

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie.
Département des Sciences Alimentaires.
Filière : Sciences Biologique.
Spécialité : Science Alimentaire.
Option : Bioprocédé et technologie alimentaire.



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Optimisation par le model Box-Behnken de la
production du bioéthanol à partir d'une variété de
datte algérienne à faible valeur marchande.**

Présenté par :

MOUSLI Mekhlouf

Soutenu le : **21 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M. MADANI K.	Professeur	President.
M. BOUKHALFA F.	MAA	Encadreur.
Mme. MEDOUNI S.	MAA	Examinatrice.

Année universitaire : 2016 / 2017.

Remerciement

*Je tiens à remercier tout d'abord mon promoteur, **Mr BOUKHALFA***

Farid, pour sa patience, et surtout pour sa confiance, ses remarques

et ses conseils, sa disponibilité et sa bienveillance.

Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.

*Je voudrais également remercier les membres du jury, **Mr MADANI***

*et **Mme MEDOUNI** pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour*

toutes leurs remarques et critiques, ainsi que le personnel et les

enseignants, je tiens aussi à remercier tous mes enseignants en signe

d'un profond respect.

*Aussi remercier **Mr RAMDANI** responsable du laboratoire de*

pédologie, pour son aide si précieuse.

*A **Mr IDIR Azzedine** et **ZIANI Khodir** du laboratoire de physico-*

*chimique de la SARL, **BSA EL-KSEUR**, je vous remercie du fond du*

cœur.

Dédicaces

Je dédie À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre,

À cette source de tendresse, de patience et de générosité,

À ma mère.

A celui qui à veiller à ce que je ne manque de rien.

A celui qui m'as inculqué les valeurs de la vie

Et a fait de moi un homme

Mon père.

A ma petite sœur à qui je souhaite l'obtention de son bac.

A mes ami(e)s tout particulièrement Abdelhak, Bilel, Moumouh,

Chafia, Dehman, Yugo, Ya2, Yacine, Tarik, Lamia, Sabrina,

Fariza, Yasmine, Nabila.

Et la plus chère à mes yeux Célia.

Je m'excuse pour ceux que j'aurais pu oublier mais vous êtes a jamais

gravé dans ma mémoire.

Liste des tableaux.

Tableau I : Propriétés physiques de l'éthanol.	6
Tableau II : Niveau des paramètres choisis.	20
Tableau III : Modèle du plan expérimental.	21
Tableau IV : caractère biochimique de la souche isolée.	24
Tableau V : composition physico-chimique de la datte.	25
Tableau VI : Optimisation des conditions de production de Bioéthanol par le plan Box- Behnken (BBD).	31
Tableaux VII : l'étude de la variance du modèle et le manque d'ajustement.	33
Tableau VIII : les coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.	34
Tableau IX : Solution proposé par le logiciel JMP.	36

Liste des figures.

Figure n°1 : coupe horizontale d'une datte.	4
Figure n°2 : Image tridimensionnelle d'une molécule d'alcool éthylique.	5
Figure n°3 : Procédés de fabrication du bioéthanol selon la source de sucre utilisé.	7
Figure n°4 : Illustration du plan Box-Behnken pour trois facteurs.	10
Figure n°5 : Photographie de fruits de la variété <i>Mech-Degla</i> .	12
Figure n°6 : Photographie de boîte pétrie de souches levurienne isolée sur milieu SABOURAUD (30°C/5 jours).	23
Figure n°7 : Effet du temps d'incubation sur la fermentation.	29
Figure n°8 : Effet de la vitesse d'agitation sur la fermentation.	29
Figure n°9 : Effets du temps d'incubation sur la production des protéines.	30
Figure n°10 : Plan de prédiction réelle de production d'éthanol.	30
Figure n°12 : Surface de réponse pour l'interaction Température-pH.	33
Figure n°13 : Surface de réponse pour l'interaction Concentration-pH.	35
Figure n°14 : Surface de réponse pour l'interaction Concentration-Température.	36

Liste des abréviations

Ppm : poids par million.

g/mol : grame /mol.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

H₂O : Eau.

NH₃ : Ammoniaque.

BBD: Box-Behnken Desing.

µm: micro mole.

PDA: potato dextrose agar.

YPG: yaste potato glucose.

DNS : Acide 3,5-dinitrosalicylique.

tr/min : tour minute.

MRS : méthodologie de réponse de surface.

KNO₃ : Nitrate de potassium.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Liste des abréviations.

Table des matières

Partie bibliographique.

Introduction.	1
I. Généralité.	3
I.1. Palmier dattier.	3
I.1.1 Généralités sur le palmier dattier.	3
I.1.2. Répartition géographique du palmier dattier.	3
I.1.2.1. En Algérie.	3
I.1.2.2. Dans le monde.	3
I.1.3. Datte.	4
I.1.3.1. Description des dattes.	4
I.1.3.2. Production de la datte en Algérie.	4
I.1.3.3. Classification des dattes.	5
I.1.3.4. Transformation et valorisation des dattes.	5
I.2. Bioéthanol.	5
I.2.1 Origines et applications industrielles de l'éthanol.	6
I.2.2 Procédés de fabrication du bioéthanol.	7
I.2.2.1 Production de l'éthanol à partir de grains et de plantes amylacées.	7
I.2.2.2 Production de l'éthanol à partir de matière ligno-cellulosique.	7
I.3. Plans d'expériences.	8

I.3.1. Principe des plans d'expériences.	8
I.3.2. Terminologie.	9
I.3.3. Plans méthodologie des surfaces de réponse (MRS).	9
I.3.4. Plans Box-Behnken (BBD).	10
I.3.5. Quelques applications des plans Box-Behnken.	11

Partie pratique.

II. Matériel et méthodes.	12
II.1. Matériel végétale.	12
II.2. Souches microbiennes.	12
II.2.1. Technique d'isolement des levures.	13
II.2.2. Purification des souches de levure.	13
II.2.3. Identification des souches de levure.	13
II.2.4. Caractéristiques biochimiques.	14
II.2.4.1. Fermentation des sucres	14
II.2.4.2. Assimilation des sucres	14
II.2.4.3. Assimilation de source d'azote	14
II.3. Caractérisation physico-chimique de la datte.	15
II.3.1. Taux d'humidité.	15
II.3.2. Taux de matière sèche (MS).	15
II.3.3. Taux de cendres totales.	15
II.3.4. Potentiel d'hydrogène pH.	16
II.3.5. Acidité titrable.	16
II.3.6. Teneur en sucres totaux.	16

II.3.7. Teneur en sucres réducteurs.	17
II.3.8. Dosage de l'azote total.	17
II.3.9. Teneur en protéines.	18
II.4. Conduite de la fermentation.	18
II.4.1. Etude préliminaire.	18
II.4.2. Optimisation des paramètres de production du bioéthanol par le plan d'expérience Box-Behnken.	19
II.4.2.1. Choix de la température.	19
II.4.2.2. Choix du Ph.	19
II.4.2.3. Choix de la concentration en substrat	19
II.4.2.4. Milieu de fermentation	20
II.4.2.5. Application de Box-Behnken.	20
II.4.2.6. Viabilité cellulaire.	21
II.4.2.7 Dosage de l'éthanol.	22

Résultats et discussions.

III. Résultats et discussions.	23
III.1. Isolement des souches levuriennes.	23
III.1.1. Caractères de la production végétative.	23
III.1.2. Caractères biochimiques de la souche isolée.	24
III.2. Caractérisation physico-chimique de la poudre de datte <i>Mech-degla</i> .	25
III.2.1. Potentiel d'hydrogène pH.	26
III.2.2. Taux d'humidité.	26
III.2.3. Taux de matière sèche.	26
III.2.4. Teneur en cendre	26

III.2.5. Acidité titrable.	27
III.2.6. Azote total.	27
III.2.7. Sucres totaux.	27
III.2.8. Sucres réducteurs.	28
III.2.9. Saccharose.	28
III.2.10. Protéines.	28
III.3. Optimisation des paramètres de production d'éthanol.	29
III.3.1. Essais préliminaires.	29
III.3.2. Plan d'expérience.	31
III.3.2.1. Validation du model.	32
III.3.2.2. Coefficient de corrélation.	32
III.3.2.3. Model globale et manque d'ajustement.	33
III.3.2.4. Effet des facteurs.	34
III.3.2.5. Effet linéaire.	34
III.3.2.6. Effet quadratique.	34
III.3.2.7. Effet d'interaction.	35
III.3.2.8. Modèle mathématique.	36
III.3.2.9. Paramètres optimaux.	37
IV. Conclusion.	38
Références bibliographiques.	
Annexes.	

Introduction

Introduction

L'énergie produite et consommée est un élément crucial dans le développement d'une nation. L'industrialisation et la population mondiale augmentent d'année en année entraînant ainsi une hausse de la demande en énergie notamment l'énergie fossile. Aujourd'hui, la prise de conscience du réchauffement climatique, l'incertitude quant aux réserves de pétrole dans le monde et la fluctuation de son prix sur le marché international, ont conduit au développement des énergies renouvelables. Le bioéthanol est une alternative très attractive aux énergies conventionnelles. En effet, le bioéthanol est considéré comme la source d'énergie renouvelable la plus importante qui pourrait bien remplacer l'énergie fossile.

La production du bioéthanol dans le monde a fortement augmenté depuis la crise du pétrole en 1970. Son marché a augmenté de moins d'un milliard de litre en 1975 à plus de 39 milliard de litres en 2006 **Licht and Agra (2007)** et les prévisions annoncées que la barre des 150 milliards de litres pourrait être franchie dans l'horizon 2019/2020. Cependant, de faibles coûts de production sont essentiels pour que le bioéthanol soit plus compétitif.

L'éthanol peut être produit par la fermentation de plusieurs substrats, tels que la lignocellulose, la betterave sucrière, la canne à sucre... etc.) **Timilsina and Shrestha (2011)**. Ces substrats sont généralement de faible valeur marchande et proviennent dans la plupart des cas du recyclage, ils représentent donc une matière première en quantité suffisante et abordable. Parmi ces différents substrats, nous retrouvons la datte qui pourrait constituer un substrat de choix.

Le palmier dattier est une espèce thermophile de régions tropicales chaudes et humides, il est cultivé dans les régions à forte luminosité et donne des fruits appelés dattes (**Munier (1973)**).

La production mondiale des dattes est d'environ 7 millions de tonnes par année et a plus que doublé depuis les années 1980. Cela place la datte au 5^{ème} rang des fruits les plus produits dans les régions arides et semi-arides. D'après la F.A.O, la production mondiale de dattes est estimée à 7,62 millions de tonnes en 2010 **Fao and Isric (2010)**.

L'Algérie est un des plus importants pays producteurs de dattes avec prévisions des rendements et de la production de la datte pour la campagne 2016/2017 qui révèlent que Biskra

restera en tête avec 4,350,000 quintaux, Ouargla 1,498,898 quintaux et El-Oued avec 2,624,400 quintaux de dattes pour la saison 2016/2017.

Les dattes telles que la variété *mech-degla* présente une importance économique indéniable **Bounaga and Brac de la Perriere (1988)**, ces dattes sèches renferment un concentré de sucre et de nutriment important. Cependant, un surplus de production de cette variété pose problème, en effet dans la plupart des cas la datte n'est pas commercialisé, et elle est souvent redirigé vers l'alimentation du bétail.

Le présent travail vise à valoriser la datte *mech-degla* qui souvent est mal exploité, en effet sa composition riche en sucres fermentescible la place comme substrat de choix pour une fermentation alcoolique et la production du bioéthanol, et cela en utilisant la méthodologie de réponse de surface (MRS) du plan Box-Behnken dans l'optique d'optimiser la production du bioéthanol et ainsi œuvrer à rendre le bioéthanol plus compétitif.

Le travail est présenté selon le plan suivant et qui comprend, une première partie relative à une étude bibliographique, une deuxième partie exposant le matériel et les méthodes d'analyse et statistique, et pour finir une troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus ainsi que leur analyse et discussion.

Partie théorique

I. Généralité

I.1.1 Généralités sur le palmier dattier

Le palmier dattier était dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1934. Nom qui provient du mot *Phoenix* qui signifie dattier chez les phéniciens, et *dactylifera*, du terme grec *dactulos* signifiant doigt, allusion faite à la forme du fruit **Djerbi (1994)**. *Phoenix dactylifera* est une espèce dioïque, monocotylédone, appartenant à la famille des Palmaceae, et à la sous-famille des Coryphineae. La famille des Palmaceae compte environ 235 genres et 4000 espèces **Munier (1973)**. Le palmier est une composante essentielle de l'écosystème oasien **Toutain et al. (1990)**, grâce à sa remarquable adaptation aux conditions climatiques, la haute valeur nutritive de ses fruits, les multiples utilisations de ses produits, **Bousdira et al. (2003)**; **Bekkaye (2006)** et sa morphologie favorisant d'autres cultures sous-jacentes **Elhoumaizi et al. (2002)**.

I.1.2. Répartition géographique du palmier dattier

I.1.2.1. En Algérie

Le palmier dattier en Algérie est établi en plusieurs oasis réparties sur le sud de pays où le climat est chaud et sec (saharien). Sa culture s'étend depuis la frontière marocaine jusqu'à la frontière tuniso-libyenne, et depuis l'atlas saharien jusqu'à Reggane à l'Ouest, Tamanrasset au centre et Djanet à l'Est, **Bougandoura et Bendimerad (2013)**. Les principales régions phoénicoles sont :

- **A l'Est** : les Zibans (Biskra), Oued Righ (entre Ouargla et Touggourt), Oued Souf, la cuvette de Ouargla et le M'zab (Ghardaia). Ces palmerais sont constitués principalement de Deglet-Nour, cultivar à très haute valeur commerciale.
- **A l'ouest** : la Saoura (Beni Abess), le Touat (Adrar), le Gourara (Timimoun), Le Tidikelt (Reggane) et le Golea. Ces palmeraies comportent un verger très diversifié. Ces cultivars produisent des dattes de qualité commerciale très faible **Hannachi et al. (1998)**.

I.1.2.2. Dans le monde

Le palmier dattier est cultivé dans les zones arides et semi-arides chaudes d'Asie et d'Afrique mais aussi en Australie où il a été introduit au 18^{ème} siècle et dans certaines régions méditerranéennes d'Europe. C'est le cas notamment de l'Espagne qui reste le seul pays européen à produire des dattes dans la célèbre palmeraie d'Elche située à l'Ouest d'Alicante **Toutain (1996)**.

Aux Etats Unis d'Amérique, où les principaux centres de production sont situés en Californie, en Arizona et au Texas, le palmier fut introduit au 18^{ème} siècle mais sa culture débute réellement vers les années 1900 **Bouguedoura (1991) ; Matallah (2004)**.

I.1.3. La Datte

I.1.3.1. Description des dattes

La datte fruit du palmier dattier est une baie, de forme généralement allongée dans la plupart du temps, mais le fruit peut avoir différents formes et couleurs, selon les espèces. Elle est composée de trois tissus, une enveloppe fine cellulosique appelée peau ou épicarpe, une couche plus ou moins charnu et de consistance variable nommée le mésocarpe qui présente une zone périphérique de couleur plus soutenue et de texture compacte, suivie d'une zone interne de teinte plus claire et de texture fibreuse, l'endocarpe.

Le péricarpe, le mésocarpe et l'endocarpe sont confondus par les conditions sous l'appellation chair ou pulpe (Figure1) **Munier (1973)**.

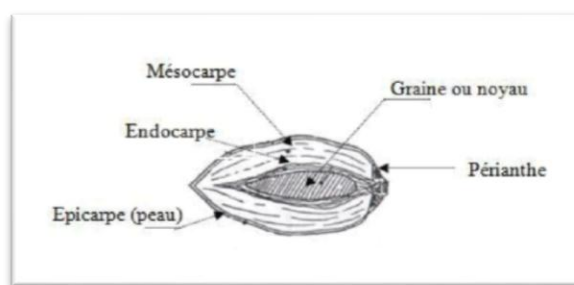


Figure n° 1: coupe horizontale d'une datte **Munier (1973)**.

I.1.3.2. Production de la datte en Algérie

L'Algérie est un des plus importants pays producteurs de dattes avec prévisions des rendements et de la production de la datte pour la campagne 2016/2017 qui révèlent que Biskra restera en tête avec 4,350,000 quintaux, Ouargla 1,498,898 quintaux et El-Oued avec 2,624,400 quintaux 2016/2017 de dattes, dont la variété *Deglet-Nour* la plus appréciée par les consommateurs représentant 50% de cette production selon l'observatoire nationale des filières agricoles et agro-alimentaires (**OFNAA**).

Plusieurs variétés de dattiers estimées à environ 200 existent en Algérie. Les cultivars sont le fruit de la sélection paysanne, ils sont qualifiés de "variétés locales". Plusieurs cultivars, font la fierté de nos palmeraies, *Deglet-Nour* pour sa haute qualité et son appréciation à travers le monde, *Bent-Qbala* donnant des dattes de qualité exceptionnelle dans le Mzab **Hannachi et al. (1998)**.

I.1.3.3. Classification des dattes

Les dattes sont les fruits du *Phoenix dactylifera* L. Les différentes classes de dattes qui existent, reposent sur leur qualité commerciale et leur consistance. Les importateurs (européens) de dattes répartissent celles-ci en deux catégories selon des critères très arbitraires

- Les dattes fines ou exportables dont le type *Deglet-Nour*.
- Les dattes communes, qui sont en général de faible valeur marchande et très difficiles à conserver.

Du point de vue biochimique, selon **Munier (1973)**, la consistance de la datte est variable et cette caractéristique, les réparties en trois catégories à savoir les dattes molles, demis molles et sèches.

I.1.3.4. Transformation et valorisation des dattes

Les dattes abîmées et de faible valeur marchande peuvent être utilisées en raison de leur forte teneur en sucre pour diverses productions, à savoir la production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (POU) **Bessah et Touzi (2001)**, la production d'alcool éthylique, la production de vinaigre par une double fermentation alcoolique puis acétique, **Boughnou (1988)** ; **Mehaia et Cheryan (1991)** ; **OULD (2001)**, et la production d'acide citrique, par *Aspergillus Niger* du sirop de datte **Roukas et Kotzekidou (1997)**.

Par contre, le jus de la datte est utilisé comme source de carbone pour la production de la vitamine B12 par *Streptomyces albidoflavus* et *Streptomyces antibioticus*.

I.2. Bioéthanol

L'éthanol, l'alcool ou encore l'alcool éthylique sont toutes les trois des appellations qui désignent la même molécule qui est composée de deux atomes de carbone (C), six atomes d'hydrogène (H) et d'un atome d'oxygène (O). Les formules brutes et semi-développées de la molécule d'éthanol sont respectivement le C_2H_6O , le C_2H_5OH et le CH_3-CH_2-OH (Figure 2).

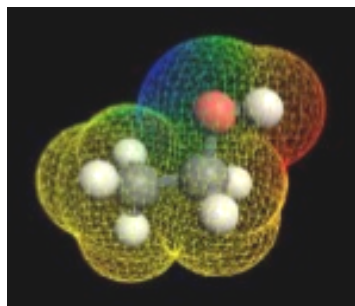


Figure n° 2: Image tridimensionnelle d'une molécule d'alcool éthylique **Kacimi (2008)**.

Ce composé est obtenu à partir d'un processus de fermentation anaérobie des sucres naturels, généralement retrouvés dans les produits biologiques, suivi d'une distillation, sous l'action des levures pour la fabrication notamment de boissons alcoolisées tel que le vin ou encore la bière.

C'est à partir du 19^{ème} siècle que le mot « alcool » a commencé à faire référence uniquement à des composés chimiques ayant des caractéristiques communes, soit des oxydes d'alcanes ayant subi une substitution de l'atome d'hydrogène par un groupement hydroxyle (OH) au niveau d'un atome de carbone (C).

En ce qui concerne ses propriétés physiques, l'alcool éthylique est un composé incolore, volatil, hygroscopique, miscible à l'eau et aux autres l'alcools, **Kacimi (2008)**. Reconnu pour ses qualités de solvant pour les graisses et les matières plastiques, **Kacimi (2008)**, son odeur est détectable à des concentrations variant entre 10 et 350 ppm. Les principaux caractères de l'éthanol.

Tableau I : Propriétés physiques de l'éthanol, **Kacimi (2008)**.

Masse molaire	Point de fusion	Point d'ébullition	Densité	Densité vapeur
46,7 g/mol	-114 C°	78.5 C°	0.789	1.59

L'éthanol est un composé chimiquement stable. Il possède toutes les propriétés qui caractérisent les alcools notamment une réaction d'oxydation lorsqu'il est maintenu à l'air libre pour former de l'acide acétique. Par contre, dans des conditions d'oxydation extrême, il se transforme en dioxyde de carbone (CO₂) et en eau (H₂O).

I.2.1 Origines et applications industrielles de l'éthanol

L'étymologie du mot « alcool » viendrait du mot arabe « al-Kohl » qui désignait à l'origine une poudre très fine de stibine (SbH₃) connue sous l'appellation de sulfure d'antimoine qui est un gaz toxique incolore caractérisé par une odeur identique à celle de l'ammoniac (NH₃), **Kacimi (2008)**.

Aujourd'hui, les applications industrielles utilisant l'éthanol sont nombreuses. Au-delà du fait que l'éthanol serve à l'éclairage et au chauffage, il constitue le principe actif de base des boissons alcoolisées, et entre dans la synthèse de produits chimiques tels que les peintures, les vernis, les encres, les matières plastiques, les adhésifs, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques, **Kacimi (2008)**. L'éthanol est également utilisé comme matière première pour la synthèse de solutions d'insecticides. En pharmacologie, il est utilisé pour ses propriétés de désinfectant et d'agent antiseptique, **Kacimi (2008)**.

I.2.2 Procédés de fabrication de bioéthanol

La production de bioéthanol passe par une fermentation anaérobie des sucres suivie d'une distillation. Bien que ces deux étapes soient communes aux différentes filières, les procédés de fabrication diffèrent selon le type de biomasse. Par opposition aux molécules les plus fermentescibles, les sucres aux structures complexes requièrent des traitements préalables avant de pouvoir se rendre disponibles pour subir une fermentation. Le procédé de fabrication de bioéthanol diffère selon la source de sucre utilisé (figure n°3) **Moshkelani et al. (2013)**.

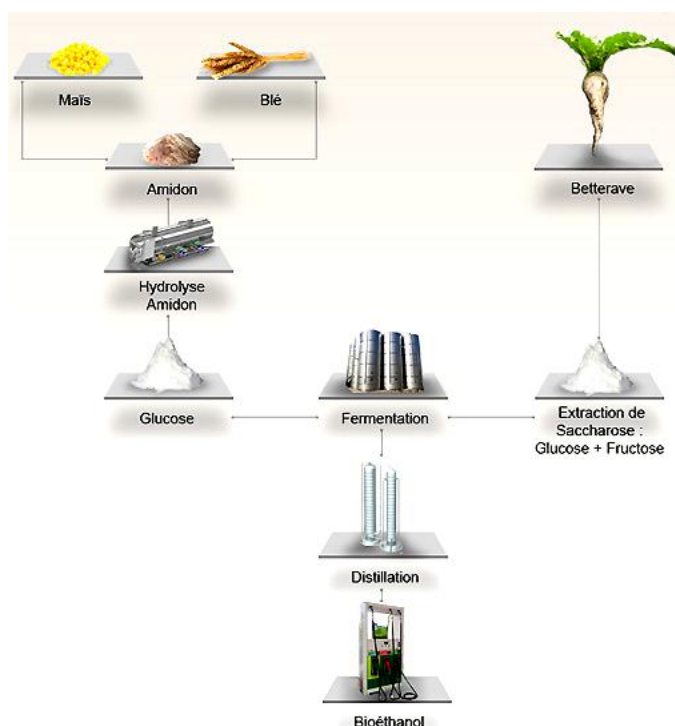


Figure n°3 : Procédés de fabrication du bioéthanol selon la source de sucre utilisé.

I.2.2.1 Production de l'éthanol à partir de grains et de plantes amylacées

En ce qui concerne les plantes amylacées notamment la betterave et la canne à sucre, les molécules simples de glucose et de saccharose sont extraites par simple diffusion, **ADEME (2004)**. Le jus de betterave et de canne à sucre fermenté passe par une simple distillation pour obtenir de du bioéthanol, **CNUCED (2007)**.

I.2.2.2 Production de l'éthanol à partir de matière ligno-cellulosique

La ligno-cellulose est une matière première qui fait appel à des procédés de fabrication différents compte tenu de la structure des molécules qui la composent, **Moshkelani et al. (2013)**. La biomasse ligno-cellulosique forme une matrice rigide difficile à déstructurer,

Ballerini et al. (2006). Au niveau moléculaire, cette matrice comporte des fractions cellulosiques et hémi cellulosiques, qui sont des sources potentielles de sucre, associées à une fraction de lignine qui par contre ne peut donner d'éthanol par fermentation, **Ogler et al. (1999)**.

À l'heure actuelle, des efforts considérables sont fournis en matière de recherche, en particulier aux États-Unis et en Europe, pour améliorer les procédés de fabrication de manière à rendre plus compétitif la filière ligno-cellulosique, **Ballerini et al. (2006)**.

I.3. Les plans d'expériences

Pour des raisons de coût, de nombreux phénomènes scientifiques sont étudiés, non plus via l'expérimentation physique, mais à l'aide de modèles numériques. Les premiers scientifiques qui se sont intéressés au problème de l'organisation des essais sont des agronomes. Ils avaient en effet beaucoup de paramètres à étudier et ne disposaient pas de moyens adéquats leur permettant de multiplier le nombre d'expérience afin de pouvoir surmonter cette contrainte à laquelle font face de nombreux chercheurs.

En 1925, Fischer mit au point une méthode avec laquelle plusieurs facteurs pouvaient être étudiés à la fois. Celle-ci fut rapidement reprise puis développée par les mathématiciens et les statisticiens. Ces derniers ont en effet mis au point des méthodes permettant de réduire considérablement le nombre d'expériences à effectuer sans diminuer la pertinence de ces dernières.

En effet, les progrès de ces dernières années concernant la modélisation mathématique de ces phénomènes ainsi que leur traitement numérique, permettent une étude extrêmement réaliste des phénomènes en question. De nombreux exemples peuvent être rapportés tel que l'étude de la production de pétrole brut en industrie pétrolière, **Dejean et Blanc (1999)** ; **Jourdan et Zabalza-Mezghani (2004)**, ou de la performance de circuits intégrés, **Welch et Luostarinen (1988)**, ou encore la propagation d'un feu en milieu fermé, **Santner et al. (2013)**.

I.3.1. Principe des plans d'expériences

Le principe repose sur la variation simultanée des niveaux d'un ou plusieurs facteurs, à chaque essaie. Ceci diminue considérablement le nombre d'expérience à réaliser mais surtout augmenter sensiblement le nombre de paramètres à étudier. Les interactions entre les facteurs et les optimaux génèrent des réponses, ces interactions sont étudiées et puis interprétées, **Faucher (2006)**.

Il existe différents types de plans d'expérience, qui peuvent être cependant regroupé en grande familles: les plans factoriels complets ou fractionnaires à deux niveaux , les plans

factoriels à plus de deux niveaux , les plans en bloc complet ou incomplet, les plans de surface de réponse, les plans de mélange et les plans optimaux **Gervais et Chagnon (2010)**.

Cette diversification permet de résoudre certains problèmes particuliers et permettent également à l'expérimentateur de choisir le modèle le plus approprié à son étude. Ainsi, à travers les besoins du chercheur, deux grandes catégories de plans peuvent être distinguées :

- Les plans pour étudier les effets des paramètres.
- Des plans pour régler les paramètres affins d'atteindre un optimum.

I.3.2. Terminologie

Réponse : grandeur physique étudiée, **Vivier (2002)**.

Facteur : variables pouvant modifier la réponse, **Goupy (2012)**.

Niveau d'un facteur : valeur d'un facteur, **Goupy (2012)**.

Domaine d'étude : niveau inférieurs, centré et haut des facteurs étudiés, **Tinsson (2010)**.

Plan d'expérimentation : ensemble des conditions expérimentales, imposées aux variables dans le cadre du plan choisi **Tinsson (2010)**.

Matrice d'expériences : niveau pris par les différentes variables codées aux différents niveaux **Tinsson (2010)**.

I.3.3. Plans méthodologie des surfaces de réponse (MRS)

La méthode des surfaces de réponse (MRS) est une technique d'analyse statistique puissante, adaptée à la modélisation de processus complexe ou la réponse peut être influencé par plusieurs variables, cette technique est utilisée dans le but d'optimiser cette réponse. Box et Wilson ont introduit pour la première fois la théorie des MRS en 1951, celle-ci représente aujourd'hui la méthode la plus couramment utilisée pour l'optimisation des processus, **Box et Wilson (1951)**.

Les MRS sont utilisés pour la modélisation et la prédiction de l'effet des différents paramètres expérimentaux sur une réponse bien définie ainsi que sur l'identification des interactions entre les paramètres expérimentaux, que d'autres techniques ont tendance à négliger. La MSR est largement employée dans le domaine de l'ingénierie et de la fabrication où de nombreux paramètres y sont impliqués, **Elsayed et Lacor (2011)**.

Il existe différents types de plans concernant ce modèle, les plus connus sont les plans « composites centrés », les plans « Box-Behnken », les plans de « Doehlert », et les plans « hybrides ». **Goupy (2006)**.

La méthode surface de réponse utilise un modèle mathématique de second degré **Raissi et Farsani (2009)**. :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Où :

Y : est la réponse.

X_i, X_j : sont les variables.

β₀, β_i, β_{ij}, β_{ii} : sont les coefficients du polynôme.

ε : est l'erreur.

I.3.4. Les plans box-Behnken (BBD)

Les plans box-Behnken (BBD) sont des structures symétriques où chacun des facteurs prend trois niveaux. Ils sont le résultat de la combinaison de plans factoriels à deux niveaux avec des blocs incomplets équilibrés suivant un arrangement particulier avec plusieurs essais au centre du domaine expérimental **Pierlot et al. (2008)**.

Les points expérimentaux sont placés au milieu des arêtes du cube. Cette disposition a pour conséquence de placer les points expérimentaux à distance égale du centre du domaine d'étude, sur une sphère.

Un cube possède douze (12) arêtes, chaque arête représente un essai signifiant qu'il est possible d'avoir douze (12) essais, auxquels peuvent être ajoutés trois points au centre du domaine d'étude suivant les conseils de Box et Behnken, les points situés au centre d'une arête prennent pour coordonnées (0, 0,0). (Figure n°4).

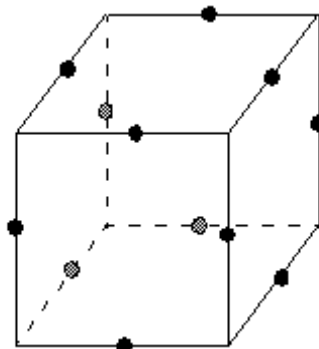


Figure n°4: Illustration du plan Box-Behnken pour trois facteurs **Goupy et Creighton (2009)**.

I.3.5 Quelques applications des plans Box-Behnken

- Etude de l'impact des facteurs climatiques sur la diffusion du E- β -caryophyllène à partir de billes d'alginate : Frédéric Daems et ses collègues L'impact des trois facteurs climatiques sur la diffusion de l'E- β -caryophyllène à partir de billes d'alginate a été évalué en utilisant un plan d'expérience de type Box-Behnken, **Daems et al. (2016)**.
- Optimiser une méthode de quantification de phyto-œstrogènes dans les fourrages : Frédéric Daems et ses collègues ont optimisé optimiser une méthode de quantification de phyto-œstrogènes dans les fourrages en utilisant le plan Box-Behnken, **Daems et al. (2015)**.
- Application du test de robustesse pour l'évaluation de l'incertitude de mesure au terme de phase de développement d'une méthode chromatographique de quantification de cinq vitamines hydrosolubles, **Ihssane et al. (2016)**.

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

L'essai d'optimisation de production de l'éthanol par voie fermentaire est effectué en utilisant une variété de datte provenant des palmeraies de la région sud-est de l'Algérie. C'est la variété *Mech-Degla*, caractérisée par sa forme plus ou moins allongée, sa couleur jaune orangée et sa texture sèche voir dure (Figure 5).



Figure 5: Photographie de fruits de la variété *Mech-Degla*.

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

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

II.2. Souches microbiennes

La souche choisie pour la production de l'éthanol à partir de la poudre de datte de la variété *Mech-Degla*, est isolée à partir du sol. Les échantillons du sol utilisés pour cet objectif proviennent de la région Sidi Aich (Bejaïa).

Chaque échantillon prélevé est déposé sur une feuille d'aluminium stérile et enveloppé dans un sac en papier; ensuite transporté au laboratoire dans une glacière pour être utilisé dans les 24 heures **Rodriguez-Zaragoza (2005)**.

II.2.1. Technique d'isolement des levures

L'analyse microbiologique comporte la recherche des souches levuriennes issues des échantillons de sol récoltés qui contiennent également des bactéries et parfois des moisissures. L'isolement des levures en vue de leur identification peut donc demander l'emploi de milieux sélectifs dotés des propriétés générales telles que la résistance aux antibiotiques à large spectre. La solution mère est préparée en mélangeant 25g de sol avec de l'eau physiologique. L'ensemble est laissé sous agitation, avant qu'il soit filtré pour récupérer le filtrat qui représentera la solution mère. Cette dernière servira de base pour la préparation de solution décimale dilutions de 10^{-1} jusqu'à 10^{-8} .

La technique d'isolement consiste à ensemercer chaque dilution en surface à l'aide d'un écouvillon sur les deux milieux gélosés à savoir la gélose nutritive et PDA. Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées dans une étuve à 30°C pendant 5 jours.

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

II.2.2. Purification des souches de levure

Pour assurer la purification des souches, des isollements successifs sur le milieu SABOURAUD sont effectués. Des colonies sont repiquées par strie sur la gélose de SABOURAUD contenue dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont ensuite maintenues à une température de 30 C° pendant 5 jours.

II.2.3. Identification des souches de levure

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

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

II.2.3.1. Caractéristiques culturelles

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

II.2.3.2. Caractéristiques morphologiques

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

II.2.4 Caractéristiques biochimiques

II.2.4.1. Fermentation des sucres

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

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

II.2.4.2. Assimilation des sucres

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

Nous versons dans une boîte de Pétri, 2 ml de suspension de levure dans de l'eau de levure puis couler un tube à essais de milieu minéral synthétique fondu et ramener à 40 °C, puis mélanger. Les tubes sont incubés dans une étuve à 25 °C jusqu'à ce que la surface du milieu soit sèche. Les composés carbonés à tester (glucose, saccharose, lactose, maltose, galactose) sont enfin déposer en différents points.

II.2.4.3. Assimilation de source d'azote

Après ensemencement de la boîte de Pétri par 1 ml de suspension de levure et solidification du milieu de culture, il est déposé en différents points des traces de nitrate de potassium (KNO₃). Les boîtes sont incubées à 30°C. L'apparition de zone de croissance confirme l'assimilation de l'azote.

II.3. Caractérisation physico-chimique de la datte

Les analyses physico-chimiques sont effectuées sur la poudre de datte obtenue après séchage et broyage du fruit. Les dattes sont lavées et débarrassées de leurs graines puis séchées dans une étuve ventilée à une température de 40°C pendant 15 jours.

II.3.1. Taux d'humidité

La teneur en eau dans la poudre de datte est évaluée selon la méthode décrite par Doymaz (2006). Une prise d'essai de 3g de la poudre est séchée dans une étuve ventilée à une température de 103°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) jusqu'à un poids constant. L'humidité est alors calculée selon la formule suivante :

$$H \% = \frac{P_f - P_s}{P_f - P_0} \times 100$$

Où :

H % : Taux d'humidité.

P_f : poids du creuset contenant l'échantillon, avant étuvage.

P_s : poids du creuset contenant l'échantillon, après étuvage.

P_0 : poids du creuset vide.

II.3.2. Taux de matière sèche (MS)

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

$$MS \% = 100 - \% \text{ Humidité}$$

II.3.3. Taux de cendres totales

Le taux des cendres est évalué selon la méthode décrite par Leterme et al. (2005). Une prise d'essai de 3g de la poudre est incinérée dans un four à moufle pendant 5h à 600° C. Le taux de cendre est calculé par la formule suivante :

$$\text{Teneur en cendre} = \frac{P_{ce} - P_c}{P}$$

Où :

P_{ce} : Poids des creusets avec l'échantillon.

P_c : Poids des creusets vide.

P : prise d'essai.

II.3.4. Potentiel d'hydrogène pH

Le potentiel hydrogène de la poudre est évalué à l'aide d'un pH mètre (HANNA) selon la méthode décrite par **AFNOR (1986)**. Une prise d'essai de 1g est dissoute dans un volume de 50 ml d'eau distillée, l'ensemble est laissé sous agitation pendant 30 minutes. Une fois filtré, la mesure est réalisée en trois répétitions.

II.3.5. Acidité titrable

La mesure de l'acidité est réalisée selon la méthode décrite par **Verma et Joshi (2000)**. Une prise d'essai de la poudre est mélangée avec de l'eau distillée, l'ensemble est mis sous reflux réfrigérant pendant 30 minutes avant d'être filtré. Le titrage est réalisé à température ambiante avec une solution de NaOH à 0.1N sous agitation après avoir ajouté de la phénolphthaléine qui est un indicateur coloré. Le titrage est arrêté lors de l'apparition d'un virage de couleur.

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

$$\text{Acidité (g/100)} = \frac{N_b \times V_b \times M}{V_a \times P}$$

Où:

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

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

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

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

P : Nombre de protons (égale à = 3).

II.3.6. Teneur en sucres totaux

La teneur en sucres totaux est déterminée par la méthode de **DuBois et al. (1956)**. Une prise d'essai de 1g de la poudre est mélangée avec 50ml d'eau distillé et laissée sous une agitation pendant 45 minutes à température ambiante. Une fois filtrée, un volume de 2 ml de sels CAREZ I et CAREZ II est additionné au mélange, qui sera ainsi laissé décanter pendant 30 minutes. Une filtration est réalisée afin de récupérer le filtrat.

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

Les résultats sont exprimés selon une courbe d'étalonnage réalisée avec une solution glucose, (BRUDIEUX, 2007).

II.3.7. Teneur en sucres réducteurs

Le dosage des sucres réducteurs est réalisé selon la méthode décrite par **Miller (1959)**. Une prise d'essai de 1g de la poudre est mélangée avec 50 ml d'eau distillé. Le mélange agité pendant 45 min à température ambiante est filtré.

Un volume 200µl est alors additionné de 300 µl du réactif DNS, et subi un chauffage au un bain marie à 100°C pendant 5 minutes. Après chauffage, 1.5 ml d'eau distillé, est ajouté au mélange qui sera laissé à l'abri de la lumière pendant 15 min, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, la teneur en sucres réducteurs dans la poudre est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant le glucose.

II.3.8. Teneur Saccharose

La teneur en saccharose est obtenue par la différence entre la teneur en sucres totaux et les sucres réducteurs présents dans l'échantillon, **EL HADJ et al. (2012)**.

$$\text{Saccharose \%} = [\text{sucres totaux \%} - \text{sucres réducteurs \%}] \times 0,95$$

II.3.9. Dosage de l'azote total

L'azote total est dosé après minéralisation par volumétrie selon la méthode de **Kjeldahl (1883)**. Une prise d'essai de 10 mg de la poudre de datte (PD) est introduite dans un matras de minéralisation, auquel une pincé du catalyseur (sulfate de cuivre et sulfate de potassium) est ajoutée. À ce mélange 20 ml d'acide sulfurique concentré est ajouté. L'ensemble est chauffé à froid pendant 15 min jusqu'à apparition d'une vapeur blanche d'anhydride sulfurique. L'ensemble est alors laissé au chauffage à chaud pendant 4 à 5 heures.

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

Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré (le bleu de méthylène et le rouge de méthylène), et l'excès d'ammoniac est dosé avec l'acide sulfurique à 0.05N.

La teneur en azote est déterminée par la formule suivante :

$$N\% = 14 \times Na \times Va \times [d/V0]$$

Où :

N%: taux d'azote.

N_A: Normalité de l'acide.

V_A : Volume, en ml de l'acide versé.

V₀ : Volume en ml de la prise d'essai.

d : dilution de la fraction considéré.

II.3.10. Teneur en protéines

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

Une prise d'essai de 1g de la poudre est diluée dans 50 ml d'eau distillé. L'ensemble est agité pendant 30 minutes, avant d'être filtrée.

Un volume de 100 µl est additionné de 3 ml de bleu de Coomassie, et l'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un témoin.

II.4. Conduite de la fermentation

La production de bioéthanol dépend directement de la croissance et du développement de la levure. Cette croissance est influencée par les paramètres nutritifs et physico chimiques. Dans le but d'atteindre une production optimale une étude préliminaire est réalisée.

La fermentation submergée est réalisée dans des erlenmeyers inoculés par une charge de levures *S. cerevisiae*, et l'ensemble est incubé à 30°C sous une agitation de 150 tr/min, pendant 48h à 4 jours. Des prélèvements sont réalisés à différents temps et plusieurs dosages sont ainsi réalisés à savoir le dosage des protéines, le dosage des sucres totaux et réducteurs.

II.4.1. Etude préliminaire

Outre les paramètres à optimiser, deux autres paramètres influençant la fermentation alcoolique ont été fixés, une étude préliminaire a été réalisée afin de les fixer.

➤ Fixation du temps d'incubation

Le temps d'incubation est un paramètre influençant la fermentation et la production du bioéthanol GONZALEZ (2008), le choix du temps d'incubation est donc primordial.

Une série de fermentation étaient conduite dans des conditions identiques, un dosage des sucres totaux est réalisé à des temps différent, à savoir 24h, 48h, 72h, 96h et 120h.

➤ Fixation de la vitesse d'agitation

L'agitation a pour but d'assurer un transfert de masse entre les différentes phases du moule de fermentation à savoir le milieu de culture qui représente la phase liquide, les cellules qui forment la phase solide et pour finir la phase gazeuse impliquant les différents gaz générés au cours de la fermentation, **TAZDAIT et al. (2013)**.

Les fermentations ont été agitées à différentes vitesses à savoir : 50, 150, 250 tours par minutes.

II.4.3. Optimisation des paramètres de production du bioéthanol par le plan d'expérience

Box-Behnken

Le choix des paramètres à optimiser à savoir la température, le pH et la concentration en substrat est basé sur les résultats de plusieurs études entre autres celles de **Acourene et al. (2008)**; **Arroyo-López et al. (2009)** ; **Mehani et Bouchekima (2014)**.

II.4.3.1. Choix de la température

Selon plusieurs études, la température optimale pour la production de l'éthanol par la levure *Saccharomyces cerevisiae* est comprise entre 25°C à 45°C , **Jin et Speers (2000)** ; **Toriya et al. (2003)** ; **Lin et al. (2012)**; **Mamun et al. (2013)**; **Louhichi et al. (2013)** ; **Boudjema et al. (2015)**.

II.4.3.2. Choix du pH

La levure *Saccharomyces cerevisiae*, présente l'avantage de croître sur des milieux acides contrairement à la plupart des bactéries.

Dans cette étude, le pH est varié entre 4 et 5 pour éviter les contaminations bactériennes. Le choix de cet intervalle est justifié par les résultats de plusieurs études telles celles réalisées par **Adachi et al. (1998)**; **Lin et al. (2012)** ; **Tesfaw et Assefa (2014)** ; **Boudjema et al. (2015)**.

II.4.3.3. Choix de la concentration en substrat

La production de l'éthanol peut être affectée par la concentration du substrat, comme le démontre les travaux de **Lin et al. (2012)**, en effet de fortes concentrations en substrat offrent une meilleure production d'éthanol, cependant il faut noter qu'une longue période d'incubation est nécessaire pour des concentrations supérieures à 80g/l à une température de 30 C°.

II.4.3.4. Milieu de fermentation

La datte est connue par sa faible teneur en éléments nutritifs, essentiellement les protéines **Khan et al. (1995)**. Pour favoriser la multiplication des levures et une meilleure production du bioéthanol, le milieu a été enrichi par l'urée 50mg, Chlorure de zinc 8mg, **Birch et Walker (2000)**, le pH est ajusté avec le tampon citrate de sodium. Avec les paramètres d'optimisation, température (X1), taux de substrat (X2) et le pH (X3).

La fermentation des expériences d'optimisation ont été réalisées dans des flacons de 250 ml avec un volume de travail de 100 ml. Les autres conditions d'exploitation ont été maintenues à une agitation de 150 tr/min avec un temps d'incubation de 4 jours.

II.4.3.5. Application de Box-Behnken

Après choix des paramètres de fermentation, une étude de l'optimisation des conditions de fermentation est impérative, afin de définir les meilleures conditions de fermentation et de production de l'éthanol à partir de la datte variété *mech-degla*,

Pour ce faire nous avons utilisé la méthode de surface de réponse (RMS). Nous avons opté pour un modèle mathématique polynomial, dont le type de modèle choisi est le plan Box-Behnken **Goupy et Creighton (2006)**.

Trois facteurs (X₁, X₂, X₃) à trois niveaux (-1, 1 et +1) sont appliqués pour optimiser la production du bioéthanol, à savoir la concentration du substrat [s], la valeur du pH initiale et la température d'incubation désignée par X₁, X₂ et X₃, respectivement, les niveaux bas, centré et haut sont représentés dans le tableau II.

Tableau II : Niveau des paramètres choisis.

Niveau	X ₁ température en C°	X ₂ concentration du substrat [s] en gramme	X ₃ valeur du pH
Bas (-1)	25	6	4,0
Centré (0)	35	8	4,5
Haut +1	45	10	5,0

Notre plan Box-Behnken comprend 15 essais que le logiciel JMP v.10 nous a proposé, dont l'essai centré est répété trois fois pour vérifier l'erreur type de reproductibilité de

la production du bioéthanol. Notre modèle expérimental est représenté dans le tableau III, la réponse choisie pour l'évaluation est le taux du bioéthanol.

Tableau III : Modèle du plan expérimental.

Essai n°	Température d'incubation	Concentration du substrat	Valeur du pH
1	35	6	4
2	25	8	4
3	35	8	4,5
4	35	8	4,5
5	35	10	4
6	35	10	5
7	45	10	4,5
8	25	6	4,5
9	25	8	5
10	35	6	5
11	45	8	5
12	35	8	4,5
13	45	8	4
14	45	6	4,5
15	25	10	4,5

II.4.3.6. Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire de *S. cerevisiae* est déterminée par un comptage, après coloration au bleu de méthylène, sur hématimètre (cellule de Malassez) sous microscope ($G \times 100$) selon la méthode décrite par **système Tecator (2002)**.

La coloration au bleu de méthylène permet de séparer les cellules vivantes de cellules mortes. Ce colorant pénètre facilement dans la cellule qui est vite éliminé dans les cellules vivantes tandis qu'il persiste dans les cellules mortes.

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

Un volume de 100µl du moût de fermentation est prélevé auquel sont ajoutés le même volume de bleu de méthylène, de ce mélange une goutte est versée sur la cellule de Malassez, jusqu'à remplir la chambre de comptage. On laisse sédimenter le mélange pendant quelques minutes puis on procède au comptage.

On peut ainsi calculer le % de viabilité d'une suspension cellulaire : **système Tecator (2002), Kebab et al. (2008)**.

$$\text{Taux de viabilité cellulaire} = \frac{Nv}{Nt} \times 100$$

Où:

Nv : Nombre de cellules vivantes comptées.

Nt : Nombre de cellules totales comptées (vivantes + mortes).

III.4.3.7 Dosage de l'éthanol

La teneur en alcool peut être déterminée de plusieurs façons : par pycnomètre, aérométrie, ébulliométrie, méthode enzymatiques, CPG et dosage chimique. Actuellement il existe des méthodes rapides pour la détermination de la teneur en alcool, à l'aide d'instrument dédié à cet effet, ainsi dans notre étude le taux d'alcool a été déterminé à l'aide d'un appareillage appelé Fermento-Flash FUNKE GERBER Nayyar et al. (2014).

Résultat et discussion

III. Résultats et discussions

III.1 Isolement des souches levuriennes

L'isolement des levures à partir des échantillons du sol sur le milieu SABOURAUD et PDA a permis d'obtenir de nombreuses souches levuriennes celles-ci présentent des caractéristiques différentes (forme, couleur, texture...etc).

Dans le but d'isoler la souche *Saccharomyces cerevisiae*, des repiquages ont été effectués sur le milieu SABOURAUD.

Après incubation pendant 5 jours à 30°C, l'aspect macroscopique des colonies isolées est représenté dans la figure suivante :



Figure 6: Photographie de boîte pétrie de souches levuriennes isolées sur milieu SABOURAUD (30°C/5 jours).

Selon **Guiraud et Galzy (1980)**, une identification de la souche de levure repiquée sur le milieu SABOURAUD peut être faite en se basant sur les caractéristiques culturelles et morphologiques. L'observation macroscopique des cultures en milieu solide SABOURAUD a pu montrer les différents caractères de la souche, elles se présentent sous forme de colonies arrondies, sphériques, isolées, en chaînes et en amas, avec des tailles moyennes, une couleur crèmeuse, et une texture lisse, brillante et bombée.

III.1.1 Caractères de la production végétative

Afin d'étudier la reproduction végétative, une étude est réalisée à l'aide d'un test microscopique. L'observation à l'état frais sous microscope optique aux grossissements GX40, permet de définir la forme, l'arrangement et le mode de divisions des cellules ainsi que leur taille et le mode de reproduction **Guiraud et Galzy (1980)** ; **Bouix et Leveau (1993)**.

Ces observations montrent clairement que le mode de reproduction de ces isolats est réalisé par bourgeonnement.

L'observation microscopique d'un frottis sous le grossissement (GX100), permet de déterminer la forme sphérique et ovoïde. **Larpent (1991)**.

III.1.2. Caractères biochimiques de la souche isolée

Les résultats obtenus à partir de l'étude de la fermentation et l'assimilation des sucres ainsi que le test de l'assimilation de l'azote sont représentés dans le tableau suivant:

Tableau IV : Caractères biochimiques de la souche isolée.

Tests		Résultats
Fermentation des sucres	Glucose	+
	Galactose	+
	Maltose	+
	Raffinose	+
	Lactose	-
	Saccharose	+
Assimilation des sucres	Glucose	+
	Galactose	+
	Maltose	+
	Raffinose	+
	lactose	-
	Saccharose	+
Assimilation des composés azotés	nitrate	-

La lecture des résultats du test de fermentation des sucres révèle une production de gaz dans les tubes contenant du glucose, galactose, maltose, raffinose, et du saccharose. Notons cependant l'absence de gaz dans le tube contenant du lactose.

Ces résultats montrent que les tests sont tous positifs au test de fermentation des sucres sauf au test de fermentation du lactose.

La lecture des résultats du test d'assimilation des sucres montrent l'apparition de colonies dans les milieux contenant un seul sucre comme source de carbone, à savoir les boîtes contenant comme seule source de carbone le glucose, galactose, maltose, raffinose, et Saccharose, indiquant que le test est positif. À noter qu'aucune croissance n'a été observée au niveau des boîtes contenant le lactose comme seule source de carbone, indiquant également que le test est négatif.

La lecture des résultats du test d'assimilation de l'azote est négative. Aucune croissance microbienne n'a été observée sur les milieux contenant l'azote comme seule source de carbone.

Au vu de ces résultats, et en se référant aux travaux de **Bourgeois (1986)**, nous pouvons supposer que la souche isolée est un saccharomyce de type *cerevisia*. Par ailleurs **Scriban (1993)**, rapporte que le sol est l'habitat typique pour le genre de levure *Saccharomyces*.

III.2. Caractérisation physico-chimique de la poudre de datte *Mech-degla*

Les résultats obtenus quant à la caractérisation physico-chimique de la poudre de datte variété *Mech-degla*, sont rapportés dans le tableau :

Tableau V: Composition physico-chimique de la datte.

Composition	Valeur
Sucre g/100g	67,64 ± 4,75
Matière sèche (%)	87,17 ± 0,87
Acidité g/l	1,30
Cendres	1,97
Sucres réducteurs g/100g	13,42 ± 1,35
Protéines g/100g	0,36 ± 0,02
pH	5,8 ± 0,02
Azote g/100g	1,35 ± 0,15
Humidité (%)	12,83 ± 0,87

III.2.1. Potentiel d'hydrogène pH

Le potentiel d'hydrogène (pH) des dattes varie suivant les stades de développement de la datte **Dowson et Aten (1963)**. La valeur du pH à température égale à 22 C° de la datte *Mech-Degla* est de 5,8. Nous déduisons à partir de ces résultats que la variété *Mech-degla* est acide. Nos résultats sont en parfait accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs. **Dowson et Aten (1963)**, rapportent un pH de 5,5 ; **AMELLAL (2008)** et **OULD EL HADJ et al (2012)** rapportent un $\text{pH} = 5.05 \pm 0.013$. D'autres sources mentionnent des valeurs inférieures à celle que nous avons obtenues dans la présente étude. **Acourene et Ammouche (2012)**, rapporte en effet un pH de 4,5 pour la variété *Tantboucht*. Par ailleurs le pH de la variété *Mech-degla* est légèrement inférieur au pH mesuré par **Messaïd (2008)**, Pour la même variété de datte, cet auteur obtient un pH de 6,22.

Les dattes à pH acide présente un substrat défavorable pour la croissance des bactéries, mais peut être aussi favorable pour la prolifération des levures et des moisissures, **Stepaniak, Kornacki et al. (1980)**

III.2.2. Taux d'humidité

Les résultats du test d'humidité montrent que la poudre de datte *Mech-degla* à un taux d'humidité moyen de 12,83.

Schram, Dustin et al (1953), Insiste sur l'importance de l'humidité relative sur la stabilité d'un produit.

En effet, la teneur en eau d'un aliment est en relation directe avec l'humidité de l'air. Selon **Alais et Linden(1987)**, le comportement de l'eau dans l'aliment dépend de son activité à une température donnée.

Le taux d'humidité de notre datte concorde bien avec celui qu'a trouvé **Açourene et al (2001)**, dans des variétés de dattes sèches, et qui est de l'ordre de 12%.

III.2.3 Taux de matière sèche

Le taux de matière sèche de la poudre de datte *Mech-Degla* étudié est de 87,17 %. Cette valeur est légèrement supérieure de celle rapporté par **Al Eid (2006)**, qui situe le taux de matière sèche dans l'intervalle 80,80% - 84,20%.

III.2.4. Teneur en cendre

La teneur en cendres dépend, entre autres, de l'état de fertilité des sols et des amendements apportés **Açourène et al (2001)**, le taux de cendres de la datte *Mech-Degla* est de : 1,97 % ; cette valeur est assez proche des valeurs retrouvé dans la bibliographie, en effet, de

nombreux auteurs dont (**JRI 1953**); **Munier (1973)** ; et **El Hadj, Sebihi et al. (2000)**, affirment que la datte renferme des teneurs en cendres de l'ordre de 2 % .selon **Sawaya (1983)**, des teneurs en cendres plus élevées, comprises entre 2 et 4%.

III.2.5. Acidité titrable

Les acides organiques jouent un rôle très important dans le métabolisme énergétique des micro-organismes, il influence aussi sur la qualité des produits affectent leur conservation **Al-Farsi et al. (2005)**. Ils sont directement impliqués dans la croissance, la maturation et la sénescence de la datte **Al-Farsi et al. (2005)**. Ces acides influent aussi sur les propriétés sensorielles des fruits ; **El Hadj, Sebihi et al. (2000)**.

Le résultat de l'acidité titrable de la variété *Mech-Degla* est de 0,13 g/l. ce résultat est en accord avec celle de **Harrak and Hamouda (2005)**(0.13 g/l \pm 0.01). Cependant ce résultat est inférieur à celui obtenue par **Acourène et al. (2001)**, qui a rapporté des valeurs de l'ordre 0,19g/l à 0,2 g/l.

III.2.6.L'azote total

D'après la présente étude, la teneur en azote total mesurée par la méthode de Kjeldhal est de 1,35 g/100 g (MS). Ce résultat est légèrement différent de celui trouvé par **Alanazi (2010)** qui rapporte une valeur de 0.83 g/100g.

III.2.7. Sucres totaux

Les sucres existent sous deux formes, le saccharose et les sucres réducteurs (glucose et fructose), d'autres sucres tels que l'arabinose, le galactose sont également rapportes.

D'après les résultats obtenus, la teneur en sucre de la variété *Mech-degla* est de 67.64 g/100g de la matière sèche. Ces valeurs sont légèrement inférieures de celles retrouvées par **Demirbas (2017)**, compris entre 73-85%.

Mais il est a noté que **Reynes et al. (1995)**, **Bouabidi et al. (1996)**,**Açourene (2001)**, **Zaid (2002)**. Estiment que le taux de sucres totaux est compris entre 54% et 92% de la matière sèche, des résultats qui concordent avec nos résultats obtenues.

Les teneurs en sucres des dattes varient en fonction de la variété, du pollen, du stade de maturation et bien sûr du climat. Du point de vue composition et nature des sucres, la nature des sucres varie aussi, en fonction de la consistance de la datte **Munier, (1973)** ; **Sawayaet al. 1983** ; **Mekki (1983)**.

Selon **Khatab et al. (1983)** les variétés de datte sèches renferment des teneurs élevées en saccharose. Par contre, les variétés molles sont très riches en sucres réducteurs, les variétés demi molles renferment, autant de saccharose que de sucres réducteurs.

III.2.7 Sucres réducteurs

Les dattes contiennent des grandes quantités de sucres, en particulier glucose, fructose et le saccharose à un rapport de 68 % - 81 % de matière sèche **Abou-Zeid et al. (1991)**.

D'après la présente étude, le taux de sucres réducteurs de la datte *Mech-degla* déterminé par la méthode de DNS est de l'ordre de 13,42 g/100g du poids sec.

Les résultats trouvés sont largement inférieurs au résultat rapporté par **Sawaya et al. (1983)**, comprises entre 37,6 - 58%.

En effet **Barreveld (1993)**, rapportent des valeurs beaucoup plus supérieures aux alentours de 38,6 g/100g de la matière sèche.

Notre résultat se rapproche légèrement des résultats obtenus par **Açourène (2001) ; Zaid (2002)**, aux alentours de 26,72 % de la matière sèche totale.

III.2.8. Saccharose

Le taux de saccharose retrouvé dans la présente étude, exprimé en pourcentage relativement à la matière sèche, est de 39,52 g/100g.

Les résultats rapportés par **Souhail Besbes et al. (2009)**, montre que la teneur en saccharose de la poudre de datte est de l'ordre de 38,37, nous pouvons dire que le résultat obtenu sur nos échantillons est proche des résultats trouvés par **Souhail Besbes et al. (2009)**.

Cette différence peut être causée par les conditions climatiques, type de sol, le taux d'exposition au soleil et la période de récolte **Al-Farsi et al. (2005)**.

III.2.9. Protéines

Les protéines représentent un nutriment important pour le fonctionnement, la structure et l'entretien de l'organisme.

Les résultats obtenus du dosage des protéines de la variété étudiée est de 0,36g/100g MS, D'après l'étude de **Razi (1993)**, le taux des protéines varie entre 0,38 et 2,5 % du poids sec, notre résultat est assez proche de celui obtenu par **Razi**.

Acourène et Tama (2001), ont retrouvé une valeur de 1,04 g / 100 g. La pulpe de la datte ne contient qu'une faible quantité de protéines. Le taux diffère selon les variétés et surtout selon le stade de maturité. Il est en général de l'ordre de 1,75% du poids de la pulpe. Aussi, il a été montré que le pourcentage de protéines présent dans les noyaux des dattes est plus important que celui de la pulpe, selon **Al-Shahib et Marshall (2003)**.

III.3. Optimisation des paramètres de production d'éthanol

III.3.1 Essais préliminaires

L'optimisation des paramètres de production du bioéthanol doit passer par un temps d'incubation idéale afin d'avoir une meilleure production, qui se traduit par une meilleure dégradation des sucres totaux, réducteurs et la production des protéines.

➤ Choix du temps d'incubation

Le temps d'incubation de la fermentation des expériences du plan Box-Behnken sont conduite pour une période 96 heures soit 4 jours.

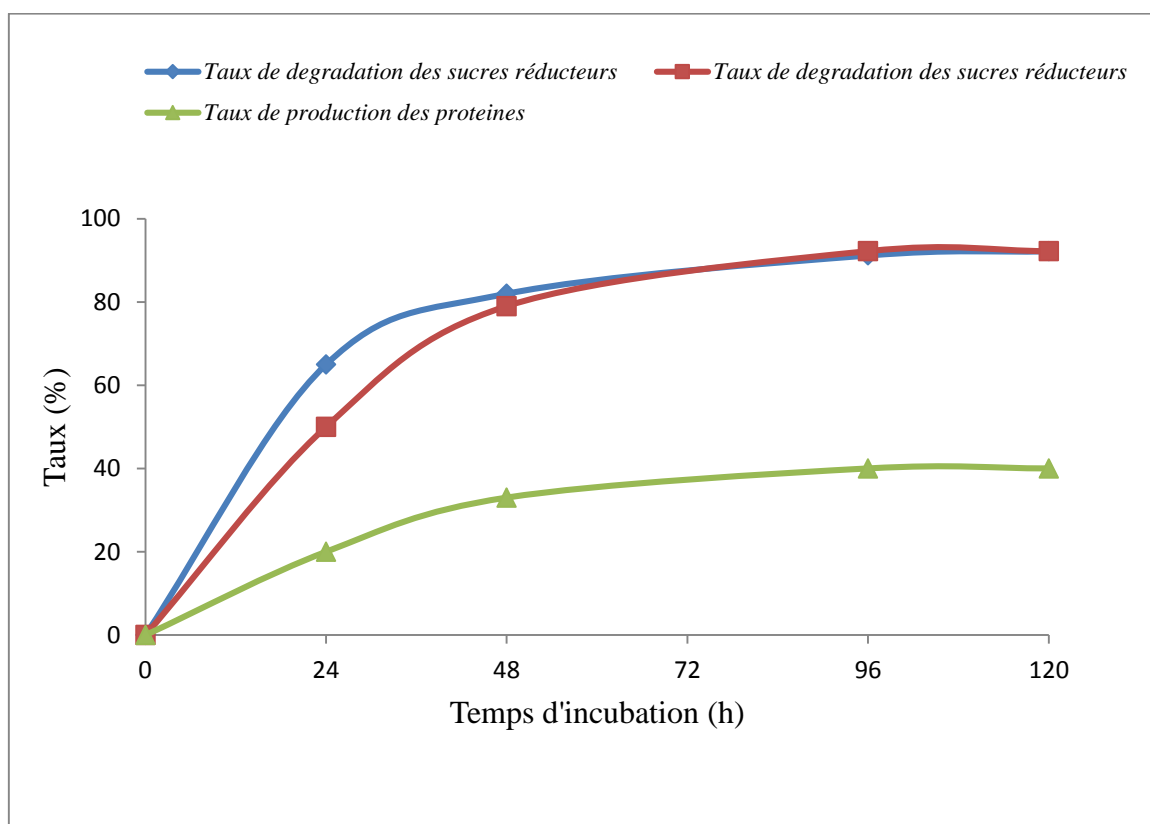


Figure n°7 : Effet de temps d'incubation sur le taux de dégradation de sucres totaux et réducteur, et taux de production de protéine produite.

Au cours de la fermentation les sucres totaux et les sucres réducteurs sont dégradés par la levure, comme nous le démontre les figures n°7, le taux de dégradation des sucres augmente au fur et à mesure de que le temps augmente.

Au cours de la fermentation le taux de protéine augmente en fonction du temps comme le montrent la figure n°7.

Le choix s'est porté sur une période d'incubation de quatre (4) jours, en effet le taux de dégradation des sucres totaux et réducteurs ainsi que le taux de production des protéines se stabilisent après 4 jours d'incubation.

➤ **Fixation de la vitesse d'agitation**

La vitesse d'agitation a été variée et les dosages des sucres et protéines ont été effectués. Les résultats nous montrent qu'une agitation de 150 tr/min est assez satisfaisante, nous avons donc opté pour cette vitesse d'agitation.

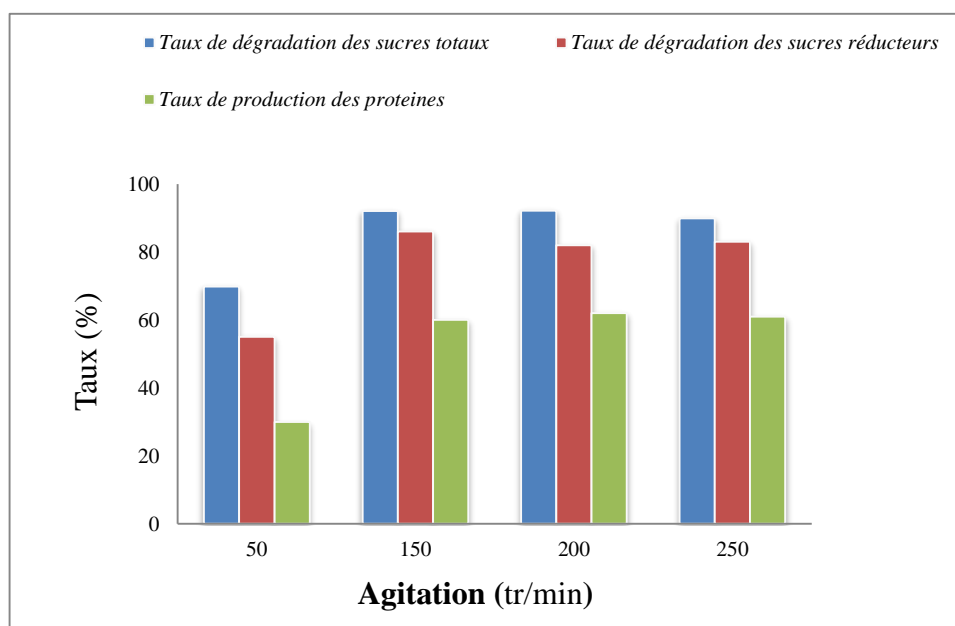


Figure n° 8 : Effet de l'agitation sur le taux de dégradation de sucres totaux et réducteur, et taux de production de protéine produite.

III.3.2. Plan d'expérience

L'optimisation des conditions de production de bioéthanol à partir de poudre de datte est réalisée en utilisant le plan de surface et de réponse (RMS) à trois niveaux (-1, 0 et 1), pour chaque paramètre choisis respectivement (X₁, X₂ et X₃) sont mis en place. Les facteurs choisis dans cette étude sont présentés comme suit :

- La température (25 ; 35 et 45 °C) représenté par (X₁).
- La concentration en substrat (datte) (6 ; 8 et 10 % (m/v) représenté par (X₂).
- Le pH (4; 4,5 et 5) représenté par (X₃).

Les résultats de plan Box-Behnken sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau VI: Optimisation des conditions de production de Bioéthanol par le plan Box-Behnken (BBD).

Essai	Température d'incubation	Valeur du pH	Concentration du substrat	Taux de bioéthanol produit	
				Valeurs expérimentales (%)	Valeurs prédites (%)
1	0	-1	-1	1,05	0,77
2	-1	0	-1	2,58	2,58
3	0	0	0	1.50	1.75
4	0	0	0	1.21	1.75
5	0	+1	-0	0.87	0.83
6	0	+1	+1	1.46	1.73
7	+1	+1	0	1.21	0.99
8	-1	-1	0	2.70	2.91
9	-1	0	+1	4.58	4.32
10	0	-1	+1	1.54	1.57
11	+1	0	+1	1.47	1.41
12	0	0	0	1.35	1.75
13	+1	0	-1	1.2	1.45
14	+1	-1	0	0.9	0.92
15	-1	+1	0	3.5	3.04

Les résultats présentés par le Box-Behnken nous révèlent la variation du bioéthanol produit, variant entre 0,85% et 4,58 %, ce qui confirme l'influence des trois facteurs Température, la concentration du substrat et le pH sur la production du bioéthanol.

En effet, ces résultats s'accordent bien avec ceux cités par **Pimentel and Patzek (2005)**; **Shen, Peng et al. (2011)** .

Etude de l'effet du milieu de culture sur la productivité de l'éthanol à partir de jus de tiges de sorgho sucré par **Yu et Tan (2008)**, qui a prédit que le taux maximal de production d'éthanol(119,12 g / l h) pour un milieu constitué de 0,77 g / l de phosphore, 2,15 g / l d'azote, et pH de 6,39. Le taux de fermentation de l'éthanol était de 122,85 g / l h.

Singh et Bishnoi (2012) Ont étudié l'effet du niveau d'inoculum et la concentration en urée sur la production du Bioéthanol dont les conditions optimal respectivement de 3% et 0,5 g/l avec un taux de production de 0,33 g / L / h.

III.3.2.1. Validation du model

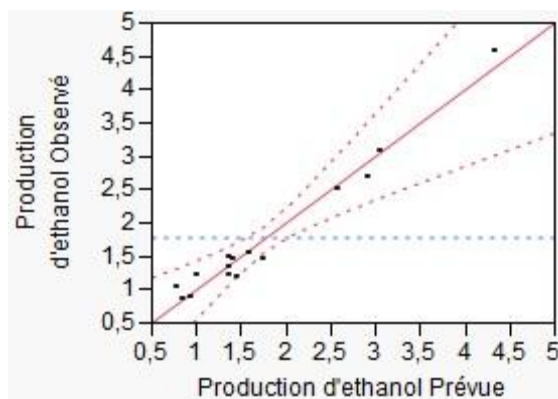
Les plans d'expériences utilisés pour évaluer le design expérimental est basé sur le modèle mathématique, qui est nécessaire pour relier la réponse de la variable aléatoire en fonction des facteurs qui l'influence dans le but d'avoir une bonne réponse. Pour cela plusieurs conditions doivent être vérifiées.

III.3.2.2. Coefficient de corrélation (R^2)

La performance d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de corrélation R^2 **Goupy (2006);Tinsson (2010)**. La valeur de R^2 du modèle la présente étude est égale à 0,97, ce qui indique que seulement 3 % des variations ne sont pas expliqués par ce dernier.

D'autre part, la valeur du coefficient de détermination ajusté est de 0,91, ce qui confirme la haute significativité du modèle par sa valeur élevée, sachant que le R^2 ajusté représente la valeur du coefficient de corrélation (R^2) après élimination des coefficients non significatifs du modèle.

Ce résultat nous renseigne que le polynôme du second degré qui décrit parfaitement le comportement du modèle car le coefficient de détermination est supérieur à 0,95(**Tinsson 2010**).



$$P < 0,0025 \quad R^2_{\text{carré}} = 0,97 \quad R^2_{\text{ajusté}} = 0,91$$

Figure n°9: Plan de prédiction réelle de production d'éthanol.

III.3.2.3. Model globale et manque d'ajustement

Le tableau suivant présente l'étude de la variance du modèle et le manque d'ajustement :

Tableaux VII : Etude de la variance du modèle et le manque d'ajustement.

Source	degré de liberté	somme des carrés	moyenne des carrés	Rapport F	Prob > F
Modèle	9	14,116832	1,56854	18,5871	0.0025*
défaut d'ajustement	3	0,37987500	0,126625	6.0202	0.1458
Erreur pure	2	0.04206667	0,021033	/	/
Erreur totale	5	0,42194167	/	/	/

L'analyse de la variance (ANOVA) de la régression du modèle révèle que le modèle est hautement significatif ($P < 0,05$) et que le manque d'ajustement n'est pas significatif ($P > 0,05$) on compare à l'erreur pure, ce qui affirme que le modèle est adéquats pour exprimer le taux de bioéthanol en fonction des trois paramètres à optimiser (Température, concentration du substrat et le pH), **Tinsson (2010)**.

III.3.2.4. Effet des facteurs

L'étude de la variance de la régression des coefficients comptés sur l'analyse d'impact des variables (X_1 , X_2 et X_3) à $p < 0,05$. Dans le but de déterminer la signification de chaque coefficient, et pour révéler l'intensité de l'interaction entre les paramètres.

Les résultats de la valeur des paramètres estimés et la valeur des probabilités calculées par le logiciel JMP **Tinsson (2010)**, sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau VIII: Coefficients de régression estimés du modèle polynomial de second degré.

Terme	Estimation	Erreur standard	Ratio de t	Prob. > t
Constante	1,35333333	0,167718	8,07	0,0005*
Linéaire				
X1	-1,01125	0,102706	-9,85	0,0002*
X2	0,0525	0,102706	0,51	0,6310
X3	0,42625	0,102706	4,15	0,0089*
Quadratique				
$(X_1)^2$	0,9145833	0,151179	6,05	0,0018*
$(X_2)^2$	-0,297917	0,151179	-1,97	0,1058
$(X_3)^2$	0,1745833	0,151179	1,15	0,3004
Interaction				
X_1X_2	-0,015	0,145248	-0,10	0,9218
X_1X_3	-0,4475	0,145248	-3,08	0,0274*
X_2X_3	0,025	0,145248	0,17	0,8701

III.3.2.5. Effet linéaire

Les résultats présentés dans le tableau VIII affirme que deux (2) paramètres possèdent une influence significative sur la production du bioéthanol, la température (X_1) avec une probabilité $P= 0,0002$ et un coefficient négatif ($\alpha_1= -1,01125$), pH (X_3) avec une probabilité $P= 0,0089$ et un coefficient positif ($\alpha_3= 0,42625$).

Le facteur concentration du substrat (X_2) n'a pas d'effet significatif sur la production du bioéthanol avec un $P=0,6310$.

La température et le pH ont en effet et une influence sur le processus de fermentation, le résultat obtenu du modèle Box-Behnken viennent appuyer ces dires et sont en accord avec les travaux de **Bely, Sablayrolles et al. (1990)**; **Castellari, Magrini et al. (1995)** ; **Lin, Zhang et al. (2012)**.

VI.6. Effet quadratique

Les résultats du tableau VIII montrent que l'effet quadratique $(X_1)^2$ influence d'une façon très significative sur la production du bioéthanol avec une probabilité $P= 0,0018$ et un coefficient positif $(\alpha_1)^2 = 0,9145833$.

Ces résultats révèlent l'importance de la température pour la production du bioéthanol qui concorde avec les travaux de **Lin, Zhang et al. (2012)**.

III.3.2.7. Effet d'interaction

Les résultats de tableau VII nous renseignent que l'interaction X_1X_3 (Température -pH) est significative avec une probabilité $P= 0,0274$. Contrairement aux autres interactions qui sont non significatives tel que l'interaction (X_1X_2) (Température-Concentration) et (X_2X_3) (pH-Concentration) avec des probabilités, $p = 0,9218$ et $p = 0,8701$ respectivement.

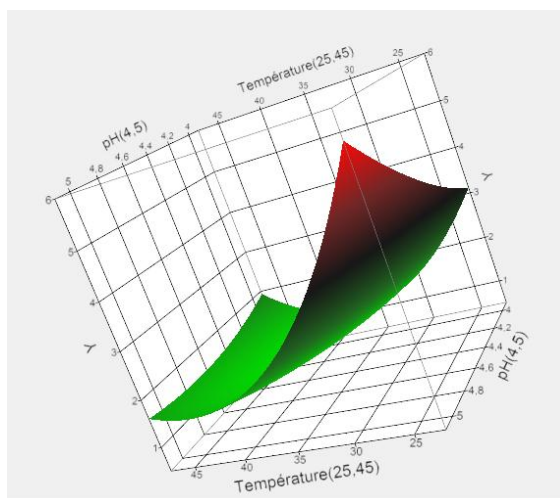


Figure n°11 : Surface de réponse pour l'interaction Température-pH.

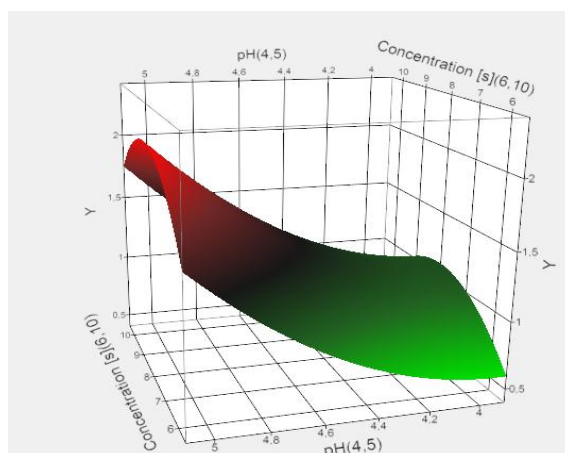


Figure n°12 : Surface de réponse pour l'interaction Concentration-pH.

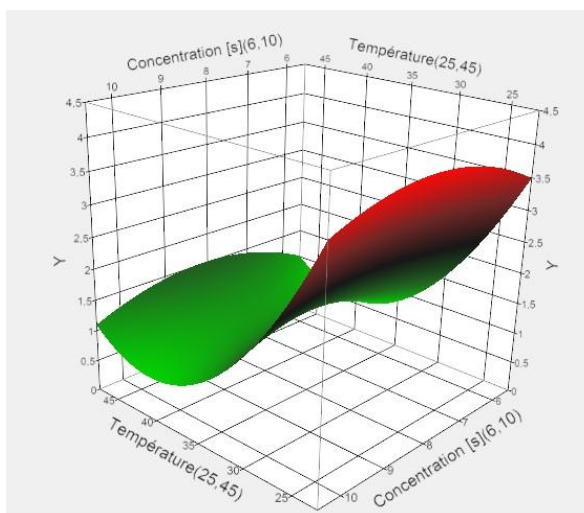


Figure n°13 : Surface de réponse pour l'interaction Concentration-Température.

III.3.2.8. Modèle mathématique

D'après ces résultats obtenus, les valeurs de coefficient constant α_0 , des coefficients linéaires, de coefficients des interactions et coefficient quadratiques des différents facteurs sont connus. Cependant, ces valeurs seront attribuer dans la fonction de réponse Y (production d'éthanol), avec l'élimination des paramètres non significatifs **Tinsson (2010)** le modèle mathématique polynomial de second degré du plan Box-Behnken est présenté par la relation suivante :

$$y = 1,3533333 + (-1,01125) X_1 + 0,42625 X_3 + (-0,4475) X_1 X_3 + 0,9145833 X_1^2$$

III.3.2.9. Paramètres optimaux

L'objectif de cette étude est de déterminer les conditions expérimentales qui aboutissent à une maximisation de la production du bioéthanol.

Les conditions de productions optimales déterminées, par logiciel JMP, sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau IX : Solution proposé par le logiciel JMP.

Variable	Valeur critique
Température	38,69
Concentration du substrat	8.09
pH	4,12
Valeur de l'éthanol prédite	1,00 %

Conclusion

CONCLUSION

L'exploitation agricole des dattes génèrent chaque année des quantités énormes en déchets, qui sont généralement peu exploités, il est obligatoire de trouvé une forme de valorisation de ces déchets, ce qui explique l'objectif de la présente étude qui se focalise sur l'essai de valorisation par bio fermentation de la variété de datte *Mech-Degla* par l'utilisation de microorganisme pour l'élaboration du bioéthanol.

Dans la présente étude, la souche a était isolé à partir des échantillons de terre, l'analyse morphologique et les tests biochimiques révèlent que la souche appartient à l'espèce *saccharomyces cerevisiae*.

Nous avons procédé lors de ce travail a la caractérisation physico-chimique des dattes variété *Mech-Degla*, qui a révèle un pH peu acide de 5,8 , un taux de matière sèche de 87,17 % et un taux d'humidité de 12,83%, la caractérisation physico-chimique nous a permis d'évaluer une richesse en sucres totaux de la datte *Mech-Degla* qui est de 67,64 % \pm 4,75 %, une proportion assez élevée en saccharose 39,52 % ,un taux d'azote dans la moyenne avec une valeur de 1,35 % \pm 0,15 et un taux de cendre de 1,97 % , par ailleurs il est a noté que la datte *Mech-Degla* est pauvre en sucres réducteurs 13,42%, et en protéines 0,36 %.

Les résultats des tests préliminaires pour la dégradation des sucres et la production des protéines nous a permis de fixé le temps d'incubation a 4 jours, ainsi qu'une agitation de 150 tours par minute.

L'optimisation, pour la production du bioéthanol par la levure *saccharomyces cerevisiae* grâce à l'analyse statistique (modélisation à régression linéaire) de l'ensemble des résultats obtenus avec la matrice de Box-Behnken a permis de sélectionner, parmi les facteurs nutritionnels et environnementaux testés, deux facteurs à effet significatif sur la production de l'éthanol qui sont la température et le pH du milieu de fermentation .

L'utilisation du plan d'expérience Box-Behnken pour optimiser la production de l'éthanol a révélé que les conditions optimales sont la température de 38,68°C, le pH de 4,12 et une concentration en substrat de 8,01 g pour une période d'incubation de 4 jours. Ces conditions ont permis d'obtenir une production d'éthanol prédite de 1 %.

En terme de perspective et dans le but de compléter ce travail dans l'avenir, il serait intéressant de :

- Elargir l'application du modèle Box-Behnken afin d'étudier l'effet d'autres paramètres sur la production de l'éthanol tel que le niveau d'inoculum, le type de micro-organisme utilisé etc.
- Conduire l'optimisation en utilisant les sous produit de la datte a savoir les noyaux de la datte *Mech-Degla* par exemple.
- Isoler et caractériser d'autres souches capables de produire de nouvelles molécules autre que le bioéthanol.
- Vérifier l'effet réel du paramètre non significatif de notre plan d'expérience à savoir la concentration en substrat et étudier sont effet à de forte concentration.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abou-Zeid, A.-Z. A., Baeshin, N. A., & Baghlaf, A. O. (1991). The formation of oxytetracycline in a date-coat medium. *Bioresource technology*, 37(2), 179-184.
- Abou-Zeid, C., Garbe, T., Lathigra, R., Wiker, H., Harboe, M., Rook, G., & Young, D. (1991). Genetic and immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infection and immunity*, 59(8), 2712-2718.
- Acourene, S., Ammouche, A., & Djaafri, K. (2008). Valorisation des rebuts de dattes par la production de la levure boulangère, de l'alcool et du vinaigre. *Sciences & Technologie C*(28), 38-45.
- Acourène, S., & Tama, M. (2001). Utilisation des dattes de faible valeur marchande (Rebuts de Deglet-Nour, Tinissine et Tantboucht) comme substrat pour la fabrication de la levure boulangère. *Rev. Energ. Ren.: production et valorisation-biomasse*, 1-10.
- Adachi, E., Torigoe, M., Sugiyama, M., Nikawa, J.-I., & Shimizu, K. (1998). Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. *Journal of fermentation and bioengineering*, 86(3), 284-289.
- AFNOR, E. (1986). Méthodes d'essai. *Recueil des normes françaises*.
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., & Shahidi, F. (2005). Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(19), 7592-7599.

- Al-Shahib, W., & Marshall, R. J. (2003). The fruit of the date palm: its possible use as the best food for the future? *International journal of food sciences and nutrition*, 54(4), 247-259.
- Al Eid, S. M. (2006). Chromatographic separation of fructose from date syrup. *International journal of food sciences and nutrition*, 57(1-2), 83-96.
- Alais, C., & Linden, G. (1987). *Biochimie alimentaire: Paris etc.:* Masson.
- Alanazi, F. K. (2010). Utilization of date syrup as a tablet binder, comparative study. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(2), 81-89.
- Amellal, H. (2008). Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes: formulation d'un yaourt naturellement, sucré et aromatisé. *Boumerdes: M'hamed Bougara University*.
- Arroyo-López, F. N., Orlic, S., Querol, A., & Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International journal of food microbiology*, 131(2), 120-127.

B

- Ballerini, D., Alazard-Toux, N., & Appert, O. (2006). Les biocarburants(état des lieux, perspectives et enjeux du développement). *IFP publications*.
- Barreveld, W. (1993). Date palm products. Agricultural services bulletin no. 101. *FAO, Rome*.
- Bassam, R. A. (2001). Industrial ethanol production using juice of dates in a fixed cell process.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., & Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of fermentation and bioengineering*, 70(4), 246-252.
- Bennamoun, L., Meraihi, Z., & Dakhmouche, S. (2004). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Aspergillus oryzae*

- Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. *Journal of Food Engineering*, 64(2), 257-264.
- Besbes, S., Drira, L., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H. (2009). Adding value to hard date (Phoenix dactylifera L.): Compositional, functional and sensory characteristics of date jam. *Food chemistry*, 112(2), 406-411.
- Birch, R. M., & Walker, G. M. (2000). Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9), 678-687.
- Bouabidi, H., Reynes, M., & Rouissi, M. (1996). Critères de caractérisation des fruits de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) du sud tunisien. In *Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie*, vol. 69 (pp. 73-87).
- Boudjema, K., Fazouane-Naimi, F., & Hellal, A. (2015). Optimization of the bioethanol production on sweet cheese whey by *Saccharomyces cerevisiae* DIV13-Z087C0VS using response surface methodology (RSM). *Romanian Biotechnological Letters*, 20(5), 10814-10825.
- Boughnou, N. (1988). Essai de production de vinaigre à partir de déchets de dattes.
- Bounaga, N., & Brac de la Perriere, R. (1988). Les ressources phytogénétiques du Sahara.
- BOURGEOIS, C., & LEVEAU, S. (1980). Technique d'analyse et de contrôle dans les industries alimentaires; vol. 3: le contrôle microbiologique. *Paris: Lavoisier-Tech et Doc*.
- Bourgeois, P., & Fahrasmane, L. (1988). Effet de stéroïdes de la canne à sucre sur des levures en fermentation alcoolique. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 21(5), 555-557.
- Box, J., & Wilson, W. (1951). Central composites design. *JR Stat Soc*, 1, 1-35.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

C

Castellari, L., Magrini, A., Passarelli, P., & Zambonelli, C. (1995). Effect of must fermentation temperature on minor products formed by cryo and non-cryotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Italian journal of food science*, 7(2), 125-132.

Chehema, A., & Longo-Hammouda, F.-H. (2004). Bilan azoté et gain de poids, chez le dromadaire et le mouton, alimentés à base de sous-produits du palmier dattier, de la paille d'orge et du drinn" *Aristida pungens*". *Cahiers Agricultures*, 13(2), 221-226 (221).

D

Dejean, J., & Blanc, G. (1999). Managing uncertainties on production predictions using integrated statistical methods. In *SPE Annual Technical Conference and Exhibition*: Society of Petroleum Engineers.

Demirbas, A. (2017). Utilization of date biomass waste and date seed as bio-fuels source. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 39(8), 754-760.

Djabouri, H., & Zaid, A. (2002). Date palm cultivation and product technology. *FAO Regional Office for Near East and North Africa (in Arabic)*, 393-436.

Djerbi, M. (1994). Précis de phéniculture. *FAO, Rome*. p, 191.

Djouab, A. (2007). *Préparation et incorporation dans la margarine d'un extrait de dattes des variétés séches*.

- Dowson, V., & Aten, A. (1963). "Composition et maturation. Récolte et conditionnement des dattes ", Collection FAO. Rome. *Cahier*(72), 1-397.
- Doymaz, İ. (2006). Thin-layer drying behaviour of mint leaves. *Journal of Food Engineering*, 74(3), 370-375.
- Drown, T., & Martin, H. (1889). On the Determination of the Organic Nitrogen in Natural Waters by the Kjeldahl Method. *J. Anal. Appl. Chem*, 3, 258-268.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. t., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

E

- El hadj, M. D. O., Cheick, M., Hamdi, W., Sayah, Z., & Bouaziz, S. (2012). etude comparative de la production d'éthanol brut à partir de trois variétés de dattes communes (degla beida, tacherwit et hamraya) réparties dans les différentes classes de dattes (molle, demi-molle et sèche) de la cuvette de ouargla (sahara septentrional est algérien). *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 2(2), 78-87.
- El Hadj, M. O., Sebihi, A., & Siboukeur, O. (2000). Qualité hygiénique et caractéristiques physico-chimiques du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette de Ouargla. *Rev. Energ. Ren.: Production et Valorisation-Biomasse*, 6.
- El Mekki, M. (1983). *Lactate déshydrogénase de Clostridium thermocellum: étude physiologique et enzymologique.*
- Estanove, P. (1990). Note technique: Valorisation de la datte. *Options méditerranéennes.*

F

Fao, I., & Istric, I. (2010). JRC. 2009. *Harmonized world soil database (version 1.1)*. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy and International Institute for Applied Systems Analysis, Laxenburg, Austria.

G

Gervais, M.-J., & Chagnon, F. (2010). *Modélisation des déterminants et des retombées de l'application des connaissances issues de la recherche psychosociale*: Fonds de recherche sur la société et la culture Québec.

Girard, H., & Rougieux, R. (1958). *Techniques de microbiologie agricole*.

GONZALEZ, Y. S. (2008). *Etude de l'adaptation et de la gestion de l'activité cellulaire dans un bioréacteur biétagé: intensification de la production d'éthanol*. INSA, Toulouse.

Goupy, J. (2006). *Plans d'expériences*: Ed. Techniques Ingénieur.

Goupy, J., & Creighton, L. (2009). *Introduction aux plans d'expériences: avec applications*: Dunod.

Guiraud, J., & Galzy, P. (1980). *Analyse microbiologique dans les industries alimentaires*: l'Usine Nouvelle.

H

Hammer, G. E., Kanaseki, T., & Shastri, N. (2007). The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity*, 26(4), 397-406.

Harrak, H., & Hamouda, A. (2005). Etude de quelques critères de qualité des principales variétés de dattes marocaines. In *Proceeding of the international symposium: sustainable agricultural development of oasian systems*, (pp. 07-10).

Hossain, A. S., & Aleissa, M. S. Bio-ethanol Production as Bio-solvent (Antifermenter), Antiseptic and Bio-fuel from Date Fruit Waste and its Suitable Properties Identification.

I

Ihssane, B., Bouchafra, H., El Karbane, M., Azougagh, M., & Saffaj, T. (2016). Application du test de robustesse pour l'évaluation de l'incertitude de mesure au terme de phase de développement d'une méthode chromatographique de quantification de cinq vitamines hydrosolubles. In *Annales Pharmaceutiques Françaises*, vol. 74 (pp. 205-211): Elsevier.

J

Jin, Y.-L., & Speers, R. A. (2000). Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58(3), 108-116.

Jourdan, A., & Zabalza-Mezghani, I. (2004). Response surface designs for scenario management and uncertainty quantification in reservoir production. *Mathematical Geology*, 36(8), 965-985.

JRI, F. (1953). cité par MAATALLAH, 1970. *Contribution à la valorisation de la datte Algérienne. Thèse ing INA El Harrach.*

K

Kebbal, S., Gharbi, I., Guemra, S., Hanzen, C., & Guetarni, D. (2008). Validation d'une méthode de dénombrement de la concentration en cellules somatiques du lait de vache au moyen du Coulter Counter® modèle Z2. In *Annales de Médecine Vétérinaire*, vol. 152 (pp. 221-226): Université de Liège.

Khali, M., Boussena, Z., & Boutekrabt, L. (2015). Effet de l'incorporation de noyaux de dattes sur les caractéristiques technologiques et fonctionnelles de la farine de blé tendre. *Nature & Technology*(12), 15.

Khan, J. A., Abulnaja, K. O., Kumosani, T. A., & Abou-Zaid, A.-Z. A. (1995). Utilization of Saudi date sugars in production of baker's yeast. *Bioresource technology*, 53(1), 63-66.

Kjeldahl, J. (1883). A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z. Anal. Chem*, 22(1), 366-382.

L

Larpent, J.-P. (1991). *Biotechnologie des levures*: Masson.

Leterme, P., García, M. F., Londoño, A. M., Rojas, M. G., Buldgen, A., & Souffrant, W. B. (2005). Chemical composition and nutritive value of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(9), 1505-1512.

Leveau, J., & Bouix, M. (1993). Les levures. *Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel*. Eds. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris, 2-39.

Licht, F., & Agra, C. (2007). World biodiesel markets: The outlook to 2010. *Agra Informa Ltd, Kent, United Kingdom*, 200.

Lin, S.-Y., Li, T. Y., Liu, Q., Zhang, C., Li, X., Chen, Y., Zhang, S.-M., Lian, G., Liu, Q., & Ruan, K. (2012). GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science*, 336(6080), 477-481.

Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and bioenergy*, 47, 395-401.

Louhichi, B., Belgaib, J., & Hajji, N. (2013). Production of bio-ethanol from three varieties of dates. *Renewable energy*, 51, 170-174.

M

MAHDI, Y., KEBIRI, S., MOUHEB, A., & GHOBRINI, A. Etude expérimentale de l'encrassement des échangeurs de chaleur à plaques lors d'une phase de traitement thermique du lait d'une installation industrielle Algérienne.

- Malherbe, D., Du Toit, M., Otero, R. C., Van Rensburg, P., & Pretorius, I. (2003). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), 502-511.
- Malherbe, D. F., du Toit, M., Cordero Otero, R. R., van Rensburg, P., & Pretorius, I. S. (2003). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5), 502-511.
- Mamun, A., Siddiqua, S., & Babar, S. M. E. (2013). Selection of an efficient method of biodiesel production from vegetable oil based on fuel properties. *Int J Eng Trends Technol*, 4(8), 3289-3293.
- Mehaia, M. A., & Cheryan, M. (1991). Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(3), 257-261.
- Mehani, I., & Bouchekima, B. (2014). Physicochemical Parameters and Economic Evaluation of Bio Ethanol Produced from Waste of Starting Dates in South Algeria. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*, 8(8), 844-847.
- Meradi, S., Arbouche, F., & Arbouche, R. Valorisation de l'engraisement de la race ovine Hamra par les sous-produits de la datte. *Cellulose*, 7(1), 0-1.
- Messaid, H. (2008). *Optimisation du processus d'immersion-rehydratation du système dattes seches-jus d'orange*.
- Miller, G. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal. Chem*, 31(3), 426-428.
- Munier, P. (1973). Le palmier dattier. *Techniques Agricoles et Productions Tropicales*. Paris Seme. *Maisonneuve et Larose*, 217.

N

Nasir Ahmed, S., Gouthaman, K., Chinnasamy, K., Jagannathan, R., & Parameswaran, P. (1995). Yield and quality performance of early maturing sugarcane varieties. *Indian Sugar*, 45(6), 365-366.

Nayyar, A., Walker, G. M., Canetta, E., Wardrop, F., & Adya, A. K. (2014). Cell surface properties and flocculation behaviour of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research* 2 (6).

O

Oliver, S., Rowan-Robinson, M., Alexander, D., Almaini, O., Balcells, M., Baker, A., Barcons, X., Barden, M., Bellas-Velidis, I., & Cabrera-Guerra, F. (2000). The European Large Area ISO Survey—I. Goals, definition and observations. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 316(4), 749-767.

OULD, E. H. D. (2001). Etude comparative de la productivité d'alcool brut de dattes selon les variétés. *Recherche Agronomique*(9), 91-99.

P

Pawlowski, L. (2008). Corrigendum to " Finely grained nanometric and submicrometric coatings by thermal spraying: A review"[*Surface and Coatings Technology* 202 (2008) 4318–4322]. *Surface and Coatings technology*, 203(3), 397.

Pierlot, C., Pawlowski, L., Bigan, M., & Chagnon, P. (2008). Design of experiments in thermal spraying: A review. *Surface and Coatings technology*, 202(18), 4483-4490.

- Pimentel, D., & Patzek, T. W. (2005). Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural resources research*, 14(1), 65-76.
- Prashar, A., Hili, P., Veness, R. G., & Evans, C. S. (2003). Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, 63(5), 569-575.
- Puértolas, E., & Barba, F. J. (2016). Electrotechnologies applied to valorization of by-products from food industry: Main findings, energy and economic cost of their industrialization. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 172-184.

R

- Razi, M. 1993. Contribution à l'étude de la valeur nutritive du jus de dattes de quatre variétés molles (Ghars, Litima, Tanslit, Takermoust), en comparaison avec le miel d'abeilles. Thèse ingénieur d'état en Agronomie saharienne. ITAS, Ouargla
- Rodriguez-Zaragoza, S. (2005). Physical effects of biological soil crusts on seed germination of two desert plants under laboratory conditions. *J Arid Environ*, 63, 344-352.

S

- Sawaya, W., Khalil, J., Safi, W., & Al-Shalhat, A. (1983). Physical and chemical characterization of three Saudi date cultivars at various stages of development. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 16(2), 87-92.
- Schram, E., Dustin, J.-P., Moore, S., & Bigwood, E.-J. (1953). Application de la chromatographie sur échangeur d'ions à l'étude de la composition des aliments en acides aminés. *Analytica Chimica Acta*, 9, 149-162.
- Scriban, R. (1993). Biotechnology. In: Technique and Documentation Lavoisier.

Shen, F., Peng, L., Zhang, Y., Wu, J., Zhang, X., Yang, G., Peng, H., Qi, H., & Deng, S. (2011). Thin-layer drying kinetics and quality changes of sweet sorghum stalk for ethanol production as affected by drying temperature. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1588-1594.

Singh, A., & Bishnoi, N. R. (2012). Enzymatic hydrolysis optimization of microwave alkali pretreated wheat straw and ethanol production by yeast. *Bioresource technology*, 108, 94-101.

Stepaniak, L., Kornacki, K., Grabska, J., & Wodecki, E. (1980). Influence de certaines conditions de la culture superficielle sur la production des lipases et des protéases par des souches de *Penicillium roqueforti* et *Penicillium candidum*. *Le Lait*, 60(591-592), 45-55.

système Tecator, K. (2002). Contribution à l'étude du métabolisme des levures à voile dans l'élaboration des vins jaunes du Jura. *Revue Française d'Œnologie*(195), 33.

T

Tama, F., & Sanejouand, Y.-H. (2001). Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. *Protein engineering*, 14(1), 1-6.

TAZDAIT, D., SALAH, R., & BAKOUR, R. (2013). 10 th Annual World Congress on Industrial Biotechnology June 16-19, 2013 Montréal, Canada BIOSURFACTANTS PRODUCED BY INDIGENOUS *Pseudomonas aeruginosa* GROWN ON CANE MOLASSES.

Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Current trends in bioethanol production by *saccharomyces cerevisiae*: Substrate, inhibitor reduction, growth variables, coculture, and immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 2014.

Timilsina, G. R., & Shrestha, A. (2011). How much hope should we have for biofuels? *Energy*, 36(4), 2055-2069.

Tinsson, W. (2010). *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques* (Vol. 67): Springer Science & Business Media.

Toriya, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of food microbiology*, 80(1), 47-53.

V

Verma, L., & Joshi, V. (2000). *Postharvest Technology of Fruits and Vegetables: General concepts and principles* (Vol. 1): Indus Publishing.

Verma, S., Joshi, S., Chitnis, V., Hemwani, N., & Chitnis, D. (2000). Growing problem of methicillin resistant staphylococci--Indian scenario. *Indian journal of medical sciences*, 54(12), 535-540.

W

Walker, G. M. (2011). 125th anniversary review: fuel alcohol: current production and future challenges. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(1), 3-22.

Welch, L. S., & Luostarinen, R. (1988). Internationalization: Evolution of a concept. *The Internationalization of the firm*, 14, 83-98.

Y

Yu, J., & Tan, T. (2008). Ethanol production by solid state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast strain. *Fuel Processing Technology*, 89(11), 1056-1059.

Annexes

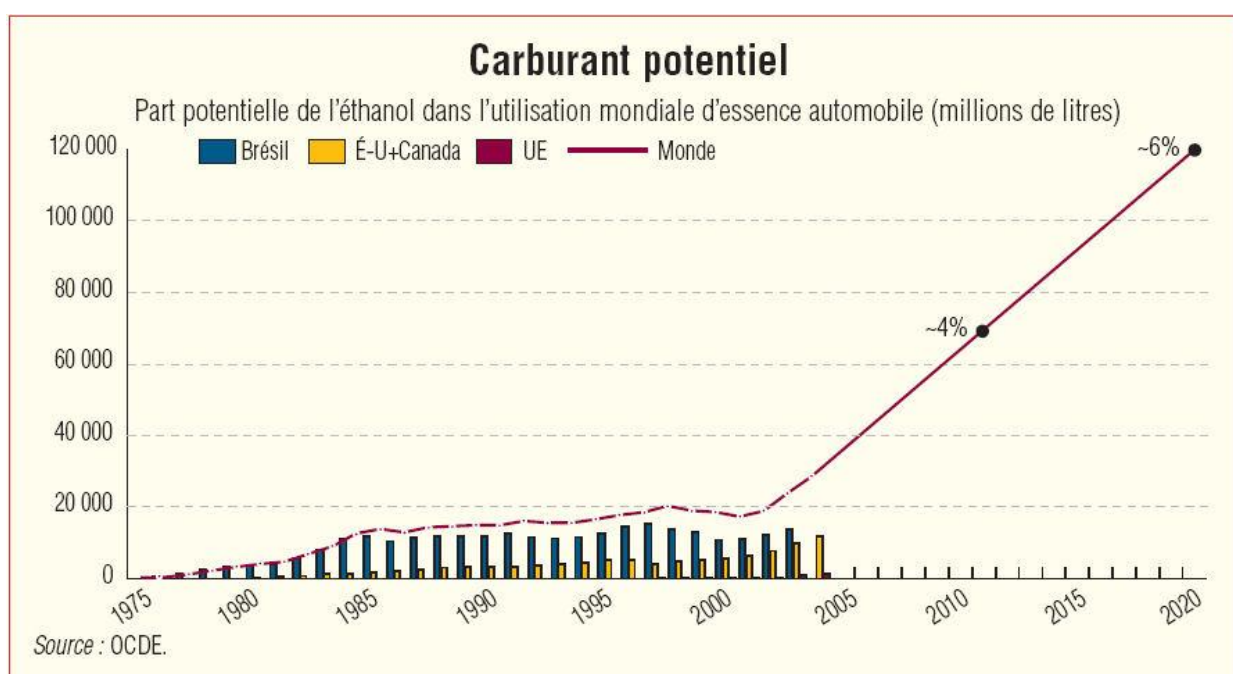
Annexe I : Illustrations.

Tableau I : tableau de la production de dattes algérienne (2015).

Wilaya	Production (quintaux)	Nombre de palmiers	Surface (hectares)
Biskra	4, 077,900	4, 315,100	42,910
El oued	2, 474,000	3, 788,500	36,680
Ouargla	1, 296,300	2, 576,600	21,980
Adrar	910,300	3, 799,000	28,330
Gherdaia	565,000	1, 246,500	10,850
Bechar	300,500	1, 639,800	14,120
Tamanraset	109,400	688,900	7,000
Khenchla	68,200	124,400	770
Tébessa	20,500	61,800	820
Laghouat	16,200	37,300	320
Illizi	15,600	129,100	1,250
Batna	14,000	28,700	190
El bayedh	10,300	63,900	640
Naama	10,200	50,600	510
Tindouf	8,400	45,200	430
Djelfa	6,800	10,100	100
M'sila	0	0	0
Total	9, 903,600	18, 605,100	166,900

Tableau II : Production de trois variétés de datte algérienne.

Variété	Nombre de palmiers	Production (quintaux)
Deglet-nour.	7, 194,700	5, 249,500
Ghers et analogues.	4, 192,000	1, 928,500
Degla Beida et analogues.	7, 218,400	2, 725,700

**Figure n°1** : Prévision de la production et de l'utilisation du bioéthanol dans le monde, source : OCDE.

Annexe II : préparation des milieux de culture.➤ **Gélose nutritif**• **Composition du milieu :**

Extrait De Viande	1,0g/L
Extrait De Levure	2,5g/L
Peptone	5,0g/L
Chlorure De Sodium	5,0 g/L
Agar	15,0 g/L

• **Préparation**

- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.

➤ **Bouillon nutritif**• **Composition du milieu :**

Peptone	10,0 g/L.
Chlorure de sodium	5,0 g/L.
Extrait de bœuf	10,0 g/L.

• **Préparation**

- Mettre en solution Le milieu de base déshydraté dans un litre d'eau- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.

➤ **Gélose a l'amidon 1%**

• **Composition du milieu :**

Amidon soluble	10g
KNO ₃	0,5g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
CaCl ₂	0,1g
FeCl ₃	traces
Agar	15g

pH du milieu prêt-à-l 'emploi à 25°C: 7,0 ± 0,2.

• **Préparation**

- Mettre en solution tous les composés du milieu dans un litre d'eau distillée
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacons, à raison de 110 ml par flacon.
- -Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

pH du milieu prêt-à-l 'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

➤ **Milieu PDA**

• **Composition du milieu :**

Pomme de terre	200 g
Dextrose	15 g
d'agar - agar	20 g
1 litre d'eau distillée.	

➤ **Milieu sabourau**

Glucose.....	20g
Peptone	10g
Agar.....	15- 20 g
Eau distillée	1000mL

Le pH est ajusté a 6,4.

Annexe III: préparation des réactifs.➤ **Bleu de coomassie**• **Composition de réactif :**

BBC G-250	100 mg.
Ethanol Absolu	50 ml.
Acide phosphorique à 85%	100 ml.
Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.	

➤ **Sels de CARAZ I**• **Composition de réactif :**

Acétate de zinc Trihydraté	23.8g
Acide acétique glaciale	3g
Eau distillée	100g

➤ **Sels de CARAZ II**• **Composition de réactif :**

Ferrocyanure de potassium	10.6g
Eau distillée	100ml

➤ **DNS**• **Composition de réactif :**

DNS	1g
Soude	1,5 g
Tartrate double de sodium-potassium	30g
Compléter à 100 ml avec l'eau distillée.	

➤ **Tampon phosphate pH =7**

• **Préparation du Tampon phosphate (0.1) M à pH =7**

K_2HPO_4 5,2 g

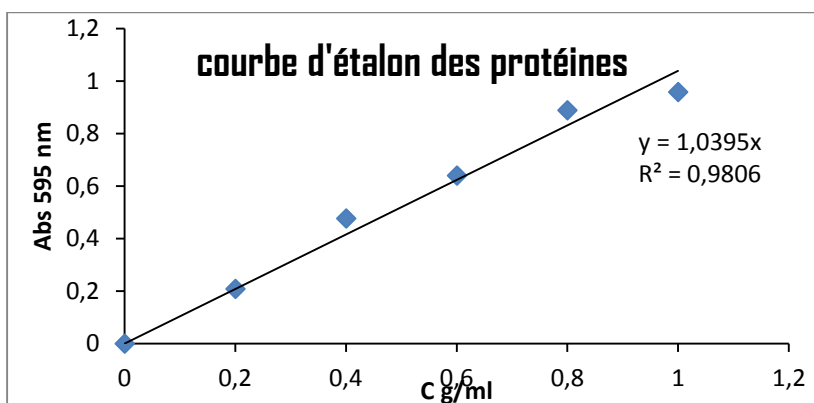
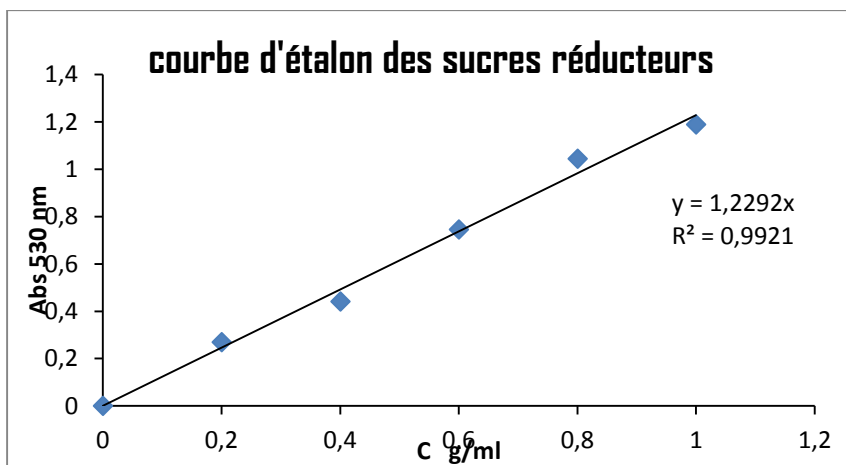
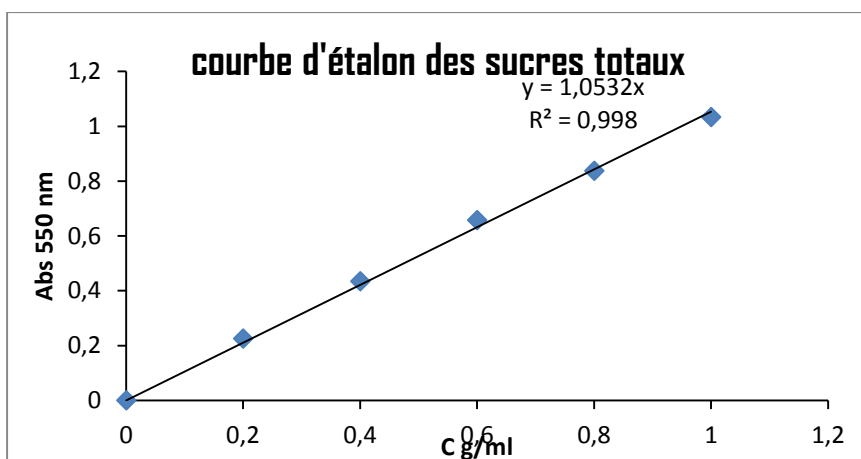
KH_2PO_4 10,7 g

Pour 1 L d'eau distillée.

➤ **Tampon citrate**

Préparer 10g/L d'acide citrique ($C_6H_8O_7$, H_2O) 0,05M et 14,71 g/L citrate de sodium dans l'eau distillée. Le pH du mélange obtenu est égale 5

Annexe IV : Courbes d'étalonnage.



Annexe IV : Matériel.



Figure n°1 : Dispositif du dosage d'éthanol assisté par l'appareil FUNK-GERBER.



Figure n°2 : Cellule de Malassez.



Figure n°3 : Fourre a moufles.



Figure n°4 : Spectrophotomètre RAYLEIGH VIS-723G

Résumé

Le présent travail vise à valoriser la datte *Mech-Degla* qui souvent est mal exploité, et a optimisé la production du bioéthanol par les plans d'expériences Box-Behnken. Aujourd'hui, la prise de conscience du réchauffement climatique, l'incertitude quant aux réserves de pétrole dans le monde, ont conduit au développement des énergies renouvelables. Le bioéthanol est une alternative très attractive aux énergies conventionnelles. La production du bioéthanol dans le monde a fortement augmenté depuis la crise du pétrole en 1970. L'éthanol peut être produit par la fermentation de plusieurs substrats. Le palmier dattier est une espèce thermophile de régions tropicales chaudes et humides, D'après la F.A.O, la production mondiale de dattes est estimée à 7,62 millions de tonnes en 2010. L'Algérie est un des plus importants pays producteurs de dattes, Les dattes telles que la variété *Mech-Degla* présente une importance économique indéniable, ces dattes sèches renferment un concentré de sucre et de nutriment important. Une souche microbienne a été isolée à partir des échantillons de sol, Les tests biochimiques et l'analyse morphologique effectués sur cette souche révèlent qu'il s'agirait de *Saccharomyces cerevisiae*. La caractérisation physico-chimique a révèlè que les dattes de cette variété *Mech-Degla* est riche en sucres totaux avec un taux de 67,64 %, Une proportion assez élevée en saccharose, soit 39,52 %. Signalons par ailleurs que la datte *Mech-Degla* est pauvre en sucres réducteurs et en protéines. Les valeurs respectives obtenues sont de 13,42% et 0,36 %. L'utilisation du plan d'expérience Box-Behnken en vue d'optimiser la production de l'éthanol a permis d'avoir une production maximale de 4,33 %.

Mots clés : Bioéthanol ; Plans d'expérience ; Box-Behnken ; Fermentation ; *Mech-degla* ; *saccharomyces cerevisiae* ; Optimiser.

Abstract

The present work aims at enhancing the *Mech-Degla* date, which is often poorly exploited, and has optimized the production of bioethanol by Box-Behnken experimental plans. Today, awareness of global warming, uncertainty about the world's oil reserves, have led to the development of renewable energies. Bioethanol is a very attractive alternative to conventional energies. The production of bioethanol in the world has increased sharply since the oil crisis in 1970. Ethanol can be produced by the fermentation of several substrates. The date palm is a thermophilic species of hot and humid tropical regions. According to the FAO, world production of dates is estimated at 7.62 million tons in 2010. Algeria is one of the most important date producing countries, Dates such as the *Mech-Degla* variety are of undeniable economic importance, and these dry dates contain a concentrate of sugar and important nutrients. A microbial strain was isolated from the soil samples. Biochemical tests and morphological analysis carried out on this strain revealed that it would be *Saccharomyces cerevisiae*. The physico-chemical characterization revealed that the dates of this *Mech-Degla* variety is rich in total sugars with a content of 67.64%, a relatively high proportion of sucrose, ie 39.52%. Note also that the *Mech-Degla* date is poor in reducing sugars and proteins. The respective values obtained were 13.42% and 0.36%. The use of the Box-Behnken experimental plan to optimize the production of ethanol allowed a maximum production of 4.33%.

Key words: Bioethanol; Plans of experience; Box-Behnken; Fermentation; *Mech-degla*; *Saccharomyces cerevisiae*; Optimize.