

Optimisation de l'extraction des jus de sous-produits de dattes (*Phoenix dactylifera L.*) et valorisation par production de bioéthanol

S. Chniti *^{1,2,3}, H. Djelal^{1,4}
I. Bentahar³, M. Hassouna³ et A. Amrane²

¹ Ecole des Métiers de l'Environnement
Campus de Ker Lann, 35 170 Bruz, France

² Université de Rennes 1, ENSCR, CNRS, UMR 6226
Avenue du Général Leclerc, CS 50837, 35708 Rennes Cedex 7, France

³ Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis
Université Carthage et sis Av. de la République, B.P. 77, 1054 Amilcar, Tunisie

⁴ Université Européenne de Bretagne, 5 Bd Laennec, Rennes, France

(reçu le 14 Février 2014 – accepté le 29 Décembre 2014)

Résumé - La valorisation énergétique des sous-produits de l'industrie des dattes en biocarburant s'inscrit dans une démarche économique et environnementale. L'optimisation de l'extraction des sucres des sous-produits de dattes a été effectuée en utilisant la méthodologie de surface de réponses, 'MSR', par le plan d'expérience de Doehlert. Le facteur ratio pulpe/eau (X_3), qui a influencé significativement la concentration des jus en sucres, a été modélisé et optimisé. Il a été possible d'avoir des jus avec des concentrations élevées en sucres (220 g.l⁻¹). Les essais de fermentation alcoolique menés dans un milieu de culture à base de jus de dattes à 17.4 °Brix, conduisent à la production d'éthanol aux concentrations de 63 g.l⁻¹, 41 g.l⁻¹ et 33 g.l⁻¹, respectivement pour les levures *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida Pelliculosa* et *Zygosaccharomyces rouxii*. Les essais menés dans le milieu à 35.8 °Brix (milieu de culture se rapprochant le plus des sirops de dattes brutes) montrent que la croissance des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida Pelliculosa* est inhibée par la pression osmotique élevée causée par la haute concentration en sucres. Seule la levure xérotolérante *Zygosaccharomyces rouxii* s'est adaptée au milieu en produisant 55 g.l⁻¹ de bioéthanol.

Abstract - Energy recovery from by-products of the dates industry into biofuel is part of an economic and environmental approach. The optimization of the extraction of sugar from dates by-products was performed using the response surface methodology, 'MSR', for the experimental design of Doehlert. The ratio pulp / water (X_3), which influenced significantly the concentration of juice sugar, was modeled and optimized. It was possible to see juice with high concentration of sugars (220 g.l⁻¹). Fermentation tests conducted in an environment cultivation containing date juice at 17.4 °Brix, lead to the production of ethanol at concentrations of 63 g.l⁻¹, 41 g.l⁻¹ and 33 g.l⁻¹, respectively for *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida pelliculosa* yeasts. Tests conducted in environment of 35.8 °Brix (cultivation environment closest to raw dates syrups) show that the growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida pelliculosa* is inhibited by high osmotic pressure caused by the high concentration of sugars. Only the *Zygosaccharomyces rouxii* xérotolérante yeast adapted itself to the environment by producing 55 g.l⁻¹ of bioethanol.

Mots clés: Valorisation énergétique - Sous-produits – Biocarburant – Extraction – Fermentation - Levures.

* sofien.chniti@hotmail.fr

1. INTRODUCTION

Le bioéthanol s'est imposé depuis longtemps comme le biocarburant numéro un dans le monde et le marché du bioéthanol a poursuivi son expansion rapide au cours de ces dernières années. L'utilisation croissante du bioéthanol comme alternative aux carburants fossiles est un fait acquis depuis plusieurs années au Brésil et aux Etats-Unis.

La valorisation énergétique des sous-produits de l'industrie des dattes en bioéthanol s'inscrit dans une démarche économique et environnementale. Les déchets de dattes, sont dotés de teneurs élevées en sucres (73 – 83 %): glucose, fructose et saccharose [1, 2]. Ils contiennent également des protéines, des lipides, des éléments minéraux et des vitamines [3].

Il peut être transformé, par des procédés biotechnologiques en biocarburant, substance énergétique qui peut remplacer le pétrole léger, ou au moins permettre le coupage de l'essence (5 à 10 %).

L'industrie alimentaire en Tunisie, génère d'importantes quantités de déchets. Le secteur phoenicole, fournit à chaque campagne près 40 000 tonnes de déchets de dattes, qui restent non utilisées et peuvent dépasser les 30 % de la production. Ce sont des dattes qui ne sont pas consommées par les humains, soit du fait de leurs faibles qualités gustatives, soit du fait de leur texture 'rébarbative' (trop dure), soit tout simplement parce qu'elles sont négligées au profil d'autres aliments plus attractifs.

Les microorganismes utilisés pour la production de bioéthanol à partir des sucres sont des levures [4] et la bactérie *Zymomonas* [5, 6], mais la levure *Saccharomyces cerevisiae* reste la plus adaptée et donc la plus utilisée pour la production de bioéthanol [7, 8] et autres produits industriels comme le glycérol [5, 9, 10].

Les conditions environnementales influencent le comportement des levures en affectant ses capacités de croissances et de production [11]. Ces paramètres sont la température [12], l'oxydation [13], la concentration en éthanol ou co-produits dans le milieu de culture [14-18], ainsi que la concentration élevée en sucres [19, 20] et l'hyperosmolarité [21].

En fonction de l'intensité de ces grandeurs, elles peuvent avoir une influence qui vise à ralentir ou arrêter l'activité des levures [21]. Les substances inhibitrices sont parfois difficiles à éviter puisqu'elles sont souvent des substrats ou produits de la réaction biochimique considérée [22]. La réponse de la levure face à un stress est également mise en œuvre de façon dynamique avec une capacité ou non d'adaptation aux conditions environnementales en fonction du temps [15, 23-25].

L'objectif de cette étude consiste à développer un procédé biotechnologique pour pouvoir utiliser les sucres de sous-produits des dattes en tant que source de carbone pour produire un biocarburant (bioéthanol).

La première partie étudie les conditions d'extraction du jus des dattes. Nous avons étudié l'influence de la température d'extraction, le ratio pulpe/eau et le temps d'extraction. Un modèle phénoménologique a été établi, pour la concentration finale en sucres.

La deuxième partie, développe la fermentation alcoolique de sirop des dattes par les levures. Toutefois, les fortes teneurs en sucres dans les milieux de cultures, induisent une forte pression osmotique qui limite la capacité fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* [28, 29], ce qui nous a amené à utiliser des souches osmotolérantes comme *Zygosaccharomyces rouxii* et *Candida pelliculosa*.

Différents essais ont été menés dans des milieux de cultures 'batch' à différentes teneurs en sucres.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Le déchet de dattes (Deglet-Nour)

La variété 'Deglet-Nour' de dattes tunisiennes est la plus abondante et la plus commercialisée en Tunisie. Elle nous a été fournie par l'unité de conditionnement de dattes 'Alkhalig', les fruits utilisés sont des déchets de triage (fruit avec défauts de texture, fruits très humides, fruits altérés par les microorganismes et les insectes) sont conservés à 4 °C avant d'extraire le jus.

2.2 Extraction de jus de dattes

Les dattes ont subi, comme traitement préliminaire, un lavage, un dénoyautage et sont ensuite découpées en petits morceaux (0.5 à 1 cm). Des masses précises de pulpe de dattes et d'eau (pour respecter les ratios pulpe/eau de chaque expérience) sont mélangées. L'extraction s'effectue dans un bain-marie agitateur (Julabo SW23, Seelbach, Germany), pendant différents temps (temps correspondants au plan d'expérience). Une fois le temps d'extraction écoulé, le tout est filtré, puis conservé pour analyses physico-chimiques.

2.3 Modélisation de l'extraction

Les facteurs exploités sont ceux qui ont influencé le processus de l'extraction du jus. Ces facteurs sont la température d'extraction (X_1), le temps d'extraction (X_2) et le ratio pulpe/eau (X_3). Le processus d'expérience de Doehlert à trois (03) facteurs est utilisé pour l'exécution des manipulations.

Après le choix de la conception du processus d'expérience, l'équation du modèle a été définie et des coefficients de ce modèle ont été prévus. Le modèle utilisé dans la méthode des surfaces de réponses est généralement une équation quadratique ou une forme diminuée de cette équation. Le modèle du second degré peut être écrit [26, 27] comme suit:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_j x_i + \varepsilon$$

Avec, β_0 , constante, ε , erreur et les β_j , β_{jj} et β_{ij} , sont les coefficients du modèle.

2.4 Microorganismes et mode de conservation

Les souches utilisées dans de ce travail sont la *Saccharomyces cerevisiae* 522D, la *Zygosaccharomyces rouxii* IP 2021.92 et la *Candida pelliculosa* IP 820.63, commercialisées par l'Institut Pasteur (France). Les trois souches sont conservées à 04 °C, sur gélose inclinée. La composition du milieu pour un litre de gélose de Sabouraud (Merck) est la suivante: Peptone (10 g), Extrait de levure (10 g), Glucose (20 g), Agar-agar (15 g) dans l'eau osmosée (millipore) qsp 1000 ml. La conservation des souches à plus long terme est réalisée sur un milieu à base de glycérol (Carlo Erba). Des cultures sont effectuées en milieu Sabouraud liquide.

A la phase exponentielle de croissance de la levure, un volume de glycérol stérile est ajouté à trois volumes de la culture. La suspension des levures à 25 % de glycérol est ensuite répartie dans des tubes stériles (1 ml), puis congelée à -20 °C.

2.5 Milieux de culture

Le sirop de datte doit être dilué aux proportions convenables (Milieu 1: 17.4°Brix et milieu 2: 35.8°Brix), puis centrifugé à 5000 rpm pendant 30 min, afin de séparer les débris cellulotiques, alors que le surnageant est utilisé comme source de carbone pour la

bioproduction d'éthanol [28]. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes, après enrichissement en sels minéraux.

Les milieux à base de sirop de dattes sont dilués à l'aide d'une solution nutritive dont la composition est la suivante m (mg.l⁻¹) (Milieu de Wikerham, modifié, [29]: KH₂PO₄, 5200; MgSO_{4.7}H₂O, 1200; CaCl₂ H₂O, 150; FeSO_{4.7}H₂O, 100; ZnSO_{4.7}H₂O, 30; CuSO_{4.5}H₂O, 0.79; H₃BO₃, 15; KI, 2; Na₂MoO_{4.2}H₂O, 5; MnSO₄, H₂O, 32; CoCl_{2.6}H₂O, 5.6; EDTA, 100. Avant stérilisation, les milieux sont enrichis, en NH₄Cl (10 mM), et ajustés à un pH 6 par ajout de KOH 1M.

2.6 Process de fermentation

Les pré cultures des levures sont réalisées selon le protocole décrit par Djelal et al., [9, 30]. Les fermentations sont dupliquées dans des flacons de 500 ml fermés par des bouchons à vis, contenant 300 ml de volume utile, à 28 °C sous agitation (180 rpm), dans un Shaker (New Brunswick, Innova 40, USA).

Les différents milieux de cultures sont inoculés selon le protocole de Djelal et al., [9, 15].

Tableau 1: Analyse de la réponse de surface de l'extraction des jus de dattes

	T (°C)	Temps (min)	Ratio pulpe/eau	EquiGlu (g.l ⁻¹)(a)	EquiGlu prédite(b)	Res(c)
1	80	60	01:03	156	156	0
2	90	30	01:03	154	158.3	-4.25
3	70	90	01:03	174	169.8	4.25
4	80	90	01:02	216	219.4	-3.375
5	90	60	01:02	218	215.6	2.375
6	90	60	01:04	126	125.1	0.875
7	80	60	01:03	156	156	0
8	70	60	01:04	122	124.4	-2.375
9	80	30	01:02	212	210.1	1.875
10	80	60	01:03	156	156	0
11	80	30	01:04	120	116.6	3.375
12	90	90	01:03	165	164	1
13	70	60	01:02	218	218	-0.875
14	70	30	01:03	154	155	-1
15	80	90	01:04	126	127.9	-1.875

a- Valeurs expérimentales - b- Valeurs théoriques (valeurs provenant du modèle) - c- Résidus

Le suivi de la fermentation est réalisé en effectuant des prélèvements de 5 ml à 0, 18, 24, 48, 66 et 72 h, de culture. Le dosage des sucres et des métabolites est effectué par chromatographie en phase liquide à haute performance, 'HPLC' selon la méthode décrite par Djelal et al., [30], afin de quantifier les concentrations en glucose, fructose, saccharose et autres métabolites, tels que l'éthanol et le glycérol excrétés au cours des cultures. La concentration en NH₄Cl dans les milieux aux cours de la fermentation a été déterminée par une méthode développée par Mann [31].

2.7 Evaluation de la fermentation

2.7.1 Calcul de l'équivalent glucose

Le calcul de la concentration en sucres totaux en équivalent glucose (Equi Glu) est effectué grâce à la relation proposée par Carrasco et al., [20], [glucose] + [fructose] + 1.05 [saccharose]. Le °Brix des milieux à base de sirop de dattes est déterminé par un réfractomètre manuel (Auxilab S.L, Navarra, Spain) à 03 échelles (0 - 90°), avec 0,2 °Brix de précision.

2.7.2 Rendement de la fermentation et la conversion du substrat

Nous avons caractérisé la fermentation par des grandeurs, autres que les concentrations en produits, afin de pouvoir comparer les résultats de l'ensemble des essais réalisés. Nous avons calculé, les rendements globaux en bioéthanol ($Y_{EiOH/S}$), en glycérol ($Y_{Gly/S}$) et le rendement en biomasse ($Y_{X/S}$) à la fin de la fermentation par rapport au substrat consommé (S), ainsi que le rendement en éthanol ($Y_{EiOH/X}$) et en glycérol ($Y_{Gly/X}$) par rapport à la biomasse (X) après 72 h de culture.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Modélisation

-Effet des facteurs sur la concentration finale en sucres

Les manipulations effectuées à partir du processus d'expérience de Doehlert (3 facteurs) ont conduit aux résultats consignés dans le **Tableau 1**. Le modèle mathématique obtenu tient compte des variables codées et se présente comme suit, pour le suivi du rendement en jus.

$$Y(X_1, X_2, X_3) = 156 - 0.625X_1 + 5.125X_2 - 46.25X_3 - 2.25X_1 X_2 + 1X_1 X_3 + 0.5X_2 X_3 + 4.125X_1^2 + 1.625X_2^2 + 10.875 X_3^3$$

$Y(X_1, X_2, X_3)$ = modèle mathématique pour le suivi de la concentration en sucres des jus de datte, avec X_1 = température (°C), X_2 = temps d'extraction (min) et X_3 = Ratio dattes/eau.

Les facteurs des modèles sont linéaires (X_1, X_2, X_3), quadratiques (X_1^2, X_2^2, X_3^2) et avec interaction ($X_1 X_2, X_1 X_3, X_2 X_3$). Ils sont statistiquement considérés significatifs ou non pour la concentration en sucres des jus des dattes si la probabilité (P) est inférieure à 0.05 ou supérieure à 0.05 respectivement (**Tableau 2**).

3.2 Optimisation de l'extraction

Les **Tableaux 1** et **2** présentent l'impact des différents facteurs sur la réponse. Il ressort de ces tableaux que, toutes les contributions singulières (X_2 et X_3), quadratiques (X_3^2), ont un impact significatif sur la concentration en sucres des jus des dattes.

La figure 1 présente l'influence de certains facteurs sur la concentration en sucres de dattes. On constate, qu'à une température la plus faible (correspondant à -1 en valeur codée et 70 °C en valeur réelle) et un temps d'extraction le plus court, on a une concentration en sucres de jus (Equi Glu) d'environ 160 g/l⁻¹. Cette concentration reste presque stable à une température de 90 °C. En présence de ratio pulpe/eau le plus faible (1:2), nous avons obtenu la concentration de jus la plus élevée (219 g/l⁻¹).

Cette concentration diminue jusqu'à atteindre un minimum de concentration d'environ 120 g/l⁻¹ à un ratio de pulpe/eau de 1:4. En effet, la macération des pulpes dans l'eau, permettrait le passage des sucres dans l'eau.

D'après le modèle mathématique, dans sa forme linéaire (X_2 et X_3) et quadratique (X_3^2), le ratio pulpe/eau a un impact significatif sur l'équivalent Glucose dans les jus, soit les probabilités $0.0154 < 0.0001$ et 0.0035 successivement.

Tableau 2: Estimation des coefficients du modèle pour le suivi de la concentration en sucres des jus

Terme	Estimation	Standard	T	Prob
Constante	156	2.32	67.24	< 0.0001*
X ₁	-0.625	1.42	-0.44	0.6784
X ₂	5.125	1.42	6.61	0.0154
X ₃	-46.25	1.42	-32.55	< 0.0001*
X ₁ *X ₂	-2.25	2.01	-1.12	0.3137
X ₁ *X ₃	1	2.01	0.5	0.6398
X ₂ *X ₃	0.5	2.01	0.25	0.8134
X ₁ ²	4.125	2.09	1.97	0.1056
X ₂ ²	1.625	2.09	0.78	0.4723
X ₃ ²	10.875	2.09	5.2	0.0035*

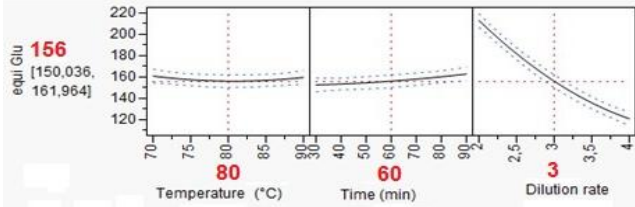


Fig. 1: Effet des trois facteurs sur la concentration finale en sucres des jus de dattes

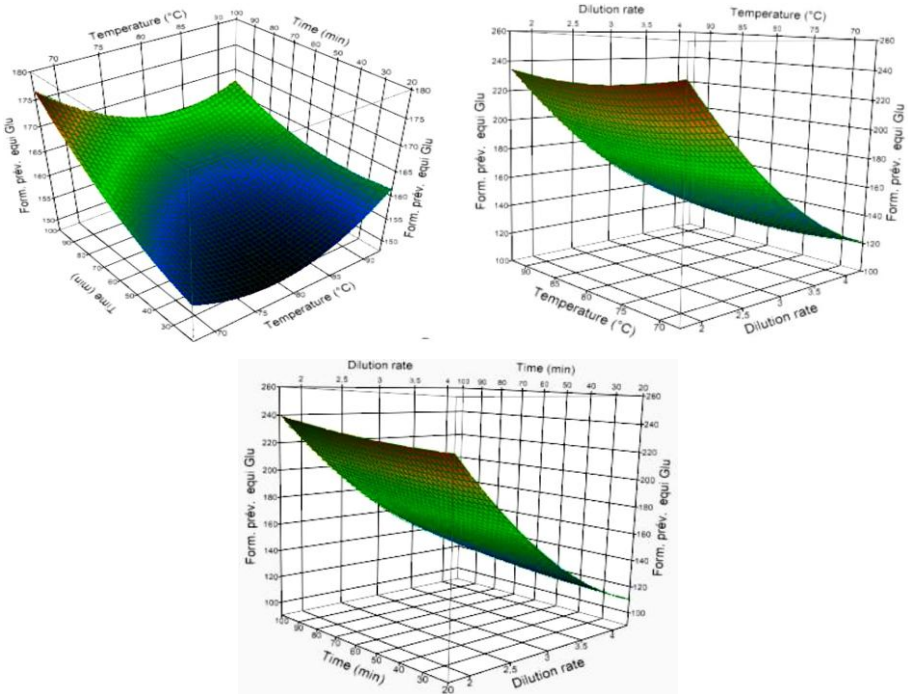


Fig. 2: Impact des interactions entre les facteurs (X₁, X₂, X₃) sur l'équivalent Glucose des jus de dattes

3.3 Fermentation alcoolique

-Evolution de la biomasse

Le suivi de la croissance des deux souches *Z. rouxii* et *C. pelliculosa* montre après 72 h de culture, une croissance plus élevée de 50 % par rapport à celle de *S.cerevisiae* (Fig. 3). Les deux premières souches résistent mieux aux facteurs stressants causés par les fortes concentrations en sucres du milieu de culture (hyperosmolarité), lors de la fermentation.

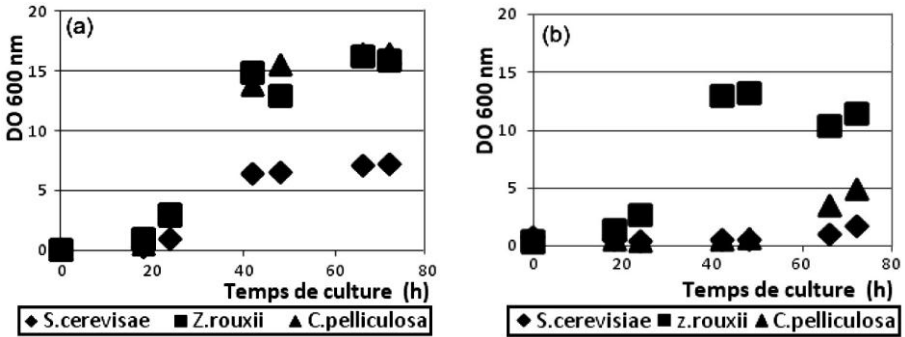


Fig. 3: Suivi de la croissance des levures au cours de la fermentation pour le milieu 1 (a) et le milieu 2 (b)

D'autre part, seule *Z. rouxii* fermente le milieu 2 (Fig. 3.b-). L'inhibition totale est observée pour le milieu le plus concentré pour les deux levures *S. cerevisiae* et *C. pelliculosa*. Le **Tableau 1** regroupe les teneurs en biomasse obtenues après 72 h de culture, permet de préciser la croissance des trois (03) levures étudiées.

3.4 Produits de la fermentation alcoolique des sirops de dattes concentrés

La quantité de glycérol produite, par *Z. rouxii* augmente de 54 % en passant du 'milieu 1' au 'milieu 2', (Fig. 4.b-, Fig. 5.b-). L'augmentation de la quantité de glycérol produite est liée au rôle osmoprotecteur de la levure en condition stressante, et cela est validé par plusieurs auteurs comme Taherzadeh *et al.*, [32]; Djelal *et al.*, [9] et Geerman *et al.*, [33].

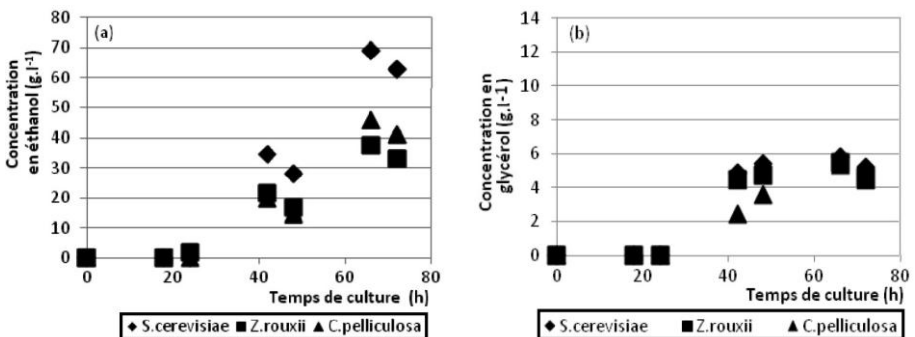


Fig. 4: Evolution de la concentration en éthanol (a) et en glycérol (b) durant la fermentation pour le milieu 1

Une forte concentration en sucres occasionne un stress osmotique des levures puisque l'eau va diffuser au travers de la membrane cytoplasmique des cellules pour

équilibrer les concentrations intra et extra cellulaires. Cette perte d'eau peut s'avérer fatale pour les levures sensibles, ce qui est le cas pour *C. pelliculosa*, mais surtout pour *S. cerevisiae*.

L'osmoadaptation des levures, cultivées sur les milieux 1 et 2, caractérisés par une faible activité en eau, se fait par la production de glycérol (soluté compatible) qui sera accumulé en partie dans le cytoplasme.

Dans notre cas, le principal soluté compatible produit est le glycérol, qui joue un rôle majeur dans l'osmoadaptation des levures. Une partie du glycérol sera retenue par la levure pour contrebalancer la pression osmotique de part et d'autre de la paroi cytoplasmique, mais une partie variable, selon le microorganisme et la composition du milieu de culture, diffusera et s'accumulera dans le milieu extracellulaire; plus la cellule est osmotolérante et plus elle retiendra du glycérol [9, 32, 34, 35].

Les fortes teneurs en sucres dans le milieu de culture, inhibent la production d'éthanol par *S. cerevisiae* et *C. pelliculosa* (Fig. 3.a-). Pour le milieu 2, seule la souche *Z. rouxii* peut produire de l'éthanol qui atteint à la fin de la fermentation 55 g.l⁻¹ (Fig. 3.a-).

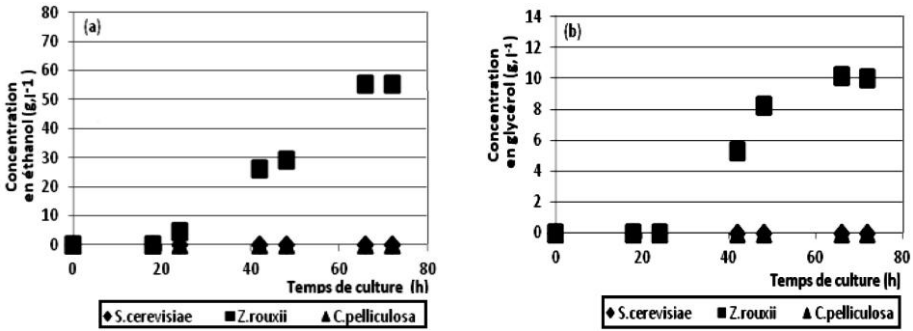


Fig. 5: Evolution de la concentration en éthanol (a) et en glycérol (b) durant la fermentation pour le milieu 2

Ces résultats suggèrent que la fermentation alcoolique d'un milieu à forte teneur initiale en substrat, par les deux levures *S. cerevisiae* et *C. pelliculosa* est principalement limitée par leur faible tolérance à la pression osmotique du milieu de culture, contrairement à la levure *Z. rouxii* qui possède un remarquable potentiel de croissance et d'adaptation dans les mêmes conditions de culture.

Tableau 3: Fermentation alcoolique du milieu à base de sirop de dattes par les levures (après 72 h de culture)

	Eq Glu (g.l ⁻¹)*	Eq Glu Consommé	EtOH (g.l ⁻¹)	Gly (g.l ⁻¹)	Biomasse (%)
<i>S. cerevisiae</i>	174	94	63	10.0	3.1
	349	4	ND**	ND**	2.0
<i>Z. rouxii</i>	169	67	33	4.6	5.8
	357	41	55	10.0	4.6
<i>C. pelliculosa</i>	168	71	41	4.6	5.7
	356	3	ND**	ND**	2.6

* Concentration en sucres totaux en équivalents glucose (g.l⁻¹).

** ND : < Limite de quantification.

La performance fermentaire est donc, très dépendante de la souche de levure utilisée et de la concentration en sucres de milieu de culture. Le **Tableau 3** regroupe les différentes concentrations obtenues pour les produits de la fermentation.

Les rendements par rapport aux substrats consommés en éthanol ($Y_{EtOH/S}$), en glycérol ($Y_{Gly/S}$) et en biomasse ($Y_{X/S}$), pour les trois souches, sur une même durée de culture (72 h), montrent que pour le milieu le moins concentré en sucres, les rendements en éthanol sont de 38, 29 et 34 %, respectivement pour *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* et *C. pelliculosa*.

Toutefois pour le milieu à 36°Brix, *S. cerevisiae* et *C. pelliculosa* perdent leurs capacités de production en éthanol contrairement à *Z. rouxii* (**Tableau 4**).

Tableau 4: Rendement en produits et en biomasse après 72 h de fermentation

	Eq Glu (g.l ⁻¹)*	$Y_{EtOH/S}$ (%)	$Y_{Gly/S}$ (%)	$Y_{X/S}$ (%)	$Y_{EtOH/X}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{Gly/X}$ (g.g ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i>	174 349	38 ND**	3 ND**	2 14	20.0 ND**	3.0 ND**
<i>Z. rouxii</i>	169 357	29 38	4 7	5 3	5.7 12.0	0.8 2.2
<i>C. pelliculosa</i>	168 356	34 ND**	4 ND**	4 24	7.0 ND**	0.8 ND**

En étudiant plus particulièrement les vitesses spécifiques de production en éthanol et glycérol de la levure osmotolérante *Zygosaccharomyces rouxii*, il s'avère que plus le milieu de culture est extrême, plus le 'facteur de maintenance' est élevé.

En effet, la part de sucre consommé ira vers la production du soluté compatible au détriment de la croissance, ceci est confirmé par des travaux antérieurs de Djelal *et al.*, [30]. L'apparition d'un stress osmotique dans le milieu de culture se traduit au niveau du métabolisme des levures par des modifications des flux de carbone et d'énergie. Une partie de carbone est détournée vers la production de glycérol.

Ainsi la composition de la membrane pourrait engendrer une modification de la perméabilité de celle-ci au glycérol, qui est en partie accumulé dans la cellule en tant que principal soluté compatible [21].

4. CONCLUSION

Le présent travail a montré que la valorisation de sirops de dattes, conditionnés industriellement à 72 °Brix par l'industrie agro-alimentaire tunisienne, en bioéthanol est possible par des levures.

Nous avons obtenu 63 g.l⁻¹ d'éthanol après 72 h de fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* qui consomment 94 % des sucres d'un milieu de culture à base de sirop de dattes à 17.4°Brix.

Mais afin d'économiser des quantités importante d'eau dans des régions où la pluviométrie est très faible, il est judicieux de favoriser la bioproduction de l'éthanol par *Zygosaccharomyces rouxii*, une souche osmotolérante, qui fermente un milieu à 35.8°Brix et qui aboutit à un rendement $Y_{EtOH/S}$ de 38 %, identique à celui de *S. cerevisiae*, cultivée sur un milieu à 17.4°Brix.

REFERENCES

- [1] A.G. Elarem, G. Flamini, B.S. Emna, M. Issaoui, N. Zeyene, A. Ferchichi, M. Hammami, N.A. Helal and L. Achour, 'Chemical and Aroma Volatile Compositions of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Fruits at Three Maturation Stages', Food Chemistry, Vol. 127, N°4, pp. 1744 - 1754, 2011.
- [2] M. Elleuch, S. Besbes, O. Roiseaux, C. Blecker, C. Deroanne, N. Drira and H. Attia, 'Date Flesh: Chemical Composition and Characteristics of the Dietary Fibre', Food Chemistry, Vol. 111, N°3, pp. 676 - 682, 2008.
- [3] A.A. Abou-Zeid, N.A. Baeshin and A.O. Baghlaf, 'The Formation of Oxytetracycline in a Date-Coat Medium', Bioresource Technology, Vol. 37, N°2, pp. 179 - 184, 1991.
- [4] S. Limtong, C. Sringiew and W. Yongmanitchai, 'Production of Fuel Ethanol at High Temperature From Sugar Cane Juice by a Newly Isolate *Kluyveromyces Marxianus*', Bioresource Technology, Vol. 98, N°17, pp. 3367-3374, 2007.
- [5] F.W. Bai, W.A. Anderson and M. Moo-Young, 'Ethanol Fermentation Technologies From Sugar and Starch Feedstocks', Biotechnology Advances, Vol. 26, N°1, pp. 89-105, 2008.
- [6] S. Patle and B. Lal, 'Investigation of the Potential of Agro-Industrial Material as Low Cost Substrate for Ethanol Production by Using *Candida Tropicalis* and *Zymomonas Mobilis*', Biomass and Bioenergy, Vol. 32, N°7, pp. 596 - 602, 2008.
- [7] A. Bandara, S. Fraser, P.L. Chambers and G.A. Stanley, 'Trehalose Promotes the Survival of *Saccharomyces Cerevisiae* During Lethal Ethanol Stress, But Does Not Influence Growth Under Sublethal Ethanol Stress', FEMS Yeast Research, Vol. 9, N°8, pp. 1208 - 1216, 2009.
- [8] M. Ma and Z.L. Liu, 'Mechanisms of Ethanol Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*', Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 87, N°3, pp. 829 - 845, 2010.
- [9] H. Djelal, A. Amrane, F. Larher and G. Martin, 'Effect of Medium Osmolarity on the Bioproduction of Glycerol and Ethanol by *Hansenula Anomala* Growing on Glucose and Ammonium', Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 69, N°69, pp. 341 - 349, 2005.
- [10] D. Stanley, S. Fraser, P.J. Chambers, P. Rogers and G.A. Stanley, 'Generation and Characterization of Stable Ethanol-Tolerant Mutants Of *Saccharomyces Cerevisiae*', Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Vol. 37, N°2, pp. 139 - 149, 2010.
- [11] H. Li, M.L. Ma, S. Luo, R.M. Zhang, P. Han and W. Hu, 'Metabolic Responses to Ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* Using a Gaz Chromatography Tandem Mass Spectrometry-Based Metabolomics Approach', International Journal of Biochemistry and Cell Biology, Vol. 44, N°7, pp. 1087 - 1096, 2012.
- [12] I.S. Kim, H.S. Yun, I.S. Park, H.Y. Sohn, H. Iwahashi and I.N. Jin, 'A Knockout Strain of *CPR1* Induced During Fermentation of *Saccharomyces Cerevisiae* KNU5377 is Susceptible to Various Types of Stress', Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 102, N°4, pp. 288 - 296, 2006.
- [13] D.J. Jamieson, 'Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*', Yeast, Vol. 14, N°16, pp. 1511 - 1527, 1998.
- [14] F. Aguilera, R.A. Peinado, C. Millan, J.M. Ortega and J.C. Mauricio, 'Relationship Between Ethanol Tolerance, H^+ -ATPase Activity and the Lipid Composition of the Plasma Membrane in Different Wine Yeast Strains', International Journal of Food Microbiology, Vol. 110, N°1, pp. 34 - 42, 2006.
- [15] P.V. Atfield, 'Stress tolerance: the Key to Effective Strains of Industrial Baker's Yeast', Nature Biotechnology, Vol. 15, N°13, pp. 1351 - 1357, 1997.
- [16] J.M. Ding, X.W. Huang, L.M. Zhang, N. Zhao, D.M. Yang and K.Q. Zhang, 'Tolerance and Stress Response to Ethanol in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*', Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 85, N°2, pp. 253 - 263, 2009.

- [17] B.R. Gibson, S.J. Lawrence, J.P.R. Leclaire, C.D. Powell and K.A. Smart, 'Yeast Responses to Stresses Associated with Industrial Brewery Handling', *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 31, N°5, pp. 535 - 569, 2007.
- [18] X.Q. Zhao and F.W. Bai, 'Mechanisms of Yeast Stress Tolerance and its Manipulation for Efficient Fuel Ethanol Production', *Journal of Biotechnology*, Vol. 144, N°1, pp. 23 - 30, 2009.
- [19] C. Belloch, S. Orlic, E. Barrio and A. Querol, 'Fermentative Stress Adaptation of Hybrids Within *Saccharomyces Sensu Stricto Complex*', *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 122, N°1, pp. 188 - 195, 2008.
- [20] P. Carrasco, A. Querol and M. del Olmo, 'Analysis of Stress Resistance of Commercial Wine Yeast Strains', *Archives of Microbiology*, Vol. 175, N°6, pp. 450 - 457, 2001.
- [21] S. Hohmann, 'Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol.66, N°2, pp. 300-372, 2002.
- [22] J. Sainz, F. Pizarro, J.R. Pérez-Correa and E. Agosin, 'Modeling of Yeast Metabolism and Process Dynamics in Batch Fermentation', Wiley periodicals Inc, pp. 818-828, 2003.
- [23] B. Sonnleitner, 'Dynamic Adaptation of Microbes', *Journal of Biotechnology*, Vol. 65, N°1, pp. 47 - 60, 1998.
- [24] M.A. Henson, 'Dynamic Modeling and Control of Yeast Cell Populations in Continuous Biochemical Reactors', *Computers and Chemical Engineering*, Vol. 27, N°8-9, pp. 1185 - 1199, 2003.
- [25] C. Lacroix and S. Yildirim, 'Fermentation Technologies for the Production of Probiotics With High Viability and Functionality', *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 18, N°1, pp. 176 - 183, 2007.
- [26] D. Mathieu, D. Feneuille and Phan-Tan-Lun, '*Méthodologie de la Recherche Expérimentale: Etudes des Surfaces de Réponse*', Laboratoire de Prospective Réactionnelle et d'Analyse de l'Information, IUT de l'université d'Aix-Marseille, Marseille, 1977.
- [27] M. Giovanni, 'Response Surface Methodology and Product Optimization', *Food Technology*, Vol. 37, N°11, pp. 41 - 45, 1983.
- [28] M. Guigou, C. Lareo, L.V. Perez and M.E. Luberas, 'Bioethanol Production from Sweet Sorghum: Evaluation of Post-Harvest Treatments on Sugar Extraction and Fermentation', *Biomass and Bioenergy*, Vol. 35, N°7, pp. 3058 - 3062, 2011.
- [29] L.J. Wicherham, '*Taxonomy of Yeasts*', Technical Bulletin N°1029, United States, Department of Agriculture, Washington D.C., 1951.
- [30] H. Djelal, A. Amrane, F. Larher and G. Martin, 'Effect of Dissolved Oxygen on the Bioproduction of Glycerol and Ethanol by *Hansenula Anomala* Growing Under Salt Conditions', *Journal of Biotechnology*, Vol. 125, N°1, pp. 95 - 103, 2006.
- [31] L.T. Mann, 'Spectrophotometric Determination of Nitrogen in Total Micro-Kjeldhal Digests. Application of the Phenol-Hypochlorite Reaction to Microgram Amounts to Ammonia in a Total Digest of Biological Material', *Analytical Chemistry*, Vol. 35, N°13, pp. 2179 - 2182, 1963.
- [32] M.J. Taherzadeh, L. Adler and G. Liden, 'Strategies for Entrancing Fermentative Production of Glycerol', *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 31, N°1, pp. 53 - 66, 2002.
- [33] A.J. Geertman, J.A. Van Maris, J.P. Van Dijken and J.T. Pronk, 'Physiological and Genetic Engineering of Cytosolic Redox Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae* for Improved Glycerol Production', *Metabolic Engineering*, Vol. 8, N°6, pp. 532 - 542, 2006.

- [34] H. Djelal, F. Larher, G. Martin and A. Amrane, 'Continuous Culture for the Bioproduction of Glycerol and Ethanol by *Hansenula Anomala* Growing Under Salt Stress Conditions', *Annals of Microbiology*, Vol. 62, N°1, pp. 49 - 54, 2012.
- [35] A.D. Brown, 'Microbial Water Stress Physiology: Principles and Perspectives', Chichester: John Wiley and Sons, New York, 313 p., 1990.