



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

DOMAINE : *SCIENCES ET TECHNOLOGIES*

MENTION BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

Parcours : *Sciences des Aliments et Nutrition*

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

**FABRICATION DE BIOETHANOL A PARTIR D'AMIDON DE MANIOC ET
ETUDE DES FACTEURS INFLUANT SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE
L'AMIDON**



Présenté par : ANDRIAMANANTSOA Ainavalonjaka

Maître ès-Sciences

Soutenu le *12 Avril 2017* devant les membres du jury :

Président : Professeur RANDRIANARIVO Hanitra Ranjàna

Encadreur : Docteur RAZAFINDRATOVO ANDRIAMANAMISATA Valérie

Examineurs : Docteur RAZAFIARIMANGA Zara

: Docteur RAZAFINDRAZAKA Vonimanitra

« La sagesse te donnera de la joie, l'intelligence te gardera de l'erreur et la raison veillera sur toi, elles t'empêcheront de mal agir » : Proverbes 2 : 10

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé :

Au laboratoire du DRT/FOFIFA, et au Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences de l'Alimentation et à la Nutrition (LABASAN) de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo.

Au sein de l'entreprise OBIO HAMY sise à Amboanjobe.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à :

- Aux responsables de l'entreprise OBIO HAMY d'avoir bien voulu nous accueillir et de nous confier ce travail, ses conseils ont été d'un appui important dans la réalisation de notre stage.
- Monsieur Lalao Roger RANAIVOSON chef de département du DRT/FOFIFA qui a bien voulu nous accepter au sein de son équipe, l'intérêt qu'il a manifesté vis-à-vis de ce travail et les recommandations judicieuses tout au long de notre stage.

Nos vifs remerciements s'adressent particulièrement :

- Au Professeur RANDRIANARIVO Hanitra Ranjàna qui malgré ses nombreuses occupations nous fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance.
- A madame le Docteur Valérie RAZAFINDRATOVO ANDRIAMANAMISATA qui malgré ses grandes responsabilités a bien voulu accepter de nous encadrer, l'intérêt qu'elle a accordé à notre travail tout au long de notre stage. Nous la remercions particulièrement pour sa disponibilité, sa patience et son soutien.

Aux Docteurs RAZAFIARIMANGA Zara et RAZAFINDRAZAKA Vonimanitra qui ont aimablement accepté d'apporter leurs compétences et ont bien voulu examiner ce mémoire.

- Au responsable et technicien du laboratoire du DRT/FOFIFA.
- A mes chers parents pour leur soutien, leur patience et leur compréhension pendant ces longues années d'études.

TABLE DES MATIERES

GLOSSAIRE	i
LISTE DES ABREVIATIONS	ii
LISTES DES FIGURES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES ANNEXES	viii
INTRODUCTION GENERALE	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
A. LE MANIOC	2
A.1. ORIGINE	2
A.2. DESCRIPTION	2
A.3. SYSTEMATIQUE	2
A.4. REPARTITION DE LA PRODUCTIVITE DU MANIOC	2
A.5. COMPOSITION BIOCHIMIQUE DU MANIOC.....	3
A.6. UTILISATION DU MANIOC ET CONSERVATION	4
B. L'AMIDON	4
B.1. DEFINITION	4
B.2. L'AMYLOSE	6
B.3. L'AMYLOPECTINE.....	6
B.4. INTERACTIONS ENTRE L'AMYLOSE DE L'AMIDON ET LES LIPIDES.....	7
C. HYDROLYSE	7
C.1. DEFINITION	7
a) L'hydrolyse chimique.....	8

b) L'hydrolyse enzymatique.....	8
C.2. LES AMYLASES	8
a) Les enzymes amylases d'origine végétale.....	8
C.3. LAIT DE MALT	10
a) Définitions	10
C.4. LES SUCRES REDUCTEURS.....	11
a) Définitions	11
b) Dextrines	11
c) Le maltose	11
d) Le D-glucose	11
D. FERMENTATION.....	12
D.1. DEFINITION	12
C.2. FERMENTATION ALCOOLIQUE	12
E. DISTILLATION.....	13
E.1. DEFINITION.....	13
F. LE BIOETHANOL	13
E.2. DEFINITION.....	13
E.3. CARACTERISTIQUE	13
 MATERIELS ET METHODES	
A. PREPARATION DE LA FARINE DE MANIOC	15
B. HYDROLYSE.....	16
B.1. GERMINATION DES GRAINS DE CEREALES	16
a) Germination <i>in vitro</i>	16

b) Germination <i>in vivo</i>	17
B.2. PREPARATION DU LAIT DE MALT	17
a) Préparation du lait de malt <i>in vitro</i>	17
b) Préparation du lait de malt <i>in vivo</i>	17
B.3. HYDROLYSES ENZYMATIQUES	17
a) Hydrolyse <i>in vitro</i>	18
♦ Hydrolyse A- Variation de la suspension	19
♦ Hydrolyse B- Variation du pH.....	19
♦ Hydrolyse C- Variation de la température	19
♦ Hydrolyse D- Variation de la durée	20
♦ Hydrolyse enzymatique : contre essai	20
b) Hydrolyse <i>in vivo</i>	21
♦ Application des paramètres testés en laboratoire en milieu artisanal	21
B.4. DOSAGE DES SUCRES FERMENTESCIBLES	21
a) Dosage des sucres fermentescibles des échantillons issus des hydrolyses <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> par D.N.S	22
C. FERMENTATION	23
a) Fermentation des moûts issus de l'hydrolyse <i>in vitro</i>	24
b) Fermentation des moûts issus de l'hydrolyse <i>in vivo</i>	24
D. DISTILLATION	24
a) DISTILLATION DES MOUTS ISSU DE LA FERMENTATION <i>IN VITRO</i> ET <i>IN</i> <i>VIVO</i>	25

F.	BIOETHANOL	26
RESULTATS ET INTERPRETATIONS		
A.	MANIOC	27
	A.1. RENDEMENT DE TRANSFORMATION DE TUBERCULE DE MANIOC SEC EN FARINE.....	27
B.	HYDROLYSE	27
	B.1. RESULTATS DES HYDROLYSES <i>IN VITRO</i>	27
	a) Evolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction de la suspension poids/volume.....	27
	b) Evolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction du pH.....	28
	c) Evolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction de la température	29
	d) Evolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction de la durée	30
	e) Résultat final de l'hydrolyse effectuée <i>in vitro</i>	31
	B.2. RESULTATS DES HYDROLYSES <i>IN VIVO</i>	31
C.	FERMENTATION	32
	C.1. RESULTATS DE LA FERMENTATION <i>IN VITRO</i>	33
	C.2. RESULTATS DE LA FERMENTATION <i>IN VIVO</i>	34
D.	DISTILLATION	35
	D.1. DOSAGE DU BIOETHANOL <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>	36
E.	BIOETHANOL	36
	F.1. CALCUL DU RENDEMENT PRATIQUE EN BIOETHANOL	37
	F.2. RENDEMENT PRATIQUE DU BIOETHANOL <i>IN VITRO ET IN VIVO</i>	37
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		
		39

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES & WEBOGRAPHIES 40

ANNEXES

RESUME

GLOSSAIRE

Alcool isobutylique	: Alcool primaire de formule brute $C_4H_{10}O$, isomère du butanol.
Alcool propylique	: Alcool secondaire de formule brute C_3H_8O , isomère du propanol
Déperdition	: Perte de chaleur d'un local ou d'un bâtiment vers l'extérieur ou d'un local vers des locaux non chauffés.
Distillat	: Liquide obtenu par condensation de la vapeur recueillie en fin de distillation.
Enzyme	: Protéines permettant d'accélérer les réactions biochimiques sans se modifier elles-mêmes et sans modifier les composants qui participent à cette réaction.
Hydrolyse	: Décomposition chimique d'une substance par l'action directe ou indirecte de l'eau, de façon qu'il apparaisse de nouvelles molécules.
Pouvoir diastasique	: Activité des enzymes hydrolases notamment les amylases à hydrolyser les molécules d'amidon à une température commune.
Suspension	: Mélange d'un solvant et d'un soluté exprimé en pourcentage (%) donnant une solution homogène.

LISTE DES ABREVIATIONS

°Brix	: Degré Brix .
CO₂	: Dioxyde de carbone.
D.N.S	: Acide Dinitro 3,5- Salicylique.
D.O	: Densité Optique .
DRT	: D épartement de R echerche T echnologique.
FAO	: F ood and A griculture O rganisation (organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture).
FOFIFA	: FO ibe FI karohana ho F ampandrosoana ny eny A mbanivohitra.
°GL	: Degré GAY-LUSSAC
L.S.A	: L evure S èche A ctive.
MEB	: M icroscope E lectronique à B alayage.
Nm	: Nanomètre.
P/v	: P oids / V olume.
pH	: P otentiel d' H ydrogène.

LISTES DES FIGURES

FIGURE 1 : Formes et tailles des granules d'amidon de riz (a)et de manioc (b).	5
FIGURE 2 : Structure et ultra structure d'un grain d'amidon classique	5
FIGURE 3 : Photographie et représentation schématique d'un grain d'amidon	6
FIGURE 4 : Schéma de la structure chimique de l'amylose	6
FIGURE 5 : Schéma simplifié de la structure chimique de l'amylopectine	7
FIGURE 6 : Structure chimique des modes d'action des enzymes.	9
FIGURE 7 : Structure chimique des modes de coupure des enzymes	9
FIGURE 8 : Représentation schématique de l'action des amylases	10
FIGURE 9 (a) : Représentation chimique du maltose	11
FIGURE 9 (b) : Structure en chaise du maltose	11
FIGURE 10 : Projections du D-glucose.....	10
FIGURE 11 : Etapes d'élaboration du bioéthanol.	14
FIGURE 12 : Diagramme de fabrication de la farine de manioc.....	15
FIGURE 13 : Diagramme représentant les détails de fabrication de bioéthanol.	26
FIGURE 14 : Evolution de la concentration en sucres réducteurs dans le moût obtenu à partir de l'hydrolyse utilisant le paddy germé.	33

FIGURE 15 : Evolution de la concentration en sucres réducteurs dans le moût obtenu à partir de l'hydrolyse utilisant l'orge germée..... 33

FIGURE 16 : Evolution de la concentration en sucre réducteur dans le moût obtenu en milieu artisanal 35

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Superficies et production de riz, de manioc et de maïs au niveau national	3
Tableau II : Composition des tubercules de manioc	4
Tableau III : Les conditions optimales d'action des enzymes dégradent l'amidon	10
Tableau IV : Variation de la suspension (p/v) en fixant le pH, T° et temps	19
Tableau V : Variation du pH en fixant la suspension (p/v), T° et temps	19
Tableau VI : Variation de la température en fixant le pH, la suspension (p/v), et temps	20
Tableau VII : Variation du temps en fixant la température, le pH et la suspension (p/v).....	20
Tableau VIII : Contre essai	20
Tableau IX : Evolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction de la suspension poids/volume.....	27
Tableau X : Evolution de la concentration en sucres réducteurs en fonction du pH.	28
Tableau XI : Evolution du sucre réducteur formé en fonction de la température	29
Tableau XII : Evolution du sucre réducteur formé en fonction de la durée.....	30
Tableau XIII : Résultat final de l'hydrolyse <i>in vitro</i>	31
Tableau XIV : Application des paramètres optimums identifiés <i>in vivo</i>	31
Tableau XV : Evolution de la fermentation <i>in vitro</i> à base de paddy	32
Tableau XVI : Evolution de la fermentation <i>in vitro</i> à base d'orge.....	32

Tableau XVII : Evolution de la densité et du °Brix du moût en fonction du nombre de jour de fermentation réalisé en milieu artisanal.....	34
Tableau XVIII : Degré alcoolique des distillats <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	36
Tableau XIX : Rendements pratiques de bioéthanol obtenu <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	37

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Principe de la mesure d'un moût avec un réfractomètre.

Annexe 2 : Utilisation et mesure d'un liquide alcoolisé avec un densimètre.

Annexe 3 : Broyeur industriel Hong Yuang.

INTRODUCTION GENERALE

Il est prouvé actuellement que le principal facteur de réchauffement climatique est l'accumulation des gaz à effet de serre, dont principalement le gaz carbonique né des combustions de carburants fossiles [FAO \(2006\)](#). Le biocarburant liquide est une solution pouvant remplacer les combustibles fossiles dont les prix ne cessent d'augmenter en raison de la crise énergétique globale et dont l'épuisement des réserves est imminent.

Le manioc est considéré comme source potentielle pour la production commerciale du bioéthanol en raison de sa disponibilité et de son bas prix au niveau du marché. Il peut être employé comme source de base pour soutenir la production biologique à grande échelle du bioéthanol.

La production d'éthanol se fait de deux façons différentes en général, la synthèse à partir d'hydrocarbures et celle à partir de biomasse. Seule cette deuxième façon de procéder mérite l'appellation « bioéthanol ». En effet la farine issue du tubercule de manioc renferme de l'amidon, et à partir de cet amidon, il est possible d'avoir différents produits pour la génération d'énergie. Le bioéthanol s'obtient soit par hydrolyse acide soit par l'intervention de différentes enzymes sur l'amidon, suivie d'une fermentation de sucres libérés produisant de l'alcool avec un degré initialement faible pouvant être augmenté plus tard par distillation.

L'amidon est l'une des matières organiques les plus répandues dans le monde végétal, où il constitue la réserve nutritionnelle des organismes ; il est constitué de deux parties distinctes : l'amylose et l'amylopectine avec des proportions inégales par leur nature et leur rapport.

A Madagascar, l'entreprise OBIO HAMY, récemment créée en Octobre 2015 se lance dans la production du bioéthanol, en utilisant le manioc comme matière première afin d'hydrolyser l'amidon que ce dernier renferme.

Dans un souci de rendement, l'entreprise OBIO HAMY a voulu déterminer l'efficacité de différents types d'hydrolyses : chimique et enzymatique. L'objectif de notre recherche est de savoir quels sont les paramètres et les conditions optimales des hydrolyses enzymatiques réalisées avec des céréales germées.

Dans ce document après l'introduction générale, une synthèse bibliographique sera présentée dans la première partie. La seconde décrit les matériels et méthodes utilisés. La troisième résume les résultats obtenus avec les interprétations et enfin une conclusion générale termine le travail suivi des perspectives envisagées.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. LE MANIOC

A.1. ORIGINE

Le manioc de son nom scientifique *Manihot esculenta* est une plante à racines, originaire de l'Amérique du Sud MUCHNIK ; VINCK (1984). Il a été introduit à Madagascar en 1875, cultivé sur les hauts plateaux de l'Imerina central. Le manioc est en ce jour cultivé dans toutes les régions tropicales où ses tubercules deviennent une principale source d'amidon RAKOTONDRABE (2005).

A.2. DESCRIPTION

C'est un arbuste de structure ligneuse, ramifié et vivace, sa taille peut atteindre une hauteur de 5 mètres. Les feuilles du manioc sont larges, lobées, spiralées de forme variable. Durant sa croissance les arbrisseaux produisent de nombreuses racines qui sont tubéreuses et peuvent atteindre jusqu'à un mètre de long, pesant jusqu'à 40 kg JUSTIN (2015). Sa production mondiale s'établit désormais à quelques 200 millions de tonnes par an FAO (2006). Le manioc supporte différentes conditions de culture, à savoir la sécheresse et les sols infertiles CEBALLOS (2006).

A.3. SYSTEMATIQUE

La classification du manioc est la suivante :

Règne	: VEGETAL
Sous règne	: PHANEROGAMES
Embranchement	: ANGIOSPERMES
Classe	: DICOTYLEDONES
Ordre	: EUPHORBIALES
Famille	: EUPHORBACEAE
Genre	: <i>Manihot</i>
Espèce	: <i>esculenta crantz</i>

A.4. REPARTITION DE LA PRODUCTIVITE DU MANIOC

A Madagascar, le manioc se trouve dans presque toutes les régions de la grande île. Le manioc occupe 350.000 ha de la surface cultivée, avec un rendement de 4 à 7 t/ha en fonction des techniques culturales et du milieu d'implantation.

Le tableau I présente l'évolution de superficies cultivées et de la production de manioc par rapport à d'autres principales cultures vivrières tel que le riz et le maïs au niveau national de 1998 à 2001

Tableau I. Superficies et production de riz, de manioc et de maïs au niveau national

Culture		1998	1999	2000	2001
Riz	Superficie (ha)	1 203 000	1 207 500	1 209 300	1 212 650
	Production (t)	2 447 210	2 570 000	2 480 470	2 662 465
Manioc	Superficie (ha)	360 000	351 600	351 730	351 985
	Production (t)	2 432 000	2 461 000	2 463 360	2 509 740
Maïs	Superficie (ha)	186 000	191 000	192 135	193 270
	Production (t)	155 000	170 172	169 800	179 550

Source : [RANAIVOSON \(2010\)](#)

Le manioc prend la 2^{ème} place après le riz du point de vue tonnages et superficies en 1998 – 2001. D'autre part, le milieu de culture du manioc décroît par rapport à celle du riz et du maïs qui augmente.

A.5. COMPOSITION BIOCHIMIQUE DU MANIOC

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

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

Tableau II : Composition des tubercules de manioc

Composant	Tubercules (matière fraîche en %)	Matière sèche (en %)
Eau	66,2	0,009
Amidon	27,5	81,5
Saccharose	1,0	3,0
Glucose	0,4	1,1
Fructose	0,3	0,8
Protéines	0,4	1,3
Matières grasses	0,2	0,6
Eléments minéraux	0,8	2,5
HCN (ppm)	150 - 300	300 – 900

Source : [ASIEDU \(1991\)](#)

A.6. UTILISATION DU MANIOC ET CONSERVATION

Le manioc a au moins 300 variétés différentes et est groupé en deux catégories : douces et amères [ACCT-STECH \(1981\)](#) ; [RAMARJAONA \(2001\)](#). Le manioc à différente utilisation, alimentaire ou non, l'être humain est le plus grand consommateur de manioc tant frais que séché. Au niveau de la conservation, le séchage est la plus utilisée.

Les tubercules de manioc sont très utilisés comme matières premières dans le domaine industriel pour la fabrication de divers produits : adhésif, textile, papier et du bioéthanol. [RAKOTONDRABE \(2005\)](#).

B. L'AMIDON

B.1. DEFINITION

L'amidon est un polysaccharide d'origine végétale, dont 30 – 70 % des céréales, 60 - 90 % dans les tubercules et les légumineuses 25 à 50 %. [BOURSIER \(2005\)](#).

Les grains d'amidon sont sphéroïdes (**FIGURE 1**), constitués par : l'amylose et l'amylopectine. La structure des grains d'amidon est formée de couches concentriques

alternées claires et sombres entourant un centre plus foncé appelé « hile » qui est le centre initial de croissance du grain [ANGELLIER \(2005\)](#). Les granules d'amidon ont la forme d'une croix noire dite « croix de Malte », d'où leur organisation semi-cristalline [ADRIAN *et al*, \(1995\)](#). Les zones amorphes contiennent un ensemble cristallin composé d'amylopectine, ces ensembles dispersés dans l'amylose constituent avec les complexes amylose-lipides les parties amorphes du granule. L'analyse par diffraction au rayon X montre que l'amidon est un polymère semi-cristallin [WALISZEWSKI \(2003\)](#).



FIGURE 1 : Formes et tailles des granules d'amidon de riz (a)et de manioc (b), (MEB grossissement $\times 280$) d'après [ATKIN \(1999\)](#).

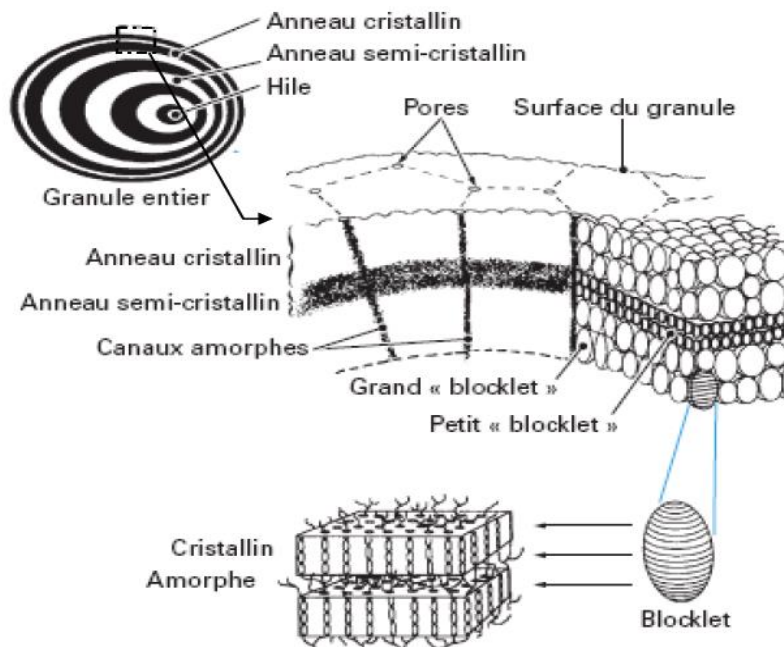


FIGURE 2 : Structure et ultra structure d'un grain d'amidon classique d'après [LEVEQUE *et al* \(2000\)](#).

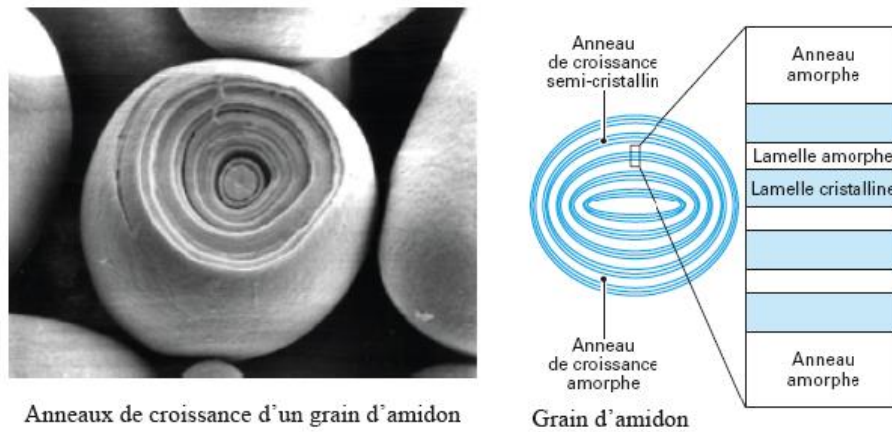


FIGURE 3 : Photographie et représentation schématique d'un grain d'amidon d'après [JENKINS ; DONALD \(1998\)](#).

B.2. L'AMYLOSE

L'amylose représente 34 % de la masse de l'amidon. C'est un polymère linéaire de résidus de glucose liés par une liaison α -(1,4) D-glycosidique [MÜNZING \(1991\)](#). La chaîne est constituée de 6 résidus de glucose par tour d'hélice, stabilisée par des liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyles et les molécules d'eau. Le maltose (diholoside) est libéré par hydrolyse de l'amylose. [HORTON \(1994\)](#).

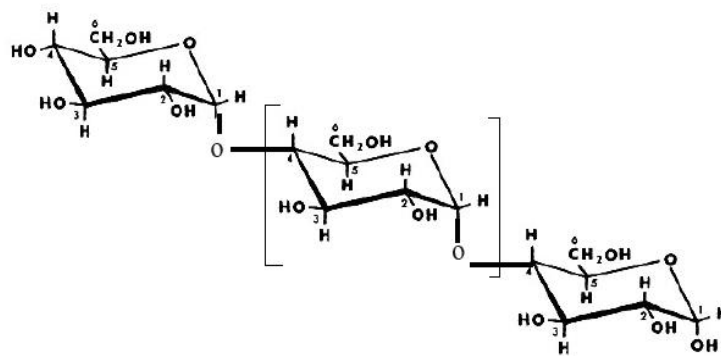


FIGURE 4 : Schéma de la structure chimique de l'amylose d'après [BULEON \(2001\)](#).

B.3. L'AMYLOPECTINE

L'amylopectine représente 76 % de la masse de l'amidon. L'amylopectine est une macromolécule de structure ramifiée (**FIGURE 5**). Elle est formée par la polymérisation d'un seul monomère D-glucose, liée principalement par des liaisons α (1-4) D-glucosidiques et quelques liaisons α (1-6) D-glucosidiques [WHISTLER ; DANIEL \(1984\)](#).

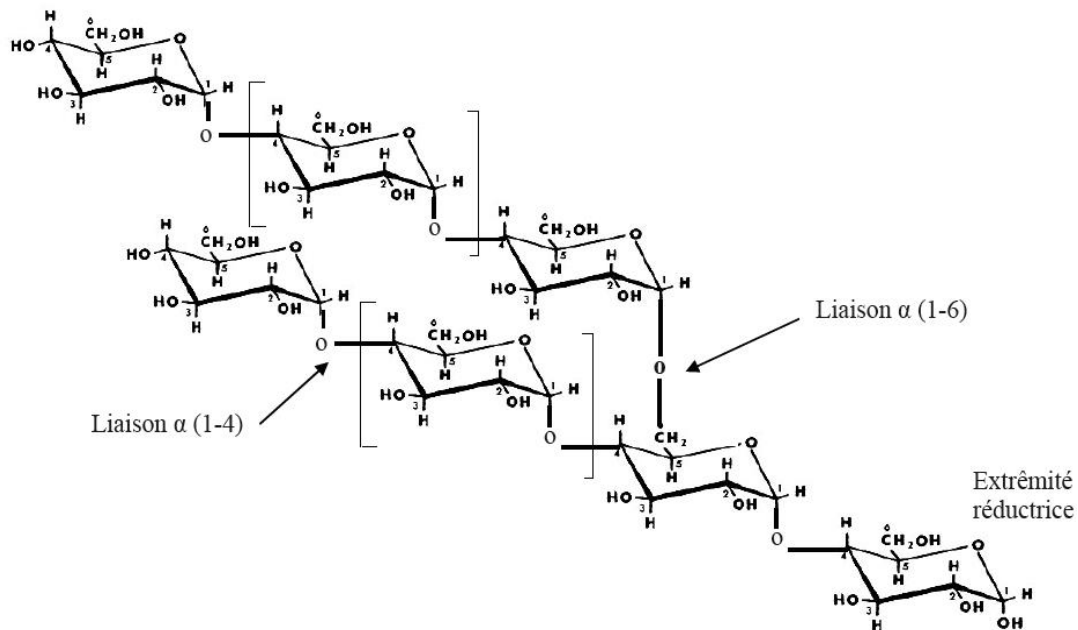


FIGURE 5 : Schéma simplifié de la structure chimique de l'amylopectine avec ramification d'après [BULEON \(2001\)](#).

B.4. INTERACTIONS ENTRE L'AMYLOSE DE L'AMIDON ET LES LIPIDES

Les lipides sont présents à l'extérieur et l'intérieur des grains d'amidon. Les lipides à la surface des amidons (les céréales) sont des triglycérides et les lipides à l'intérieur sont des phospholipides. La fraction lipidique est différente suivant l'origine botanique de l'amidon [HUBLIN \(1994\)](#). Tous les lipides internes sont capables de former des complexes avec l'amylose. L'existence de lipides modifie le comportement thermique des amidons [BAHRANI \(2012\)](#). Les complexes amylose – lipides formés dans le granulé sont peu solubles, ce complexe retarde le gonflement des granules jusqu'à ce que la température soit supérieure à 85 °C. Les effets des lipides endogènes sur le gonflement sont faibles par rapport à ceux des lipides exogènes [CAYOT \(2000\)](#).

C. HYDROLYSE

C.1. DEFINITION

L'hydrolyse est une transformation chimique dans laquelle une molécule organique, RX, réagit avec de l'eau, donnant une nouvelle liaison avec l'OH et l'élimination de -X. La réaction nette est le déplacement de X par l'OH [DRAPON, \(1981\)](#) ; [BEJ et al \(2008\)](#). Dans le cas de l'hydrolyse de l'amidon, le but est d'obtenir des monomères, principalement des glucoses. Il existe deux grands types d'hydrolyse : l'hydrolyse acide et l'hydrolyse enzymatique. [LELOUP et al \(1990\)](#).

a) L'hydrolyse chimique

L'hydrolyse acide est une réaction catalysée par de l'acide chlorhydrique ou de l'acide sulfurique. ROMANO (2005) ; BADGER (2002).

b) L'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est une réaction catalysée par des enzymes de la classe des hydrolases, produites par des céréales germées KUNLAN (2001). Ces enzymes dégradent l'amidon, détruisant ses chaînes complexes en monomères simples. Contrairement à l'hydrolyse acide, l'hydrolyse enzymatique est spécifique. Les enzymes, appelées amylases attaquent donc spécifiquement certaines liaisons d'une molécule BADGER (2002).

C.2. LES AMYLASES

a) Les enzymes amylases d'origine végétale

La Beta (β)-amylase

La Beta (β)-amylase, se trouve dans l'albumen amylic des grains de céréales germées. Elle s'attaque aux extrémités non réductrices des chaînes de glucose, au niveau des liaisons alpha (α : 1-4), en libérant du bêta-maltose MACARRON (1992). Selon le milieu, elle dégrade complètement les chaînes d'amylose et de façon partielle l'amylopectine, car son action est bloquée au niveau des liaisons alpha (α : 1-6) ; seules, les extrémités de l'amylopectine sont coupées correspondant à 60 % de maltose DRAPON (1981). La partie non dégradée est constituée par des dextrines ramifiées appelées bêta-dextrines limites.

L'Alpha (α)-amylase

L'Alpha (α)-amylase est une enzyme qui liquéfie les empois et fournit des dextrines à chaînes courtes MURALIKRISHNA (2005). L'Alpha (α)-amylase attaque les liaisons alpha (α : 1-4), à l'exclusion des liaisons terminales et des autres types de liaison. Selon leur origine botanique elles varient dans leur condition d'action. HOPKINS ; KULKA (1957). L'hydrolyse par l'Alpha (α)-amylase des molécules ramifiées est plus approfondie que celle de la Beta (β)-amylase, les chaînes externes et internes pouvant être attaquées simultanément. DRAPON (1981).

Le Glucoamylase

C'est une amylase qui coupe les dernières liaisons alpha-1,4-glycosidique à l'extrémité non réductrice de l'amylose et de l'amylopectine pour avoir une simple molécule de glucose. Dans le cas de l'amylopectine le glucoamylase hydrolyse aussi les liaisons alpha-1-6-glycosidique KONSOUA *et al* (2007).

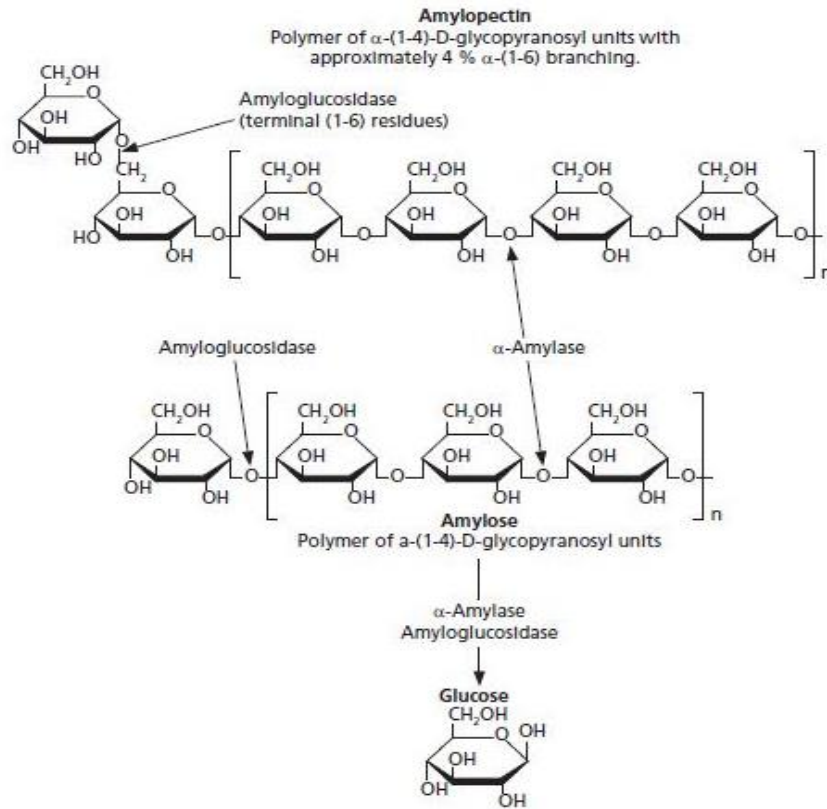


FIGURE 6 : Structure chimique des modes d'action des enzymes : Alpha (α)-amylase, Glucoamylase sur l'amylopectine et l'amylose de l'amidon. [JVO \(2016\)](#).

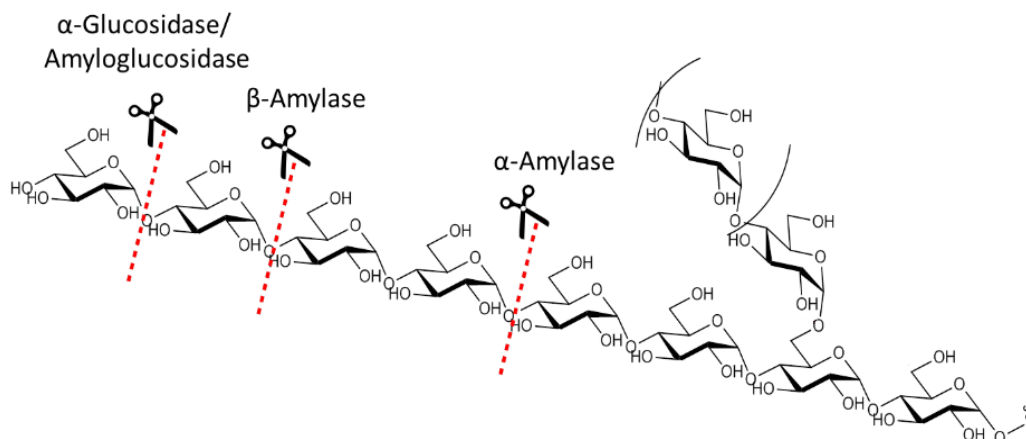


FIGURE 7 : Structure chimique des modes de coupure des enzymes : Beta (β)-amylase, Alpha (α)-amylase, et Glucoamylase sur l'amylose d'amidon. [BARRY ; McCLEARY \(2012\)](#).

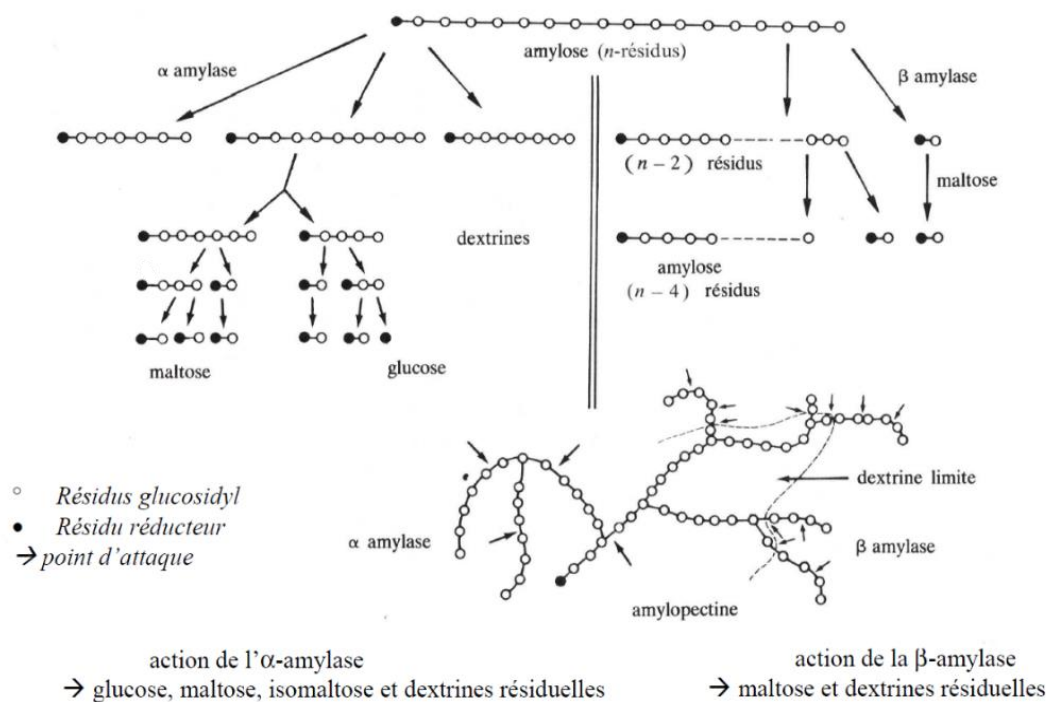


FIGURE 8 : Représentation schématique de l'action des amylases. Les cercles noirs indiquent les sucres réducteurs. [SIEW \(2012\)](#).

LES CONDITIONS D'ACTION DES ENZYMES DEGRADANT L'AMIDON

Tableau III : Les conditions optimales d'action des enzymes dégradent l'amidon. [MOLL \(1991\)](#)

<u>Enzyme</u>	<u>pH optimum</u>	<u>Température optimale (°C)</u>	<u>Température d'inactivation</u>	<u>Action sur les liaisons/composés</u>
α -amylase	5,3 – 5,8	62 – 75	80 – 85	α - 1,4 (endo)
β -amylase	5,2 – 5,6	52 – 60	68 – 70	α - 1,4 (exo)
Glucoamylase	4,5	-	-	Maltose

C.3. LAIT DE MALT

a) Définitions

Le lait de malt correspond à la céréale germée broyée, mélangée avec de l'eau donnant une bouillie. La germination du paddy est dirigée artificiellement dans des conditions d'environnement créées [RAKOTOSAONA et al. \(2015\)](#).

C.4. LES SUCRES REDUCTEURS

a) Définitions

Un ose est réducteur si sa forme à chaîne ouverte comporte une fonction aldéhyde ou un groupe hémiacétal libre. Les aldoses, monosaccharides contenant une fonction aldéhyde qui peut être oxydée, font partie de cette famille [CAMPBELL ; FARRELL \(2012\)](#). Par contre si le groupement (-OH) hémiacétalique est lié, l'ose est qualifié de sucre non réducteur.

b) Dextrines

Les dextrines sont des glucides solubles et amorphes, de formule brute $(C_6H_{10}O_5)_n$. Ce sont des produits incolores en solution et dextrogyres. Elles sont obtenues par dessiccation, hydrolyse acide ou enzymatique de l'amidon [FRENCH \(1984\)](#).

c) Le maltose

Le maltose ou α -D-glucopyranosyl-1,4-D-glucopyranose, sa formule brute est $C_{12}H_{22}O_{11}$. Le maltose appelé aussi sucre de malt, est un produit de la dégradation enzymatique de l'amidon. Le maltose est un sucre réducteur. Son pouvoir sucrant est faible (40 % de celui du saccharose). [BAHRANI \(2012\)](#).

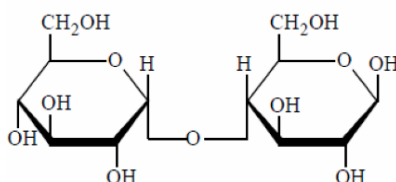


FIGURE 9 (a) : Représentation chimique du maltose

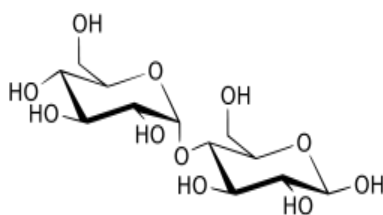


FIGURE 9 (b): Structure en chaise du Maltose.

d) Le D-glucose

Le D-glucose est le sucre physiologique par excellence de formule brute $C_6H_{12}O_6$, il est sous forme polycondensée dans l'amidon [MELVIN \(1979\)](#) ; [ZOBEL \(1984\)](#). Le D-glucose est obtenu par hydrolyse enzymatique du maltose. Chimiquement, le D-glucose possède un

pouvoir réducteur élevé. Le pouvoir sucrant du D-glucose ne représente que 70 % de celui du saccharose. LOUISOT *et al* (1999).

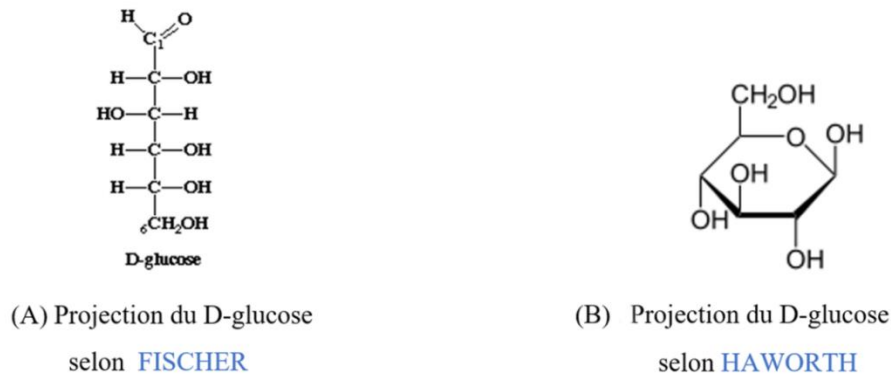


FIGURE 10 : Projections du D-glucose

D. FERMENTATION

D.1. DEFINITION

La fermentation est une réaction biochimique qui conduit à la transformation de substrat organique à un métabolite particulier, la réaction étant anaérobie ELIASSON (1983). L'ensemble des processus de la fermentation s'effectue sous l'influence de microorganismes tels que les levures et les bactéries sur des composés fermentescibles. La fermentation à un faible rendement énergétique et la diversité des produits synthétisés le diffère par rapport à la respiration. DEMEYER *et al* (1981).

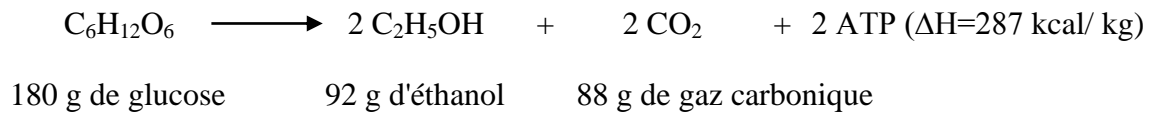
C.2. FERMENTATION ALCOOLIQUE

L'un des microorganismes le plus utilisé est la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle effectue la fermentation alcoolique dont les produits terminaux sont l'alcool et le gaz carbonique. SCRIBAN (1982).

CLASSIFICATION DE LA LEVURE :

Règne	: VEGETAL
Sous règne	: THALLOPHYTES
Embranchement	: EUMYCETES
Classe	: ASCOMYCETES
Ordre	: ENDOMYCETALES
Famille	: SACCHAROMYCETACEAE
Genre	: <i>Saccharomyces</i>
Espèce	: <i>cerevisiae</i>

GAY-LUSSAC en 1815, définit l'équation chimique de la réaction globale de la fermentation alcoolique :



Théoriquement, la fermentation alcoolique a un rendement de $92/180 = 0,511$ c'est-à-dire que 1g de glucose produit 0,511 g d'alcool. Mais en pratique, la synthèse des cellules et la formation des produits secondaires qui sont des accessoires de la fermentation limite le rendement [MARILLERS \(1951\)](#) ; [FAHRASMANE \(1997\)](#). Par conséquent, le taux de conversion maximal du sucre en alcool se situe généralement entre 91 et 95 % du rendement attendu [SCRIBAN \(1993\)](#) ; [RANDRIAMANANTENA \(2006\)](#).

E. DISTILLATION

E.1. DEFINITION

La distillation est un procédé de séparation du mélange de substances liquides dont les températures d'ébullition sont différentes. Elle permet de séparer les constituants d'un mélange homogène. Sous l'effet de la chaleur ou d'une faible pression (loi des gaz parfaits), les substances se vaporisent successivement, et la vapeur obtenue est liquéfiée pour donner le distillat [LEACH ; SCHOCH \(1961\)](#).

F. LE BIOETHANOL

E.2. DEFINITION

Le bioéthanol est un alcool éthylique obtenu grâce à des transformations de biomasse : céréales et tubercules. C'est un liquide incolore, volatil, inflammable et miscible à l'eau [RUSSEL \(1987\)](#). Le bioéthanol est un sous-produit du métabolisme des levures, et est donc présent dans l'habitat de ces organismes.

E.3. CARACTERISTIQUE

L'éthanol est un alcool primaire à deux carbones de formule brute $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ et de formule semi-développée $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ou $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$, indiquant que le carbone du groupe méthyle ($\text{CH}_3\text{-}$) est attaché au groupement méthylène ($\text{-CH}_2\text{-}$) qui est attaché au groupement hydroxyle (-OH). C'est un isomère de constitution de l'éther méthylique [MOSS \(1996\)](#). L'éthanol est usuellement désigné par l'abréviation « Et-OH », le groupement éthyle ($\text{C}_2\text{H}_5\text{-}$) étant communément abrégé « Et » en chimie organique.

La fabrication générale du bioéthanol est représentée par le diagramme suivant :

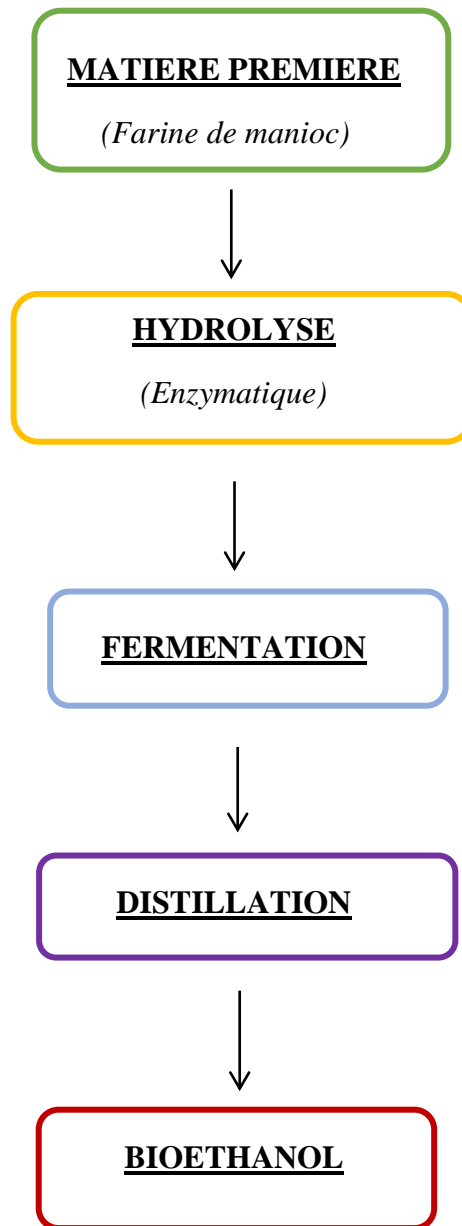


FIGURE 11 : Etapes d'élaboration du bioéthanol.

MATERIELS ET METHODES

A. PREPARATION DE LA FARINE DE MANIOC

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

○ MATERIELS

Tubercule de manioc sec.

○ METHODES

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

Collecte de la matière première

(Tubercule de manioc sec)

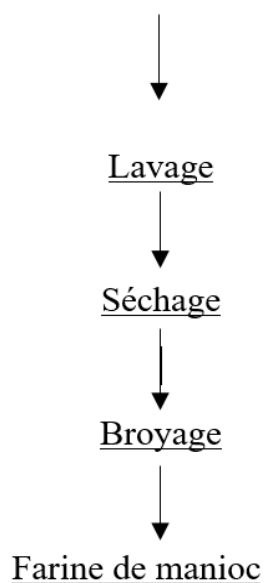


FIGURE 12 : Diagramme de fabrication de la farine de manioc.

L'échantillon de farine obtenue après broyage pesant 3 kg est mis dans un bocal, puis placé dans un milieu sec pour être conservé, la farine de manioc servira comme source d'amidon lors des hydrolyses enzymatiques.

B. HYDROLYSE

Deux catégories de procédé ont été adoptées pendant les manipulations : la première est l'hydrolyse *in vitro* et la deuxième *in vivo*.

B.1. GERMINATION DES GRAINS DE CEREALES

Le développement des grains de céréales augmente l'activité des enzymes qu'ils contiennent. Ci-dessous sont présentées les opérations qui ont été réalisées pour la germination des grains de paddy et orge.

○ MATERIELS

Balance de précision

Boîtes de Pétri

Coton

Eau distillée

Etuve réglée à 25 °C

Paddy X 265 180 g

Orge 180 g

○ MODES OPERATOIRES

a) Germination *in vitro*

100 g de paddy X265 ou 100 g d'orge ont été pesés sur une balance de précision, puis, déposés respectivement en fine couche dans des boîtes de Pétri où ont été mis au préalable des cotons imbibés d'eau distillée, les boîtes sont ensuite placées dans une étuve réglée à 25 °C. L'eau de germination est renouvelée toutes les 24 h jusqu'à ce que la longueur de la radicule atteigne 3 cm.

b) Germination *in vivo*

Pour la germination en moyenne quantité, 800 g d'orge ont été pesés sur une balance ordinaire, puis étalés sur un support en plastique ; le tout est ensuite placé dans un milieu sombre, les grains sont arrosés avec de l'eau toutes les 24 h pendant 3 jours jusqu'à l'apparition des radicules mesurant 3 cm.

B.2. PREPARATION DU LAIT DE MALT

Les enzymes dans les grains germés sont libérés pour être utilisés lors des hydrolyses ; ci-dessous sont présentées les étapes qui ont été entreprises.

○ MATERIELS

Mixer Moulinex de capacité 1,5 L

Eau distillée 360 ml

Eau de robinet 1,6 L

Papier filtre

Eprouvette graduée

Becher 600 ml

Seau de capacité 12 L

Mortier

Orge germée 180 g

Paddy germé 180 g

○ MODES OPERATOIRES

a) Préparation du lait de malt *in vitro*

Dans un bêcher de 600 ml ; 180 g d'orge ou 180 g de paddy germé sont additionnés à 360 ml d'eau distillée, le tout est ensuite broyé au mixer Moulinex de capacité 1,5 L. Après filtration la solution est versée dans une bouteille de 1 L pour être stockée.

b) Préparation du lait de malt *in vivo*

800 g d'orge germées sont broyées au mortier, puis mélangées avec 1,6 L d'eau de robinet. Le lait de malt obtenu est filtré à l'aide d'un tamis, la solution est versée dans un seau de capacité 12 L pour une utilisation ultérieure.

B.3. HYDROLYSES ENZYMATIQUES

L'hydrolyse enzymatique a été effectuée sur des petites proportions en laboratoire, puis sur des moyennes quantités dans les conditions artisanales.

- REACTIFS

Acide chlorhydrique 37 %

Soude 40 %

- MATERIELS

Farine de manioc 2,1 kg

Eau distillée 1,8 L

Eau du robinet 8 L

Becher de capacité 1 L

Lait de malt à base de paddy germé 360 ml

Lait de malt à base d'orge germée 1,96 L

Agitateur

pH-mètre

Bain marie *FISHER BLOCK SCIENTIFIC* à température réglable

Marmite de capacité 50 L

- PRINCIPE

Le principe repose sur l'étude de l'efficacité des hydrolyses en variant un seul paramètre, les autres paramètres restants sont fixes, l'optimum pour chaque paramètre est déterminé et maintenu ensuite dans l'expérience suivante.

- MODES OPERATOIRES

Les hydrolyses sont réalisées dans un appareil à bain-marie *FISHER BLOCK SCIENTIFIC* à température et durée réglables pour l'expérience *in vitro* et une marmite de 50 L pour l'application en milieu artisanal, l'abaissement ou l'augmentation du pH se fait respectivement par ajout de HCl 37 % ou de NaOH 40 %.

- a) Hydrolyse *in vitro*

Les mêmes manipulations sont adoptées pour les hydrolyses utilisant le lait de malt à base de paddy ou orge germée, les expériences ont été réalisées séparément pour pouvoir comparer leur efficacité (paddy/orge). Les tableaux des hydrolyses A, B, C et D illustrent les variations de chaque paramètre.

◆ **Hydrolyse A- Variation de la suspension**

Les suspensions (p/v) 16 %, 21 % et 31 % sont additionnées respectivement avec 80 ml, 120 ml et 180 ml de lait de malt. Le tableau suivant montre les paramètres variés et ceux qui ont été fixés.

Tableau IV : Variation de la suspension (p/v) en fixant le pH, T° et temps

Paramètre varié	Paramètres fixés		
Suspension (p/v)	pH	Températures	Durées
16 % (100 g/800 ml)	5,4	62 °C	30 min
21 % (100 g/600 ml)	5,4	62 °C	30 min
31 % (100 g/400 ml)	5,4	62 °C	30 min

◆ **Hydrolyse B- Variation du pH**

La suspension (p/v), la température et la durée ont été respectivement fixées à 31 %, 62 °C et à 30 min. Le pH quant à lui a été varié, en le ramenant à 4,7 ; puis ramené à 5,4 et enfin à 6. Le tableau suivant illustre cette variation du pH.

Tableau V : Variation du pH en fixant la suspension (p/v), T° et temps

Paramètre varié	Paramètres fixés		
pH	Durées	Températures	Suspension (p/v)
4,7	30 min	62°C	31 % (100 g/400 ml)
5,4	30 min	62°C	31 % (100 g/400 ml)
6	30 min	62°C	31 % (100 g/400 ml)

◆ **Hydrolyse C- Variation de la température**

La suspension (p/v) a été fixée à 31 %, la durée à 30 min et le pH à 5,4. Par contre la température a été variée, en la ramenant à 45 °C, 62 °C et à 75 °C ; ci-dessous est représenté le tableau montrant la variation de la température.

Tableau VI : Variation de la température en fixant le pH, la suspension (p/v), et temps

Paramètre varié	Paramètres fixés		
Températures	pH	Durées	Suspension (p/v)
45 °C	5,4	30 min	31 % (100 g/400 ml)
62 °C	5,4	30 min	31 % (100 g/400 ml)
75 °C	5,4	30 min	31 % (100 g/400 ml)

◆ **Hydrolyse D- Variation de la durée**

La durée de l'hydrolyse a été variée en le ramenant à 15 min, puis à 30 min et à 60 min à la fin de l'expérience, par ailleurs la suspension (p/v), la température et le pH sont respectivement fixés à 31 %, 62 °C et à 5,4 ; le tableau suivant montre la variation de la durée.

Tableau VII : Variation du temps en fixant la température, le pH et la suspension (p/v)

Paramètre varié	Paramètres fixés		
Durées	pH	Suspension (p/v)	Températures
15 min	5,4	31 % (100 g/400 ml)	62 °C
30 min	5,4	31 % (100 g/400 ml)	62 °C
60 min	5,4	31 % (100 g/400 ml)	62 °C

◆ **Hydrolyse enzymatique : contre essai**

Les paramètres maintenus lors des hydrolyses A-B-C-D ont été réitérés dans une même expérience en vue de déterminer s'ils ont été efficaces, le tableau ci-dessous résume les paramètres qui ont été pris en compte.

Tableau VIII : Contre essai

Durée	pH	Suspension (p/v)	Température
30 min	5,4	31 % (100 g/400 ml)	62 °C

b) Hydrolyse *in vivo*

L'hydrolyse est réalisée à quantité moyenne dans les conditions réelles de fabrication par OBIO HAMY, les paramètres qui ont été opérants lors des hydrolyses *in vitro* sont testés avec des proportions plus importantes en milieu artisanal, l'efficacité des paramètres est ainsi déterminée.

◆ Application des paramètres testés en laboratoire en milieu artisanal

2 kg de farine de manioc tamisée sont introduits dans une marmite de 50 L, puis complétées avec 8 L d'eau de robinet, le mélange est ensuite acidifié par de l'acide chlorhydrique 37 % dosé par une burette graduée pour baisser le pH à 5,4 ; la mesure se fait par un pH-mètre. Ensuite 1,6 L de lait de malt sont versés dans la solution. Puis la marmite est mise sur un feu de bois, la température interne est maintenue à 62 °C durant 30 minutes.

B.4. DOSAGE DES SUCRES FERMENTESCIBLES

A la fin des hydrolyses, le dosage des sucres réducteurs est indispensable pour déterminer l'efficacité des hydrolyses. Les protocoles utilisés pour connaître la concentration des sucres réducteurs formés lors des hydrolyses en laboratoire et en milieu artisanal sont similaires.

○ REACTIFS

D.N.S (acide dinitro3, 5 - salicylique) 5 g

D-glucose 10 g

○ MATERIELS

Solution d'invertase 10 ml

Eau distillée 10 ml

Bain-marie *FISHER BLOCK SCIENTIFIC*

Bain-marie glacé

Agitateur magnétique

Centrifugeuse à 8000 tr/min

Spectrophotomètre *BIOMATE* pour la lecture de la D.O à 540 nm

Réfractomètre

- PRINCIPE

Les sucres réducteurs sont dosés selon la méthode colorimétrique au D.N.S de [HOWELL ; SUMMER \(1935\)](#). En effet, les sucres réducteurs dans le milieu sont colorés en rouge par la D.N.S et la D.O est lue via un spectromètre réglé à 540 nm, elle est proportionnelle à la quantité de sucres dans le milieu et est par la suite déterminée par référence à un courbe étalon en utilisant une solution mère de D-glucose 2 g/l.

- MODES OPERATOIRES

- a) **Dosage des sucres fermentescibles des échantillons issus des hydrolyses *in vitro* et *in vivo* par D.N.S**

Six tubes à essais ont été sélectionnés, les cinq premiers tubes sont utilisés pour établir une gamme étalon, le dernier tube est réservé pour le dosage de chaque échantillon renfermant le sucre réducteur. Les paragraphes suivants détaillent les procédures qui ont été mises en œuvre.

- ◆ **Etablissement de la gamme étalon**

Dans le premier tube à essai 10 ml d'eau distillée et 1ml de D.N.S ont été versés (le premier tube est considéré comme témoin), dans le deuxième tube : 1ml de glucose de concentration 2 g/l, 9 ml d'eau distillée et 1 ml de D.N.S, dans le troisième tube : 2 ml de glucose 2 g/l ; 8 ml d'eau distillée et 1ml de D.N.S, dans le quatrième tube : 3 ml de glucose 2 g/l ; 7 ml d'eau distillée et 1ml de D.N.S, et dans le cinquième tube : 4 ml de glucose 2 g/l, 6 ml d'eau distillée et 1 ml de D.N.S.

Les tubes sont mis dans un bain-marie *FISHER BLOCK SCIENTIFIC* à une température de 100 °C pendant 5 minutes, après cela les tubes sont placés dans un bain glacé, le volume des solutions dans les tubes sont ensuite complétés par 10 ml d'eau distillée. La concentration des sucres réducteurs des gammes étalons est lue sur un spectrophotomètre à 540 nm.

- ◆ **Préparation de la solution à doser**

Pendant les hydrolyses, 6 ml d'échantillons sont prélevés toutes les 30 minutes dans une petite capsule, 3 ml sont destinés à la lecture au réfractomètre et les 3 ml restants utilisés pour la lecture par D.N.S, ce dernier est centrifugé à 8000 tr/min pendant 4 minutes pour séparer le culot du surnageant, 1 ml de ce surnageant a été ensuite introduit dans un septième (7) tube à essai, L'échantillon prélevé a été mélangé avec 0,1 ml de solution d'invertase, et laissé au repos pendant 10 minutes, 1 ml de D.N.S et 0,8 ml d'eau distillée sont rajoutés au mélange, La solution est portée à 100 °C dans un bain-marie *FISHER BLOCK SCIENTIFIC* durant 5 minutes, puis placée dans un bain glacé, 10 ml d'eau distillée sont alors rajoutées à la solution. L'échantillon est ensuite lu au spectrophotomètre *BIOMATE* à 540 nm.

b) Dosage des moûts des échantillons issus des hydrolyses *in vitro* et *in vivo* par réfractométrie

Toutes les 30 minutes 3 ml d'échantillon sont déposées sur le prisme, permettant de lire directement l'échelle du réfractomètre compris entre 0 °Brix – 33 °Brix, grâce à une ligne de partage lumineuse et contrastée lors de la visualisation sur le guide oculaire.

C. FERMENTATION

La fermentation est une étape clé pour l'obtention du bioéthanol grâce à la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui transforme les sucres fermentescibles dans le moût ; les paragraphes suivants détaillent la réalisation des fermentations à petit et moyenne échelle.

○ MATERIELS

Eau distillée 80 ml

Eau de robinet 800 ml

Levure *Saccharomyces cerevisiae* 804 g

Etuve réglée à 25 °C

Bouteille de 1 L

Becher 1 L

Tuyaux de diamètre 0,5 cm

Tuyaux de 2 cm de diamètre

Bidon de 20 L

○ PRINCIPE

L'opération consiste en une fermentation en milieu anaérobie à pH 4,5 ; les L.S.A (levure sèche active) *Saccharomyces cerevisiae* consomment les sucres réducteurs dans le moût pour former à la fin de la réaction de l'éthanol ainsi que du dioxyde de carbone gazeux, s'échappant de la solution sous forme de bulles [DEMEYER et al \(1981\)](#). Le sucre réducteur dans le moût est mesuré toutes les 24 h par D.N.S et par réfractométrie, la fermentation est terminée quand le taux de sucre réducteur est constant.

- MODES OPERATOIRES

La fermentation des moûts *in vitro* (paddy/orge) et *in vivo* suit les mêmes protocoles mais les expériences sont toutes menées séparément.

- a) Fermentation des moûts issus de l'hydrolyse *in vitro*

375 ml de moût issu d'hydrolyse avec le lait de malt à base de paddy germé et 375 ml de moût issus de l'hydrolyse avec le lait de malt à base d'orge germée sont placés dans des bouteilles aseptisées de capacité 1 L, mélangés respectivement avec 40 ml de L.S.A préparées au préalable, les bouteilles sont fermées par des capsules dont les centres ont été percés. Un tuyau de longueur 15 cm est introduit dans la fente des capsules, l'autre extrémité des tuyaux a été entièrement introduite dans des béciers de 1 L contenant une certaine quantité d'eau, ceci a été réalisé dans le but de vérifier le dégagement des bulles de dioxyde de carbone, le tout a été ensuite mis dans une étuve réglée à 25 °C. Le dosage des sucres résiduels se fait par D.N.S et au réfractomètre.

- b) Fermentation des moûts issus de l'hydrolyse *in vivo*

1,75 L de moût ont été versés dans un bidon de 20 L additionnés avec 800 ml de L.S.A préparés au préalable, le couvercle du bidon est percé en son centre, un tuyau de 2 cm de diamètre relie le bidon avec une autre bouteille contenant une certaine quantité d'eau, l'extrémité du tuyau a été entièrement plongée dans la bouteille, le système est ensuite placé dans un milieu sombre. Le dosage de la concentration du moût est mesuré par D.N.S et par réfractomètre.

D. DISTILLATION

La distillation permet de séparer le bioéthanol de l'eau grâce à sa capacité à s'évaporer à une certaine température. Les paragraphes suivants décrivent les processus qui ont été adoptés durant la distillation.

- MATERIELS

Moût fermenté

Appareil à distillation

Ballon à fond rond de capacité 1 L

Chauffe ballon

Eprouvette graduée de capacité 250 ml

- PRINCIPE

Le procédé repose sur la différence de volatilité (capacité à s'évaporer selon la température) entre les constituants du moût afin de les séparer ; le composé plus volatil (éthanol) s'évaporerait plus facilement et composerait la majeure partie des vapeurs. Par condensation un liquide appelé distillat peut être récupéré avec une concentration élevée du composé le plus volatil. [MARILLERS et al \(1951\)](#).

- MODE OPERATOIRE

Le protocole de distillation des moûts *in vitro* et *in vivo* est identique, toutefois les moûts fermentés des hydrolyses réalisées en laboratoire (à base paddy et orge germée) et en milieu artisanal ont été distillés séparément.

- a) **DISTILLATION DES MOÛTS ISSUS DE LA FERMENTATION IN VITRO ET IN VIVO**

250 ml du moût complété avec 750 ml d'eau distillée ont été versés dans un ballon à fond rond de 2 L puis portés à ébullition ; après 30 minutes, les vapeurs qui se dégagent sont condensées à l'aide d'un réfrigérant. 250 ml de distillat ont été récupérés dans une éprouvette graduée de capacité 500 ml.

E. DETERMINATION DU DEGRE ALCOOLIQUE PAR L'ALCOOMETRE

- DEFINITION

Les alcoomètres sont des aéromètres gradués en unités de titre alcoométrique volumique à la température de 20 °C. Ces instruments sont gradués pour des lectures effectuées au niveau de la surface libre horizontale du liquide (bas du ménisque).

- MATERIELS

Alcoomètre

Eprouvettes graduées de 250 ml

Thermomètre

- MODE OPERATOIRE

Les 3 distillats contenant les mélanges hydro-alcooliques ont été versés dans 3 éprouvettes graduées de 250 ml, l'alcoomètre y est ensuite introduit après la détermination de la température qui doit être de 20 °C. Les degrés d'alcool dans les distillats issus de toutes les hydrolyses sont mesurés séparément.

F. BIOETHANOL

Plusieurs étapes obligatoires doivent être établies pour la fabrication du bioéthanol à base de manioc, l'ensemble des procédés se résume à travers le diagramme ci-dessous.

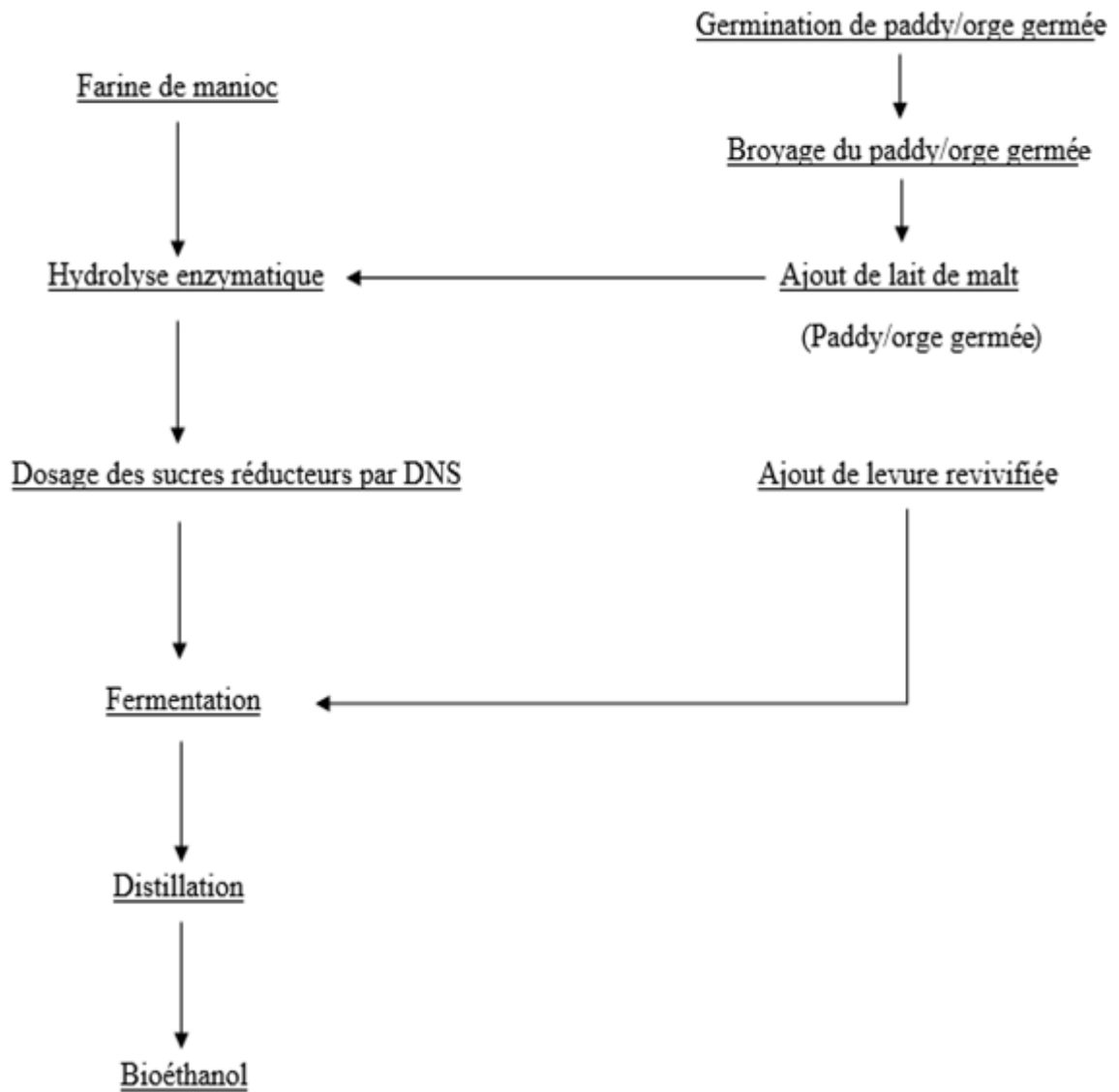


FIGURE 13 : Diagramme représentant les détails de fabrication de bioéthanol.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

A. MANIOC

A.1. RENDEMENT DE TRANSFORMATION DE TUBERCULE DE MANIOC SEC EN FARINE

80 % de la matière première ont été transformées en farine au cours du premier broyage, un second broyage de la partie restante peut être ensuite réalisé.

B. HYDROLYSE

Les résultats des hydrolyses enzymatiques sont présentés en deux parties, la première comprend l'hydrolyse réalisée en laboratoire et la seconde l'hydrolyse effectuée en milieu artisanal.

B.1. RESULTATS DES HYDROLYSES *IN VITRO*

Les hydrolyses expérimentées ont été réalisées dans le but d'obtenir un taux de sucre fermentescible élevé.

a) Evolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction de la suspension poids/volume

Le tableau IX résume les résultats de la variation de la concentration en sucres réducteurs en fonction des différents paramètres (suspension poids/volume, pH, température et la durée des hydrolyses).

Tableau IX : Evolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction de la suspension poids/volume (pH : 5,4 ; température 62 °C et la durée 30 minutes constants)

Suspension (p/v)	pH	PADDY GERME		ORGE GERMEE	
		Sucre réducteur	° BRIX	Sucre réducteur	° BRIX
31 % (100 g/400 ml)	5,4	69,02 g/l	16	81,23 g/l	17,2
21 % (100 g/600 ml)	5,4	43,34 g/l	11,2	52,96 g/l	10
16 % (100 g /800 ml)	5,4	21,11 g/l	7	44,41 g/l	9

○ INTERPRETATION

D'après le Tableau IX ; la suspension 31 % (100 gr/400 ml) donne le meilleur résultat, tant pour l'hydrolyse avec le lait de malt à base de paddy germé qu'avec l'orge germée ; ce résultat est proche à celui de [BAJERIBIGBE \(1992\)](#) qui travaillait avec 21 % de suspension et a obtenu un taux de sucre réducteur de 85 g/l.

L'hydrolyse avec le lait de malt à base de paddy germé donne des concentrations moins élevées (69,02 g/l) par rapport à l'hydrolyse dont le lait de malt est à base d'orge germée (81,23 g/l) vu les conditions optimales. Les résultats rapportés sont semblables à ceux des auteurs [BACHIROU \(2000\)](#) ; [BAJERIBIGBE \(1992\)](#) qui ont eu un résultat de 62 g/l lors de leurs travaux sur la farine de banane plantain en utilisant du lait de malt à base de paddy germé et 85 g/l pour celui à base d'orge.

b) Evolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction du pH

Le tableau X montre l'évolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction du pH en fixant la durée à 30 min, la température à 62 °C et la suspension (p/v) à 31 % (100 g/ 400 ml).

Tableau X : Evolution de la concentration en sucres réducteurs en fonction du pH (durée, température et suspension (p/v) constants).

pH	Durée	PADDY GERME		ORGE GERME	
		Sucre réducteur	° BRIX	Sucre réducteur	° BRIX
4,7	30 min	30,13 g/l	6	68,55 g/l	8
5,4	30 min	70,48 g/l	10,6	98,8 g/l	14
6	30 min	67,52 g/l	9	75 g/l	9

○ INTERPRETATION

Les résultats présentés dans le tableau X ont permis de dire que le pH = 5,4 a été favorable aux activités diastatiques des enzymes issues des 2 céréales (paddy germé et orge germée), donnant un taux assez élevé en sucre réducteur. Les mêmes observations ont amené les auteurs comme [RAKOTOSAONA et al \(2015\)](#) à adopter l'utilisation du pH = 5,4 lorsqu'ils œuvraient sur la mise au point d'un procédé de fabrication d'une boisson alcoolisée à base de manioc avec un rendement élevé 189 g/l de sucre réducteur.

c) **Evolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction de la température**

Le tableau XI illustre l'évolution des sucres réducteurs formés en fonction de la température, tandis que la suspension (p/v) est fixée à 31 %, la durée à 30 min et le pH à 5,4.

Tableau XI : Evolution du sucre réducteur formé en fonction de la température (pH, suspension (p/v) et la durée constants).

		PADDY GERME		ORGE GERME	
Températures	pH	Sucre réducteur	° BRIX	Sucre réducteur	° BRIX
45 °C	5,4	19,45 g/l	4	68,56 g/l	9
62 °C	5,4	87,5 g/l	10,2	103,7 g/l	16
75 °C	5,4	62,23 g/l	8	88,7 g/l	10

○ **INTERPRETATION**

○

La température : 62 °C est la plus efficace pour atteindre une concentration élevée de sucres réducteurs avec 87,5 g/l pour l'hydrolyse avec le paddy germé et 103,7 g/l pour l'hydrolyse avec l'orge germée. Les auteurs [MARILLERS \(1951\)](#) et [MOLL \(1991\)](#) ont travaillé sur la même température et ont trouvé une concentration de 111 g/l de sucres fermentescibles pour l'hydrolyse avec le lait de malt à base d'orge germée et 69,02 g/l pour l'hydrolyse avec le lait de malt à base de paddy germé [[BACHIROU, 2000](#)].

d) **Evolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction de la durée**

Le tableau XII représente l'évolution de la concentration en sucres réducteurs formés en fonction de la durée et que le pH, la suspension (p/v) et la température sont respectivement fixés à 5,4 ; 31 % et 62 °C.

Tableau XII : Evolution du sucre réducteur formé en fonction de la durée (pH, suspension poids/volume 100 g/400 ml et la température constants).

		PADDY GERME		ORGE GERME	
Durée	pH	Sucre réducteur	° BRIX	Sucre réducteur	° BRIX
15 min	5,4	55,23 g/l	9	67,1 g/l	8
30 min	5,4	89,65 g/l	12	107,7 g/l	14
60 min	5,4	64,9 g/l	10,6	70 g/l	10

o **INTERPRETATION**

Une durée de 30 minutes est suffisante pour avoir un taux élevé en sucres fermentescibles : 89,65 g/l pour le paddy germé et 107,7 g/l pour l'orge germée ; en effet cette durée est suffisante pour que les enzymes amylasiques fragmentent les molécules d'amidon (amylose et amylopectine) afin de libérer les sucres réducteurs, ces résultats sont conformes à ceux des auteurs [MARILLERS \(1951\)](#) et pour la production de la bière alcoolisée en opérant avec la même durée et en utilisant du lait de malt d'origine différente comme le sorgho et l'orge en ayant des concentrations en sucre fermentescible de l'ordre de 98 g/l – 100 g/l pour une suspension poids/volume égale à 35 %.

e) **Résultat final de l'hydrolyse effectuée *in vitro***

Les paramètres optimums obtenus en laboratoire sont les suivants : 30 min pour la durée, 62 °C pour la température, 31 % pour la suspension (p/v) et 5,4 pour le pH, le tableau XIII résume les résultats obtenus.

Tableau XIII : Résultat final de l'hydrolyse *in vitro*.

				PADDY GERME		ORGE GERMEE	
Durée	pH	Suspension p/v	Température	Sucre réducteur	° Brix	Sucre réducteur	° Brix
30 min	5,4	31 % (100 g/400 ml)	62 °C	119,9 g/l	16	158,19 g/l	19

INTERPRETATION

Le résultat du tableau XIII montre que la concentration en sucres réducteurs de l'hydrolyse réalisée avec le lait de malt à base d'orge germée est supérieure (158,19 g/l) à celle du paddy germé (119,9 g/l), de même pour la mesure en °Brix dont 16 pour le paddy et 19 pour l'orge germée. En effet, les hydrolases chez l'orge germée ont une activité plus élevée que celles du paddy germé [VELUPPILLAI et al \(2009\)](#). C'est la raison pour laquelle dans la suite de l'étude l'hydrolyse à base d'orge germée seule a fait l'objet d'une expérimentation à moyenne quantité.

B.2. RESULTATS DES HYDROLYSES *IN VIVO*

Le tableau XIV illustre les résultats de l'hydrolyse réalisée en milieu artisanal en se basant sur les paramètres obtenus en laboratoire.

Tableau XIV : Application des paramètres optimums identifiés *in vivo*

ORGE GERMEE					
Durée	pH	Suspension p/v	Température	Sucre réducteur	°Brix
30 min	5,4	31% (100 g/400 ml)	62 °C	150 g/l	18,4

INTERPRETATION

Le résultat obtenu dans le tableau XIV est proche du résultat attendu (tableau XIII), le taux de sucre réducteur de l'hydrolyse à base d'orge germée *in vitro* est égal à 158,19 g/l et celui de l'hydrolyse *in vivo* est de 150 g/l, la différence entre les deux valeurs est faible, c'est aussi le cas pour la mesure en °Brix du moût qui est de 19 pour l'hydrolyse réalisée en petite quantité et 18,4 pour celle à moyenne proportion, les taux en sucres des 2 moûts sont proches.

C. FERMENTATION

La fermentation permet de transformer des sucres réducteurs en éthanol par l'intermédiaire de la L.S.A *Saccharomyces cerevisiae* MOLL (1991).

Les résultats suivants sont classés en deux parties dont l'une présente les résultats obtenus lors des fermentations *in vitro* et l'autre celle de la fermentation *in vivo*.

C.1. RESULTATS DE LA FERMENTATION IN VITRO

Les tableaux XV et XVI ci-dessous résument les évolutions par jour de la fermentation en fonction de la densité et du °Brix du moût.

Nombre de jours de fermentation	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour
Densité du moût issu de l'hydrolyse à base de paddy germé	1,035	1,017	1,015	1,015
°Brix	16	12,4	10	9

Tableau XV : Evolution de la fermentation *in vitro* à base de paddy.

Nombre de jours de fermentation	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour
Densité du moût issu de l'hydrolyse du lait de malt d'orge germée	1,065	1,035	1,008	1,008
°Brix	19	14	10	7

Tableau XVI : Evolution de la fermentation *in vitro* à base d'orge

○ INTERPRETATION

Le tableau XVI montre l'évolution de la fermentation *in vitro* avec un aspect décroissant tant pour le paddy que pour l'orge ; effectivement la densité des 2 moûts diminue à cause de la consommation des sucres dans le milieu par la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant la réduction de la densité du moût fermenté à base d'orge est plus accentuée que celle du moût à base de paddy. Les résultats sur la fermentation à base d'orge sont comparables à ceux qu'ont trouvés les auteurs [RAKOTOSAONA et al \(2015\)](#) lors de leur étude sur la fermentation d'un moût à base de manioc dans le but d'améliorer son vin avec une valeur de densité égale à 1,071 au 1^{er} jour et 1,044 au 4^{ème} jour

Les FIGURES 14 et 15 détaillent l'évolution de la consommation de sucres réducteurs durant la fermentation en fonction du °Brix.

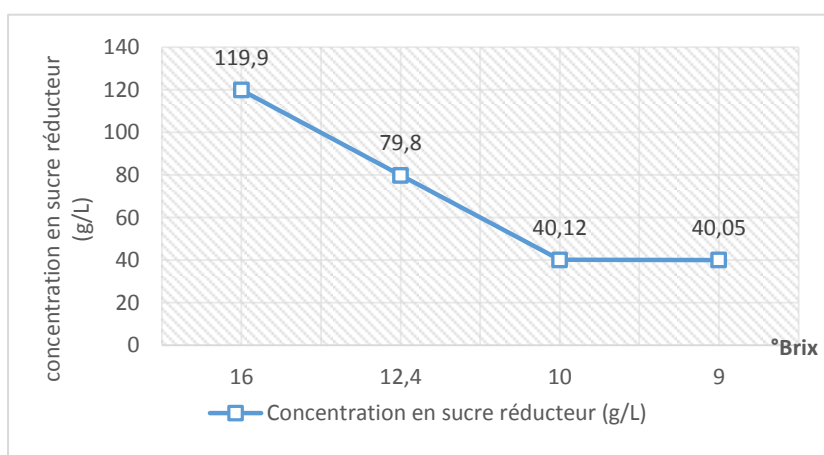


FIGURE 14 : Evolution de la concentration en sucres réducteurs dans le moût obtenu à partir de l'hydrolyse utilisant le paddy germé.

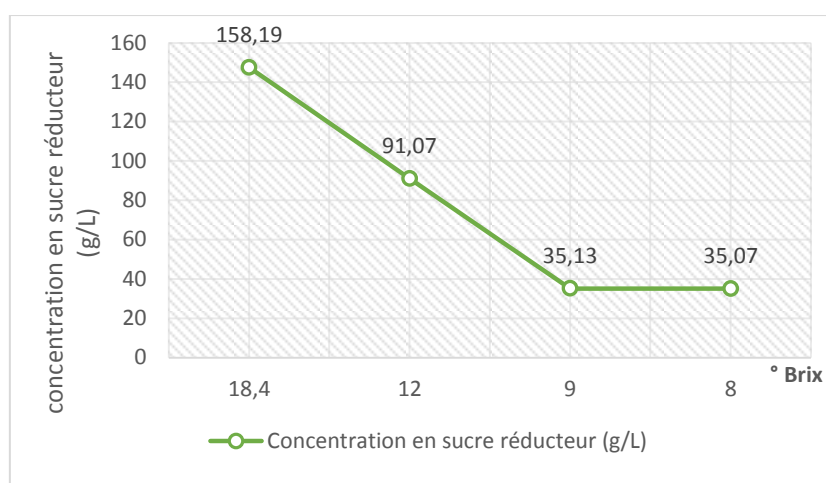


FIGURE 15 : Evolution de la concentration en sucres réducteurs dans le moût obtenu à partir de l'hydrolyse utilisant l'orge germée.

○ INTERPRETATION

Le moût de la fermentation à base d'orge est plus riche en sucres fermentescibles que celui à base de paddy vu les FIGURES 14 et 15. L'épuisement des sucres réducteurs des deux fermentations (paddy/orge) est progressive, au 1^{er} jour de la fermentation la concentration en sucre réducteur (g/l) du moût à base de paddy germé est de 119,9 g/l et se termine avec une quantité résiduelle de 40,05 g/l au 4^{ème} jour. La fermentation à base d'orge germée est plus importante, la concentration est de 150 g/l au départ et atteint une valeur de 36,86 g/l de sucre résiduel au terme de la fermentation.

La consommation en sucres fermentescibles par la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour la fermentation à base de paddy est inférieure par rapport à la fermentation à base d'orge ce qui indique que la production alcoolique du moût fermenté à base d'orge est plus élevée. LAYOKUN (1984) ; BOUIX (1997).

La production d'éthanol par la levure pendant la fermentation est témoignée par un dégagement de CO₂ (plus prononcé dans le cas de l'orge) est diminué au fur et à mesure que les sucres dans le milieu s'épuisent BOKOSSA (1993).

C.2. RESULTATS DE LA FERMENTATION IN VIVO

Le tableau XVII présente l'évolution de la fermentation réalisée en petite quantité à base d'orge germée.

Nombre de jours de fermentation	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour
Densité du moût issu de l'hydrolyse dont le lait de malt est à base d'orge germée	1,065	1,042	1,027	1,007
°Brix	18,4	12	9	8

Tableau XVII : Evolution de la densité et du °Brix du moût en fonction du nombre de jour de fermentation réalisé en milieu artisanal.

○ INTERPRETATION

L'évolution de la densité de la fermentation à base d'orge germée à petite et moyenne quantité est similaire, les auteurs NWAGA *et al* (2014) ont trouvé les mêmes résultats dont 1,060 comme densité au 1^{er} jour de fermentation et 9,98 au 4^{ème} jour en utilisant une suspension importante de 45 % lors d'un essai à l'échelle industrielle.

La FIGURE 16 détaille l'évolution des sucres réducteurs dans le moût pendant la fermentation.

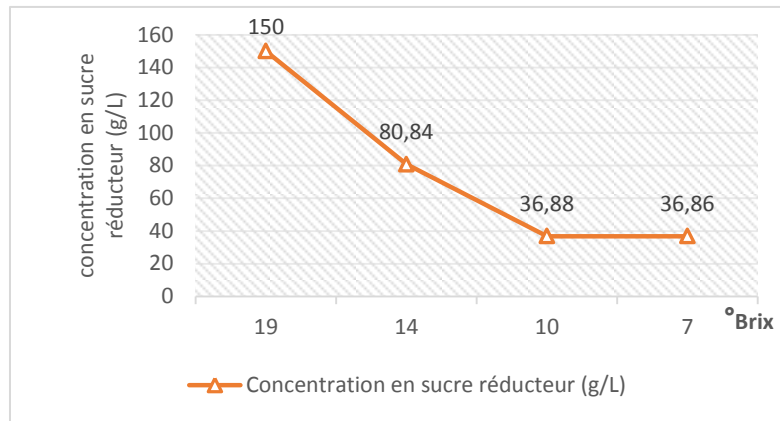


FIGURE 16 : Evolution de la concentration en sucre réducteur dans le moût obtenu en milieu artisanal.

○ INTERPRETATION

Le taux de sucres transformés lors de la fermentation en milieu artisanal à base d'orge germée est proche de la fermentation réalisée en laboratoire (**FIGURE 15**). Par contre ; les conditions expérimentales sont différentes même si les protocoles d'exécution se ressemblent. Effectivement, la température de l'hydrolyse *in vitro* est mieux contrôlée qu'en mode artisanal qui se fait au feu de bois entraînant une probable déperdition au niveau de la chaleur. De plus la rotation systématique de l'agitateur en laboratoire ne s'applique pas en milieu artisanal ou celle-ci est manuelle.

Plusieurs auteurs [FREDERIC et al \(2009\)](#) ont réalisé cette technique d'adaptation de la fermentation *in vitro* en *in vivo* ; toutefois leurs résultats sont meilleurs avec une durée de fermentation de 15 jours dont les valeurs sont les suivantes : concentration en sucres fermentescibles au 1^{er} jour : 290 g/l et 15 g/l de sucres réducteurs résiduels au 9^{ème} jour.

D. DISTILLATION

La distillation permet de séparer le bioéthanol des produits secondaires formés et l'eau lors de la fermentation ; les tableaux ci-dessous résument les degrés alcooliques obtenus lors des distillations.

D.1. DOSAGE DU BIOETHANOL IN VITRO ET IN VIVO

Le tableau XVIII montre les résultats de la distillation des moûts fermentés effectués en petite et moyenne échelle selon le type de céréales testées.

	Distillation du moût fermenté <i>in vitro</i>		Distillation du moût fermenté <i>in vivo</i>
Type de céréale	Paddy germé	Orge germée	Orge germée
Degré alcoolique (°GL)	3,5	7	7

Tableau XVIII : Degré alcoolique des distillats *in vitro* et *in vivo*.

○ INTERPRETATION

Le tableau XVIII montre que le degré alcoolique du distillat *in vitro* pour le paddy germé est inférieur à celui du distillat pour orge germée.

D'autre part le degré alcoolique du distillat de « l'orge germée » *in vitro* ne diffère pas de l'*in vivo*. Le résultat obtenu issu du distillat à base d'orge germée est proche de celui des auteurs [RAKOTOSAONA et al \(2015\)](#) avec 10,71 °GL en utilisant de l'amidon de manioc pur lors de l'hydrolyse.

E. BIOETHANOL

E.1. CALCUL DU RENDEMENT PRATIQUE EN BIOETHANOL

La formule ci-dessous exprime le rendement du produit.

$$\text{Rendement}(\%) = \frac{\text{masse du produit obtenue}}{\text{masse du produit initiale}} \times 100$$

E.2. RENDEMENT PRATIQUE DU BIOETHANOL *IN VITRO* ET *IN VIVO*

Les résultats en pourcentage du rendement pratique de bioéthanol après distillation et dosage par l'alcoomètre des moûts *in vitro* et *in vivo* sont présentés dans le tableau XIX.

	<u>Rendement de bioéthanol <i>in vitro</i></u>		<u>Rendement de bioéthanol <i>in vivo</i></u>
	Rendement de bioéthanol à base de paddy germé	Rendement de bioéthanol à base d'orge germée	Rendement de bioéthanol à base d'orge germée
	14,91 %	23,48 %	22,6 %
Concentration en sucres réducteurs maximale	119,9 g/l	158,19 g/l	150 g/l

Tableau XIX : Rendements pratiques de bioéthanol obtenu *in vitro* et *in vivo*

○ INTERPRETATION

Le rendement de bioéthanol à base de paddy germé *in vitro* (14,91 %) est inférieur à celui du rendement de bioéthanol à base d'orge germée *in vitro* (23 %) cela est dû à la concentration en sucres fermentescibles consommés par les levures dans le moût à base de paddy qui est plus faible que celui de l'orge.

Par ailleurs, les taux de rendement de bioéthanol à base d'orge germée obtenu en laboratoire et en milieu artisanal sont identiques.

D'autre part, le rendement pratique en alcool est toujours inférieur comparé à celui du rendement théorique (51,1 %), avec 0,511 g d'alcool pour 1 g de sucre fermentescible [MARILLERS \(1991\)](#).

Le rendement pratique est réduit suite à la formation d'autres produits secondaires qui sont en général : l'alcool propylique normal 6–12 %, l'alcool isobutylique 15–25 %, l'alcool isoamylasique 60–70 % et éthers lourds 5 % ; ces produits secondaires interfèrent dans l'obtention de produit éthylique pur [BACHIROU \(2000\)](#).

Le rendement de bioéthanol à base d'orge germée est comparable à celui des auteurs [NWAGA et al \(2014\)](#) qui ont eu un rendement alcoolique de 31,9 % lors de leur travail sur l'optimisation de la production d'éthanol par les techniques d'hydrolyse de l'amidon de manioc pur.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le présent travail a permis :

- D'étudier les techniques d'hydrolyse de la farine de manioc à base de céréales germées.
- De connaître les méthodes employées lors de la fermentation et de la distillation afin d'obtenir du bioéthanol.
- Comparer les pouvoirs diastatiques des enzymes que renferment l'orge et le paddy germé.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de connaître l'efficacité du lait de malt de deux céréales à savoir le paddy et l'orge pendant l'hydrolyse et aussi de voir les contraintes lors d'une application à moyenne échelle, tout ceci dans le but d'optimiser la production du bioéthanol.

En guise de perspectives, il serait intéressant de :

- Rechercher les paramètres d'action des enzymes amylolytiques tel que le glucoamylase et l'isoamylase produits par certains microorganismes notamment des espèces : *Aspergillus oryzae* et *Rhizopus oryzae* et de les associer avec les enzymes beta et alpha amylases déjà présentes dans le lait de malt à base d'orge germée pour une hydrolyse complète de l'amidon.
- Rechercher des méthodes permettant de combiner l'hydrolyse et la fermentation via un bioréacteur adapté pour un meilleur rendement.
- Déterminer les paramètres qui pourraient aboutir à une hydrolyse totale de l'amidon en couplant l'hydrolyse enzymatique avec l'hydrolyse acide.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES &
WEBOGRAPHIES**

- 1- ACCT – STEC, 1981. Le manioc. Sa culture et sa transformation Paris ; p64.
- 2- ADRIAN J, POTUS J. et FRANGNE R., 1995. La Science Alimentaire de A à Z. 2^{ème} Edition. Lavoisier, Technique et Documentation. Paris France ; p477.
- 3- ANGELLIER H., 2005. Nano-cristaux d'amidon de maïs cireux pour applications composites. Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier – Grenoble 1 (France) ; p298.
- 4- ATKIN N, 1999. Localisation of amylose and amylopectin in starch granules using enzyme-gold labelling. *Starch/Stärke*, 5 ; p163– 172.
- 5- ASIEDU J., 1993. La transformation des produits agricoles en zone tropicale. Approche technologique, 4^{ème} édition. Paris : Technique et Documentation – Lavoisier ; p904.
- 6- BACHIROU Z., 2000. Contribution à l'étude de la fermentation alcoolique de la banane plantain *Musa paradisiaca* variété G2044 par la levure *Saccharomyces cerevisiae* ; p30–60.
- 7- BAHRANI, 2012. Modification des Propriétés Physico-Chimiques de l'Amidon par Procédées Hydrothermiques : Contribution à l'étude des Transferts Couplés Chaleur-Masse. Thèse de doctorat, Génie des Procédés, La SIE, Université de La Rochelle ; p236.
- 8- BAJERIBIGBE, 1992. Structures and phase transitions of starch in food systems. *Food Technology*. 46 ; p98–145.
- 9- BEJ M., BASU R. et ASH S., 1988. Kinetic studies on acid catalyzed hydrolysis of starch. *J Sci Ind Res*, 67 ; p295–298.
- 10- BOKOSSA, 1996. Production, commercialisation, importation et exportation du manioc et ses produits dérivés au Bénin, Rapport d'enquête ; p22.
- 11- BOUIX M., 1997. Les microorganismes d'intérêt industriel Tec et Doc Lavoisier ; p4-10.

- 12- BULEON, 2001. Caractéristiques structurales des amidons. Formation Adria des à Nantes (France) ; p104–110.
- 13- BULEON, COLONNA P. et LELOUP V., 1990. Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. Actualités des industries alimentaires et agro-industrielles ; Institut National de la Recherche Agronomique, Nantes - France, 6 ; p515-532.
- 14- CAYOT N., 2000. Influence of aroma compounds on the mechanical properties of starch-based food systems. *Journal of Texture Studies*, 31 ; p297-313.
- 15- CEBALLOS, 2006. Variation in crudeprotein content in *Manihot esculenta crantz* roots, *J. Food Compos. Anal.*, 19 ; p589-593.
- 16- DEMEYER, 1981. La conversion bioénergétique du rayonnement solaire et les biotechnologies ; p44–46.
- 17- DRAPON. H., 1981. Etat actuel de nos connaissances sur l'action des amylases en panification biscotterie et biscuiterie. « Condition et modalité d'action des amylases » ; p182.
- 18- ELIASSON, A., 1983. Differential scanning calorimetry studies on wheat starch-gluten mixtures. II. Effect of gluten and sodium stearoyl lactylate on starch crystallization during ageing of wheat starch gels. *J. Cereal Sci.* 1 ; p207–213.
- 19- FAHRASMANE, 1997. De la canne au rhum ; p72–73.
- 20- FREDERIC T., BERTRAND T., 2009. Production directe d'éthanol à partir de l'amidon par co-culture de deux souches de levures *Schwanniomyces sp* et *Saccharomyces cerevisiae* : application à la bioconversion de l'amidon de manioc et de maïs, *Syllabus Review* 1; p28 – 35.
- 21- FRENCH A., 1984. Organisation of starch granules, eds. *Starch : chemistry and technology*. 2nd ed. New York, USA: Academic Press ; p119–125.

- 22- HOPKINS, KULKA, 1957. Glucamylase et débranchement enzymatique de *S.diastaticus* . Arch. Biochem. Biophys., 69 ; p45–55.
- 23- HORTON, 1994. Principes de Biochimie- Ed. DeBoeck Universités ; p99.
- 24- HOWELL, SUMMER, 1935. Analysis of total sugar and phenols and other oxidant substrates by means of Folin- Ciocalteu reagent. Method Enzymol., 299 ; p152–178
- 25- HUBLIN, 1994. Influence des caractéristiques structurales des amidons natifs sur leur réactivité chimique. PhD dissertation, Université de Nantes. France ; p256–257.
- 26- JENKINS P., DONALD, 1998. Gelation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. Carbohydrate Research, 308 ; p133– 147.
- 27- JUSTIN K., 2015. Production et transformation du manioc, coédition d'Ingénieurs Sans Frontières Cameroun (ISF Cameroun) et du Centre technique de coopération agricole et rurale (CTA). (5) ; p1– 40.
- 28- JVO, 2016. Enzymatic Food Analysis, Product Manager Microbiology, Vol 9, (2) ; p1– 14.
- 29- KONSOUA Z., LIAKOPOULOU et KYRIAKIDES M., 2007. Co-production of alpha-amylase and bêta-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. Bioresour. Technol ; p150– 157.
- 30- KUNLAN L, 2001. Salt associated acid hydrolysis of starch to D-glucose under microwave irradiation. Carbohyd Res, 331 ; p9–12.
- 31- LAYOKUN, 1984. Use of palm wine cultures for ethanol production from blackstrap molasses, with particular reference to conditions in the tropics. Process biochemistry ; p180–182.
- 32- LEACH, SCHOCH, 1961. Structure of the starch granule. II. Action of various amylases on granular starches. Cereal Chemitry. 38 ; p34–41.
- 33- LELOUP, COLONNA et BULEON, 1991. Influence of amylose-amylopectin ratio on gel properties. J. Cereal Science ; p1-13.

- 34- LEVEQUE E., HAYE B. et BELARBI A. 2000. L'amidon et ses derives, applications industrielles, Collection Bio Campus, edition scientifiques et médicales Elsevier SAS ; p14.
- 35- LOUISOT P., 1999. Prediction of protein-glucose binding sites using support machines. *Proteins*, vol 77, n°1 ; p121–132.
- 36- MACARRON, 1992. Purificacion y Caracterizacion de Endoglucanasa de *Trichoderma reesei*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biologicas, Departement de Biochimie et Biologie Moléculaire ; p65.
- 37- MARILLERS, 1951. Distillerie agricole et industrielle ; p89–102.
- 38- MELVIN, 1979. The effect of extractable lipids on the viscosity characteristics of corn and wheat starches. *Journal of Science Food Agric.* 30 ; p731–738.
- 39- MOLL B. L. 1991. The distribution of covalently bound phosphate in the starch granule in relation to crystallinity. *International Journal of Biological Macromolecules* vol 27 ; p211–218.
- 40- MOSS, 1996. Basic terminology of stereochemistry », *Pure Appl. Chem.*, IUPAC, vol. 68, n° 12 ; p2193– 2222.
- 41- MURALIKRISHNA, 2005. Cereal α -amylase- an overview. *Carbohydr. Polym.* 60 ; p163– 173.
- 42- MUCHNIK, VINCK, 1984. La transformation du manioc : technologies autochtones, Agence de coopération culturelle et technique : Conseil international de la langue française : Presses universitaires de France, Paris ; p452.
- 43- MÜNZING, 1991. DSC studies of starch in cereal and cereal products. *Thermochimica acta.* 193 ; p441–448.
- 44- NGAWA, OMOLOKO C., KOUAM .E, Wu J., 2009. Optimisation de la production d'éthanol par les techniques d'hydrolyse de l'amidon de manioc et la fermentation de la levure de bière (*Saccharomyces cerevisiae*). *Journal home*, vol 8, n°1, Académie des Sciences, Cameroun ; p1.
- 45- RANDRIAMANANTENA H., 2006. Valorisation de l'igname malgache *Dioscorea sansibarensis* variete « veoveo » : hydrolyse enzymatique de l'amidon et fermentation alcoolique par la levure *Saccharomyces cerevisiae* ; p68–70.

- 46- RAKOTONDRABE T., 2005. Contrôle qualité de la farine de manioc fabriqué dans l'unité pilote de transformation à Ambatomanoïna pour usage agroalimentaire, mémoire de fin d'Etude en vue de l'obtention d'un diplôme d'ingénieur en agronomie ; p45–50.
- 47- RAKOTOSAONA R., ANDRIANONINTSOA T., ANDRIANAIVORAVELONA O., 2015. Mise au point d'un procédé de fabrication d'une boisson alcoolisée à base de manioc. 85 ; p78-87.
- 48- RAMARJAONA P., 2001. Culture et production du manioc à Madagascar, Mémoire en vue de l'obtention du CAPEN ; p51–53.
- 49- RANAIVOSON R., 2010. Céréales ; 5^{ème} année Département IAA, ESSA ; p65–67.
- 50- ROBIN, 1974. Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residue from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry*. 51 ; p389–406.
- 51- ROMANO, 2005. Combustibles Alternativos. Nuevas Tecnologías para la obtención de Biocombustibles. Buenos Aires : Ediciones Cooperativas ; p355-357.
- 52- RUSSEL, 1987. Gelatinisation of starches of different amylose/ amylopectin content. A study by differential scanning calorimetry. *Journal of Cereal Science*. 6 ; p133–145.
- 53- SCRIBAN, 1993. *Biotechnologie* ; p46–49.
- 54- SIEW L., 2012. Pullulanase : Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications, *Enzyme Research*, Volume 2012 ; p3-5.
- 55- VELUPPILLAI, 2009. Biochemical changes associated with germinating rice grains and germination improvement. *Rice Science*, 16 ; p240-242.
- 56- WALISZEWSKI K., 2003. Changes of banana starch by chemical and physical modification. *Carbohydrate Polymers* 52 ; p237–242
- 57- WHISTLER, DANIEL, 1984. Molecular structure of starch. In RL Whistler, JN ; p2-3.

58-ZOBEL, 1984. Starch gelatinization and mechanical properties of starch pastes. Starch: Chemistry and Technology. R. L. Whistler, J. N. Bemiller, and E. F. Paschall, eds. Academic press: orlando ; p12-14.

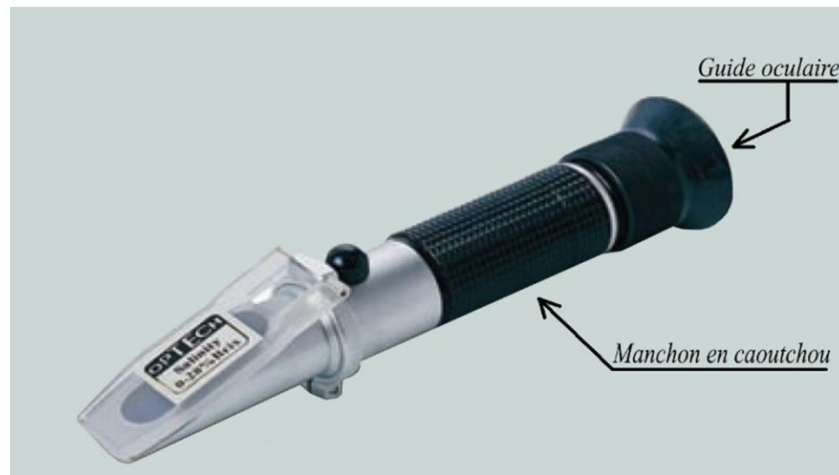
WEBOGRAPHIES

- 1- BARRY V., MCCLEARY, 2016, PhD, DSc Agr Hydrolytic action of starch of starch degrading enzyme [online]:
<https://www.megazyme.com/technical-support/glycoscience-toolkits/starch-toolkit> ; p1
- 2- BADGER, P., 2002. Ethanol from Cellulose: A General Review. [online]:
<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/badger.pdf> ; p1-3.
- 3- BOURSIER, 2005. Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires, Techniques de l'Ingénieur, disponible à partir d'URL :
<http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agroth2/agroalimentaire-ti700/amidons-natifs-et-amidons-modifies-alimentaires-f4690/amidons-modifiesphysiquement-f4690niv10004.html> ; p1-2.
- 4- CAMPBELL, FARRELL, 2016. Ose réducteur [en ligne]. 2012. Disponible à partir d'URL :
https://fr.wikipedia.org/wiki/Ose_r%C3%A9ducteur ; p1-2.
- 5- FAO, 2006. Annuaire FAO de la production. Collection FAO : n° 61, disponible à partir d'URL : <http://faostat.fao.org/site> ; p1-3.
- 6- FISCHBACH, ANCELET J. et TALLARICO, 2016. Les céréales germées, disponible à partir d'URL :
http://www.ohmbioalternatives.com/index.php?option=com_content&view=article&id=37:les-cereales-germees&catid=14:infos-ohm&Itemid ; p1- 4.
- 7- JVO, 2016. Enzymatic Food Analysis. [online] : <https://www.sigmaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/enzymatic-food-analysis.html> ; p1-2.

ANNEXES

Annexe 1 : PRINCIPE DE LA MESURE D'UN MOUT AVEC UN REFRACTOMETRE

Les réfractomètres sont des instruments, qui déterminent la concentration d'une solution en mesurant l'index de réfraction.



Réfractomètre

Quelques gouttes d'échantillon déposées sur le prisme, permettent de lire directement sur l'échelle du réfractomètre, la valeur de la concentration du solide dissous. Grâce à leur versatilité et leur petite taille, ces réfractomètres sont utilisés dans de nombreux domaines et sur une large gamme de substances. L'avantage majeur des réfractomètres, est leur grande sensibilité aux variations de température. C'est la raison pour laquelle le manchon du réfractomètre portable est en caoutchouc silicone, afin de le protéger de la chaleur de la main de l'opérateur. Ainsi, les mesures ne sont pas affectées par la variation de température et la précision des résultats est meilleure. L'oculaire du réfractomètre est protégé aussi, afin que la lumière ne puisse pas pénétrer dans l'instrument pendant la mesure.

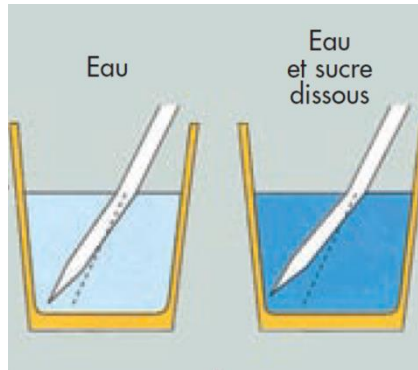
ECHELLE BRIX (%).

Le degré Brix mesure la concentration (%) d'un composé solide soluble en solution aqueuse, par exemple la somme de tous les solides dissous dans l'eau (sucre, sels, protéines, acides). Le résultat de la mesure est leur somme dans l'échantillon. C'est donc une mesure globale et non spécifique. Théoriquement, le degré Brix est calculé par rapport au poids (grammes) de sucre de canne contenu dans 100 g d'une solution. Pour cette raison, quand on mesure une solution basée uniquement sur les quantités de sucre dissous, le degré Brix donne directement la concentration réelle avec précision.

Dans le cas d'une mesure sur une solution contenant d'autres composés différents du sucre, on doit utiliser une table de conversion, de façon à corriger les valeurs obtenues, afin de s'assurer que le résultat représente bien la concentration exacte de l'échantillon.

PRINCIPE DE LA REFRACTION

Un exemple pratique pour montrer la variation de l'indice de réfraction d'une solution à une autre, est de plonger une baguette de verre dans deux béchers contenant deux solutions différentes.



Variation de l'indice de réfraction d'une solution.

Quand la baguette est plongée dans le bécher rempli d'eau, son extrémité apparaît inclinée (**FIGURE 19**). En plongeant maintenant la même baguette dans un bécher contenant de l'eau et du sucre dissous, l'extrémité de la baguette apparaît encore plus inclinée. C'est le phénomène de la réfraction de la lumière. Les réfractomètres sont des instruments de mesure, qui mettent cette loi en pratique. Ils sont en fait basés sur le principe suivant : l'augmentation de la densité de la substance (ex : sucre dissous dans l'eau) est proportionnelle à l'augmentation de l'indice de réfraction de cette substance. La lumière réfractée est alors projetée grâce à un système optique sophistiqué de lentilles dans le réfractomètre. Le résultat de la mesure peut être lu sur l'échelle graduée de celui-ci.

Dans le cas d'une solution de faible concentration, la différence entre l'indice de réfraction de la substance et celui du prisme est considérable, et par conséquent l'angle de réfraction sera important (**FIGURE 20 "A"**). Par contre, dans le cas d'une solution dense, très concentrée, la différence entre les deux indices sera plus faible et l'angle plus petit (**FIGURE 20 "B"**).

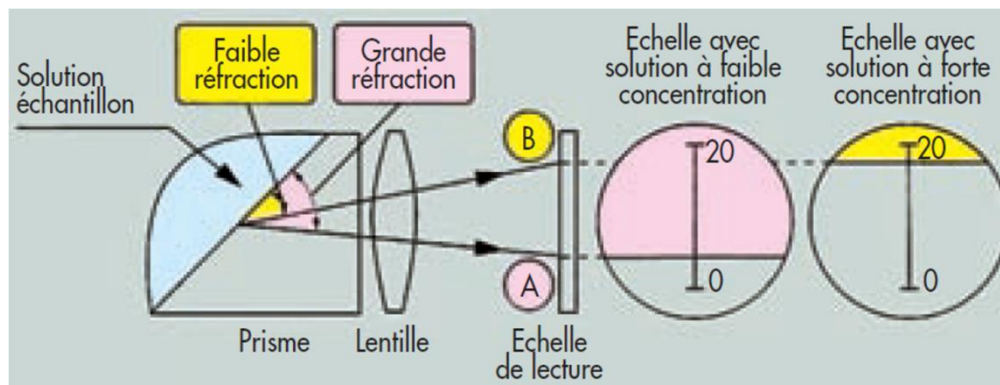


FIGURE 19 : Principe de mécanisme du réfractomètre.

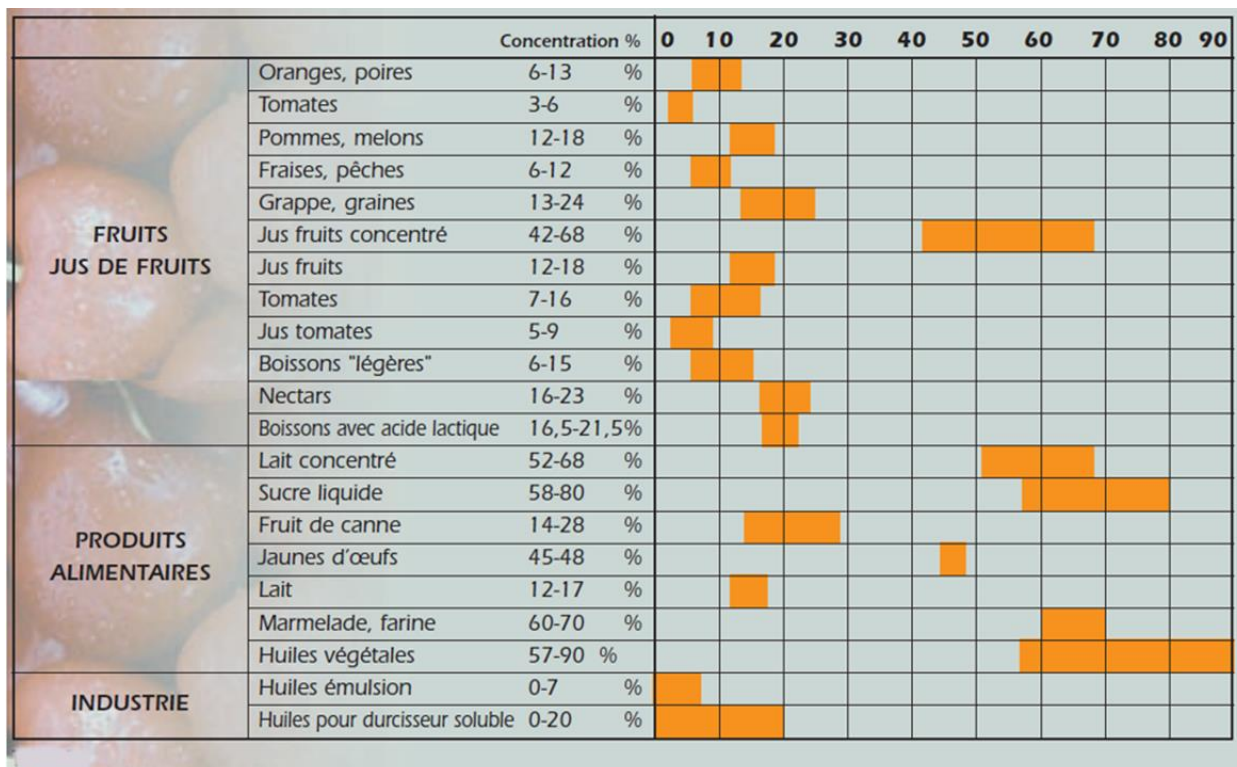


FIGURE 20 : Concentration standard des substances connues mesurée par réfractomètre.

Annexe 2 : UTILISATION ET MESURE D'UN LIQUIDE ALCOOLISE AVEC UN DENSIMETRE.

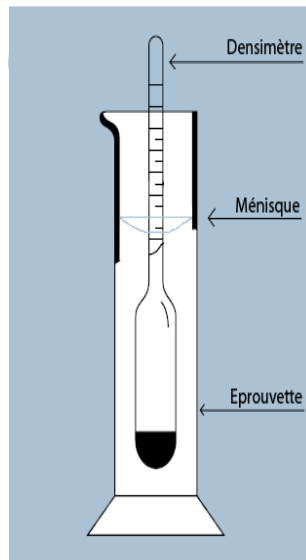
Le densimètre est un instrument en verre utilisé pour la mesure de la masse volumique d'un liquide en utilisant le principe d'Archimède.



Densimètre.

PROCEDE DE MESURE :

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



Manipulation du densimètre.

Annexe 3 : BROYEUR INDUSTRIEL HONG YUANG

L'appareil industriel Hong Yang sert à broyer les tubercules de manioc sec pour avoir de la farine.



Photo du broyeur industriel Hong Yuang.

Title: Manufacture of bioethanol starting from starch of manioc and study of the factors influencing the enzymatic hydrolysis of the starch of manihot.

Author: ANDRIAMANANTSOA Ainavalonjaka

.....

ABSTRACT

The tuber of dry manihot is used as raw material for the production of bioethanol, 80% of the tuber of manihot is transformed into flour after crushing. The flour obtained containing of the starch is mixed with water to obtain a suspension of 31% (weight/volume). The hydrolyzes are carried out by using amylases contained in the milk of malt containing paddy or germinated barley. The amylases containing germinated paddy are less effective than those containing barley germinated considering the reducing sugar concentration obtained at the end of the enzymatic hydrolyzes carried out in laboratory: 119,9 g/l for that containing paddy and 158,19 g/l for that containing germinated barley, in addition the fermentable sugar concentration resulting from the hydrolysis containing germinated barley is similar to that of reducing sugars obtained by hydrolysis worked out in artisanal medium which is of 150 g/l. Consequently, fermentation, utilizing the yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) transforms fermentable sugars into alcohol and carbonic gas in anaerobes medium. After 4jours of fermentation, must is distilled to collect only bioethanol. *In vitro* experiments containing germinated paddy made it possible to obtain an initial alcoholic strength equal to 3,5 and 7 is the double for bioethanol containing germinated barley carried out in small and average scale. Certain technical constraints however limit still the production in artisanal mode.

Keywords:

Bioethanol, manihot, starch, enzyme, hydrolysis.

Advisor :

Doctor : Valerie RAZAFINDRATOVO ANDRIAMANAMISATA

Titre : Fabrication de bioéthanol à partir d'amidon de manioc et étude des facteurs influant sur l'hydrolyse enzymatique de l'amidon de manioc.

Auteur : ANDRIAMANANTSOA Ainavalonjaka

.....

RESUME

Le tubercule de manioc sec est utilisé comme matière première pour la production de bioéthanol, 80% du tubercule de manioc est transformé en farine après broyage. La farine obtenue renfermant de l'amidon est mélangée avec de l'eau pour obtenir une suspension de 31 % (poids/volume). Les hydrolyses sont réalisées en utilisant des amylases contenues dans le lait de malt à base de paddy ou d'orge germée. Les amylases à base de paddy germé sont moins efficaces que celles à base d'orge germée vu la concentration en sucres réducteurs obtenue à la fin des hydrolyses enzymatiques effectuée en laboratoire : 119,9 g/l pour celui à base de paddy et 158,19 g/l pour celui à base d'orge germée, par ailleurs la concentration en sucre fermentescible issue de l'hydrolyse à base d'orge germée est similaire à celle des sucres réducteurs obtenue par hydrolyse élaborée en milieu artisanal qui est de 150 g/l. Par suite, la fermentation, faisant intervenir les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) transforme les sucres fermentescibles en alcool et en gaz carbonique en milieu anaérobie. Après 4 jours de fermentation, le moût est distillé pour ne recueillir que du bioéthanol. Les expériences *in vitro* à base de paddy germé ont permis d'obtenir un degré alcoolique initial égale à 3,5 et 7 soit le double pour le bioéthanol à base d'orge germée réalisé en petite et moyenne échelle. Certaines contraintes techniques limitent cependant encore la production en mode artisanal.

Mots – clés :

Bioéthanol, manioc, amidon, enzyme, hydrolyse.

Encadreur :

Docteur : Valérie RAZAFINDRATOVO ANDRIAMANAMISATA