmaceutique). L'éthanol constitue le composé principal de la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae*, outre le gaz carbonique. Leurs formations sont influencées par la souche de levure et l'augmentation de la température.

Le système fonctionne bien et nos résultats sont prometteurs. L'éthanol issu de la fermentation est un produit très recherché. Son utilisation est multiple et touche différents niveaux : alcool de bouche, alcool pharmaceutique, alcool carburant et alcool pour les transformations industrielles. Le présent travail a permis de mettre en évidence les possibilités de production du sirop de glucose et d'alcool à partir des produits agricoles autres que le fruit à pain, la pomme de terre, le maïs et la patate douce. Bien que les résultats obtenus soient encore préliminaires, ils sont encourageants.

Nous envisagerons dans l'avenir : d'étudier les autres paramètres influençant la formation des sucres réducteurs à savoir la température et l'agitation. Une fois tous les paramètres physico-

chimiques maîtrisés, nous nous proposons de passer dans un système continu à l'échelle pilote au Laboratoire, c'est-à-dire à l'échelle pilote afin d'obtenir de grande quantité de sirop de glucose à partir de la farine de manioc, d'étudier l'influence de la température et l'agitation sur la fermentation alcoolique d'hydrolysat ; et d'étudier la fermentation en système continu afin d'augmenter encore plus le rendement en éthanol.

Eventuellement, il semble apporter d'imaginer une simulation et une modélisation du phénomène afin de prédire un modèle.

## BIBLIOGRAPHIES

- [1]. **YOUNOUSSA DIALLO** (1), Momar Talla Gueye (1), sMama Sakho (2), Praxède Gbaguidi Darboux (1), Amadou Kane (1), Jean-Paul Barthelemy (3), Georges Lognay (3), (2013), *Importance nutritionnelle du manioc et perspectives pour l'alimentation de base au Sénégal*, Article
- [2]. **RAVAOARIMALALATIANA** Miora Vatosoa, (2016), *Production d'éthanol combustible à partir de canne à sucre : Efficience énergétique et écologique dans la commune de Fanandra Toamasina II*, Mémoire de fin d'étude, P15
- [3]. **RAKOTONDRAVE T**, (2005). *Contrôle qualité de la farine de manioc fabriqué dans l'unité pilote de transformation à Ambatomanoina pour usage agroalimentaire, mémoire de fin d'Eude en vue de l'obtention d'un diplôme d'ingénierat en agronomie*, Mémoire de fin d'étude; p45–50
- [4]. **JUSTIN KOUAKOU**, Samuel Nanga Nanga, Catherine plagne-ismail, Aman Mazalo Pali et Kukom Edoh Egnakossan, (2015), *Production et transformation du Manioc*, Article
- [5]. **FAO**, (2013), *Le manioc : Guide pour une intensification durable de la production*. Revue
- [6]. 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 PAGE 28, (2004), Filière Manioc.
- [7]. **RAKOTONDRAVAO** Haingomaholy Michelle, (2014), *Valorisation du Manioc pour la FABRICATION DE BIOETHANOL*, Mémoire de fin d'étude
- [8]. **RAKOTOSAMIMANANA** Harimalala, (2017), *Etude des conditions de l'hydrolyse acide dans la production de bioéthanol à partir de l'amidon de manioc* Mémoire de fin d'étude
- [9]. **ANDRIAMANANTSOA** Ainalavalonjaka, (2017), *Fabrication de bioéthanol à partir d'amidon de manioc et étude des facteurs influant sur l'hydrolyse enzymatique de l'amidon*, Mémoire de fin d'étude
- [10]. **ANTUYA** Ahamada Mravoreha, (2007), *contribution à la valorisation de Substances fermentescibles : Cas du manioc et du fruit à Pain*, Mémoire de fin d'étude
- [11]. **MULTON JL**, (1992), *Les sucres, les edulcorants et les glucides de charge dans les industries agroalimentaires*, Paris: Tec & Doc-Lavoisier; Revue, p 904
- [12]. **Shinnosuke Onuki**, Bioethanol : *Industrial production process and recent studies*, Revue
- [13]. **VALORISATION de Distillation**, (Novembre 2012), Revue
- [14]. **ADRIAN J**, **POTUS J**. et **FRANGNE R.**, (1995). *La Science Alimentaire de A à Z. 2ème Edition*. Lavoisier, Technique et Documentation. Paris France, Article; p477.
- [15]. **ATKIN N**, (1999). *Localisation of amylose and amylopectin in starch granules using enzyme-gold labelling*. Starch/Stärke, 5 ; p163– 172.

- [16]. **JENKINS** P., **DONALD**, (1998). *Gelation of starch: a combined and SANS study*. Carbohydrate Research, 308 ; p133– 147.
- [17]. **Alfenore** S.1, **Molina-Jouve** C.1, (2016), *La conversion microbienne des ressources lignocellulosiques pour la production de molécules énergétiques : verrous et perspectives*, LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France, Innovations Agronomiques Article P54, 89-104
- [18]. **JEREMY** Boucher. , (2014). *Etude des possibilités de production d'éthanol hémicellulosique dans le cadre d'une bioraffinerie papetière*. Génie des procédés. Université de GrenobleFrançais.
- [19]. **SADI** Meriem : *Le bioéthanol, une véritable alternative pour une énergie propre*, Ingénieur Division Bioénergie et Environnement – CDER,
- [20]. **Vincent PREVOT**, (juin 2013), *Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide, microbiologie industrielle*, Thèse
- [21]. **ANDRIANANTAINA** Tanteliniaina Berson Edinah, (Août 2008), *Projet de production d'éthanol à partir de la farine de manioc, dans le district de maevatanana, région betsiboka*. Mémoire de fin d'étude
- [22]. **MOHAMED** Mehdi Kacimi, (mars 2008), *Analyse du secteur de l'éthanol selon les principes du développement durable*, Sherbrooke, Québec, Canada. Thèse
- [23]. **MELVIN**, (1979), *The effect of extractable lipids on the viscosity characteristics of corn and wheat starches*. Journal of Science Food Agric.
- [24]. **LOUISOT** P, (1999), *Prediction of protein-glucose binding sites using support machine*.
- [25]. **Marcellin Berthelot** , (1860), *Description de l'invertase*
- [26]. **LEACH, SCHOCH**, (1961), *Structure of the starch granule. II. Action of various amylases on granular starches*. Cereal Chemistry ; p34–41.
- [27]. **RUSSEL**. (1987), *Gelatinisation of starches of different amylose/ amylopectin content. A study by differential scanning calorimetry*. Journal of Cereal Science,
- [28]. **MOSS**, (1996). *Basic terminology of stereochemistry*, Pure Appl. Chem., IUPAC
- [29]. **BAHRANI**, (2012). *Modification des Propriétés Physico-Chimiques de l'Amidon par Procédées Hydrothermiques : Contribution à l'étude des Transferts Couplés Chaleur-Masse*. Thèse de doctorat, Génie des Procédés, La SIE, Université de La Rochelle, Thèse
- [30]. **RANDRIAMANGA ANDONIRINA** Cathérine Jane Rica, 2013, *Contribution à la valorisation de manioc : Essai de fabrication de bière au Manioc*, Ingénieur en Génie Chimique Mémoire de fin d'étude

[31] Mr. HETATACHE Aboubakr,( **Décembre 2014**), *Modélisation floue de type takagi-sugeno appliquée à un bioprocédé*

## WEBOGRAPHIE

[1]. [www.ademe.fr/partenaires/agriche/publications/documents française bilans Énergétiques.](http://www.ademe.fr/partenaires/agriche/publications/documents/française/bilans/Energétiques)

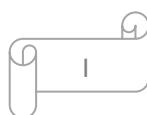
## ANNEXE

### I. MECANISME REACTIONNEL DE LA FERMENTATION

Le mécanisme réactionnel de la fermentation alcoolique se fait en deux étapes qui sont la glycolyse suivie de la décarboxylation de l'acide pyruvique.

La glycolyse est composée de 10 grandes étapes, faisant intervenir 10 enzymes :

1. Réaction de **transphosphorylation** du glucose en glucose-6-phosphate catalysée par la **glucokinase** au niveau du foie ou par l'**hexokinase** au niveau des autres organes. Cette réaction consomme une molécule d'ATP.
2. Réaction d'**isomérisation** du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate catalysée par la **6-phosphohexose-isomérase**.
3. Réaction de **transphosphorylation** du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate catalysée par la **6-phosphofructo-kinase**. Cette réaction consomme une molécule d'ATP.
4. -Réaction de **dégradation** du fructose-1,6-biphosphate en dihydroacétone-phosphate et en glycéraldéhyde-3-phosphate catalysée par l'**aldolase**.  
-Réaction d'**isomérisation** du dihydroacétone-phosphate en glycéraldéhyde-3-phosphate catalysée par la **triosephosphate-isomérase**.
5. Réaction de **phosphorylation** du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-biphosphoglycérate catalysée par la **glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase**. Cette réaction nécessite une molécule de phosphate ; elle permet également la formation de NADH, H<sup>+</sup> à partir de NAD<sup>+</sup>.
6. Réaction de **transphosphorylation** du 1,3-biphosphoglycérate en 3-phosphoglycérate catalysée par la **phosphoglycérate-kinase**. Cette réaction permet la formation d'ATP à partir d'ADP.
7. Réaction de **mutation** du 3-phosphoglycérate en 2-phosphoglycérate catalysée par la **phosphoglycéromutase**.
8. Réaction de **déshydrogénéation** du 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate catalysée par l'**énolase**. Cette réaction relargue une molécule d'H<sub>2</sub>O.
9. Réaction de **transphosphorylation** du phosphoénolpyruvate en énolpyruvate catalysée par la **pyruvate-kinase**. Cette réaction permet la formation d'ATP à partir d'ADP.
10. Réaction de **tautomérie cétoné-énol** de l'énolpyruvate en pyruvate catalysée par la **pyruvate-kinase**



## II. PREPARATION DES SOLUTIONS DE CARREZ

On a préparé :

- De l'acide chlorhydrique (HCl) 25% (P/P) et de 1,128% (P/V)
- Une solution de CARREZ I 100ml à partir de 21,9g d'acétate de zinc ( $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ )  
+ 3g d'acide acétique ( $CH_3COOH$ ) et de l'eau distillée
- Une solution de CARREZ II 100ml à partir de 10,5g de ferrocyanure de potassium ( $K_4(Fe(CN)_6 \cdot 2H_2O$ ) et de l'eau distillée
- Ethanol 40% (V/V)

## III. TABLEAU DE DENSIMETRE POUR DETERMINER LE DEGRE ALOOLIQUE

Tableau 16: Densité pour déterminer le degré alcoolique

DEGRÉS			Densités	DEGRÉS			Densités	DEGRÉS			Densités		
Baumé	Cartier	Gay-Lussac		Baumé	Cartier	Gay-Lussac		Baumé	Cartier	Gay-Lussac			
10	10	0	1.000	16	35	0.960	26	70	0.891	71	0.888		
		1	0.999		36	0.959		28	72	0.886	73	0.884	
		2	0.997		37	0.957		29	74	0.881	75	0.879	
		3	0.996		38	0.956		30	76	0.876	77	0.874	
		4	0.994		39	0.954		31	77	0.871	78	0.871	
		5	0.993		40	0.953		32	79	0.868	80	0.865	
		6	0.992		41	0.951		33	81	0.863	82	0.860	
		7	0.990		42	0.949		34	83	0.857	84	0.854	
		8	0.989		43	0.948		35	85	0.851	86	0.848	
		9	0.988		44	0.946		36	87	0.845	88	0.842	
11	11	10	0.987	18	45	0.945	37	88	0.842	89	0.838		
		11	0.986		46	0.943		38	90	0.835	91	0.832	
		12	0.984		47	0.941		39	91	0.832	92	0.829	
		13	0.983		48	0.940		40	93	0.826	94	0.822	
		14	0.982		49	0.938		41	94	0.822	95	0.818	
		15	0.981		50	0.936		42	95	0.818	96	0.814	
		16	0.980		51	0.934		43	97	0.810	98	0.805	
		17	0.979		52	0.932		44	99	0.800	100	0.795	
		18	0.978		53	0.930		45	100	0.791			
		19	0.977		54	0.928							
12	12	20	0.976	21	55	0.926	46	99	0.800	100	0.795	0.791	
		21	0.975		56	0.924		47	97	0.810	98	0.805	
		22	0.974		57	0.922		48	95	0.814	96	0.810	
		23	0.973		58	0.920		49	97	0.810	98	0.805	
		24	0.972		59	0.918		50	99	0.800	100	0.795	0.791
		25	0.971		60	0.915		51	95	0.818	96	0.814	
		26	0.970		61	0.913		52	93	0.826	94	0.822	
		27	0.969		62	0.911		53	94	0.822	95	0.818	
		28	0.968		63	0.909		54	92	0.829	93	0.826	
		29	0.967		64	0.906		55	90	0.835	91	0.832	
13	13	30	0.966	24	65	0.904	47	89	0.848	90	0.845		
		31	0.965		66	0.902		48	87	0.845	88	0.842	
		32	0.964		67	0.899							
		33	0.963		68	0.896							
		34	0.962		69	0.893							

#### IV. UNE AUTRE METHODE POUR DETERMINER LE DEGRE ALCOOLIQUE AVEC UN ALCOOLISEUR.

Le densimètre est un instrument en verre utilisé pour la mesure de la masse volumique d'un liquide en utilisant le principe d'Archimède.



Figure 31: Densimètre

##### PROCEDE DE MESURE :

Le liquide à examiner est introduit dans une éprouvette transparente de taille appropriée et amené à la température de référence indiquée du densimètre, il faut veiller à ce que le ménisque soit bien régulier et ne se déforme pas lors de mouvements de va-et-vient. Une fois le densimètre bien équilibré et flottant librement sans toucher la paroi de l'éprouvette, on lit la densité « d'en bas » dans le cas de liquides transparents, pour le cas d'un liquide opaque on lit la densité « d'en haut ».

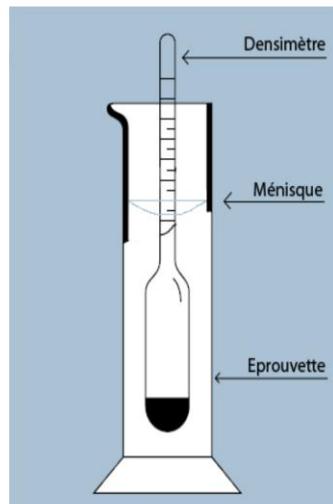


Figure 32: Utilisation de densimètre



IMPETRANTE: RAKOTOMAHEFA Mamy Natacha

Email : [nata02sha@gmail.com](mailto:nata02sha@gmail.com)

Tel : 0349223947

Adresse : Lot VS52VGAtterQ Avaratr'ankatso



## CONTRIBUTION A LA PRODUCTION D'ETHANOL A PARTIR DE L'AMIDON DE MANIOC PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE

### RESUME

Le tubercule de manioc sec est utilisé comme matière première pour la production de bioéthanol. Le manioc a une forte teneur en amidon compris entre 83 à 88%. Il présente ainsi une source d'amidon pour la fabrication de matière première sucré pour produire de l'alcool par fermentation. La farine de manioc obtenue, est mélangée avec de l'eau de concentration 100g/l (poids/volume) chauffé à 60°C pendant 60mn. La farine bien gélifiée est hydrolysé par l'invertase pour obtenir du sucre fermentescible. La concentration en sucres réducteurs obtenue à la fin des hydrolyses enzymatiques effectuée en laboratoire est de 117.71g/l pour le cas de poudre manioc sans écorce, avec rendement de 85.99%. Et de 61.97g/l pour le cas de poudre manioc avec écorce, pour un rendement de 42.99%. Le sucre réducteur fermentescible est fermenté par la souche de la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour produire de l'alcool principalement composé de l'éthanol. Par suite, le mout obtenu par la fermentation est distillé. Le produit final obtenu est l'éthanol avec des rendements de 23.46% sans écorce et 19.69% avec écorce. Plusieurs paramètres sont optimisés afin d'obtenir un rendement élevé.

**Mots clé :** Manioc, Amidon, Hydrolyse enzymatique, Fermentation, Distillation et alcool

### ABSTRACT

The dry cassava tuber is used as raw material for the production of bioethanol. Cassava has a high starch content of 83-88%. It thus has a source of starch for the manufacture of sweet raw material and for the production of alcohol. For this, the first transformation consists in the production of cassava flour. The flour obtained containing starch is mixed with water of concentration 100 g / 1 (weight / volume) gelled at 60 ° C for 60 minutes. The well-gelled flour is hydrolysed by the enzyme hydrolyzate (invertase) to obtain fermentable sugar. The concentration of reducing sugars obtained at the end of enzymatic hydrolysis carried out in the laboratory: 117.71g / 1 for the case of cassava-free powder, with a yield of 85.99%. As well as ; 61.97g / 1 for the case of cassava powder with bark, for a yield of 42.99%. The fermentable reducing sugar is fermented by the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* to produce alcohol mainly composed of ethanol. As a result, the broth obtained by the fermentation is distilled. The final product is ethanol with yields: 23.46% without bark and 19.69% with bark. Several parameters are optimized in order to obtain a high yield.

**Keys words :** Cassava, Amidon, enzymatic Hydrolyse, Fermentation, distillation, alcohol.

**RAPPORTEUR :** Pierre Hervé RAVELONANDRO, Professeur Titulaire.