Ce projet est financé par l'Agence Française de Développement (AFD) – via l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) -, au titre du programme Partenariats Académiques Afrique France (PEA) / projet -ANR-23-PEA3-0003-01

Travaux pratiques au sein du CRITT Bio-industries

Objet : travaux pratiques de fermentation éthanolique pour la valorisation énergétique de matières premières

Durée de la formation : Session de 5 jours (du 30 juin au 4 juillet 2025 ou du 7 au 11 juillet 2025)

Nombre de personnes : groupe de 2 à 4 personnes

Responsable : Elise Blanchet elblanch@insa-toulouse.fr

Objectifs : Les travaux pratiques au sein de la halle de transfert technologique du CRITT Bio-Industries de l'INSA de Toulouse seront consacrés à la transformation de matière première par fermentation, avec un objectif de valorisation énergétique en bioéthanol.

La matière première ciblée devra être riche en amidon qui sera la source de glucose pour la fermentation.

Pour ce TP deux procédés de biotechnologie seront mis en œuvre :

- **La catalyse enzymatique pour hydrolyser l'amidon et produire des sucres fermentescibles**
- **La fermentation microbienne pour transformer les sucres fermentescibles en éthanol**

Les étapes d'hydrolyse sont applicables à de nombreux substrats contenant de l'amidon qui pourront être qualifiés pour leur capacité à produire de l'éthanol.

L'étape de fermentation peut également être appliquée à de nombreux substrats contenant des sucres simples comme des résidus de jus de fruits ou des mélasses

L'objectif de ces travaux pratiques est d'acquérir des compétences sur les deux étapes de la production d'éthanol à partir d'amidon (hydrolyse enzymatique et fermentation) et les différentes méthodes analytiques de quantification des processus.

Le procédé de fermentation sera mis en œuvre selon 2 modes de culture : en bioréacteurs et fioles erlenmeyer, pouvant être parallélisés et permettant ainsi de cribler différentes matières premières et différentes conditions opératoires.

L'ETAPE D'HYDROLYSE DE L'AMIDON macromolécule, polymère de glucose **:**
Cette étape a pour objet la libération de glucose par voie enzymatique**.** Les méthodes de suivi pour quantifier et mesurer la cinétique d'hydrolyse de l'amidon et production du glucose seront les suivantes :

- **Analyses HPLC** (méthode permettant de quantifier les sucres solubles issus de la réaction)
- **°Brix** (méthode permettant de mesurer en degrés Brix (°B ou °Bx) la fraction massique de sucre dans un liquide, c'est-à-dire le pourcentage en masse de matière sèche soluble par rapport à la solution).
- **Dosages colorimétriques** (méthode permettant de doser les substrats et produits de la réaction)

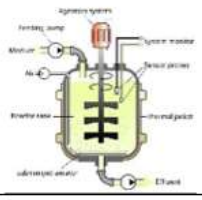
Elles seront testées et comparées pour évaluer les avantages et limites.

L'ETAPE DE FERMENTATION ETHANOLIQUE a pour objet de convertir par voie microbienne le glucose en éthanol selon l'équation suivante :

$C_6H_{12}O_6$	→	**2 CO_2**	**+ 2 C_2H_5OH + 27 kcal**
Glucose		Dioxyde de carbone	+ Ethanol + Energie

Le suivi (cinétique et point final) de cette étape a pour objet de mesurer l'évolution des concentrations en substrats (sucres) et/ou produits de la réaction (éthanol, glycérol, …) pour quantifier la productivité et les rendements de conversion selon les méthodes mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Plusieurs outils et méthodes sont envisagées :

	Bioréacteur	Fiole erlenmeyer	Fiole erlenmeyer
Outils			
Méthodes d'analyses	HPLC, dosages colorimétriques, %MS, pH, microscopie …	HPLC, dosages colorimétriques, %MS, pH, microscopie …	Gravimétrique (méthode mettant à profit la perte de masse lié à la libération du CO_2)

Les différentes méthodes seront mises en œuvre et les résultats comparés pour évaluer les avantages et limites.

Les différents suivis analytiques de la fermentation permettront de déterminer la productivité et les rendements de conversion.

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE :

- Préparer, organiser, conduire un bioréacteur.
- Effectuer le suivi (relevés, rapport d'opération, analyses) d'une hydrolyse enzymatique et d'une fermentation microbienne.
- Comparer des méthodologies et techniques différentes pour un même objectif.

APPAREILLAGE :

- BIOREACTEURS : bioréacteurs/fermenteurs de volume utile 3 L.
- ERLENMEYERS : fioles de 250 ml
- INCUBATEUR THERMOSTATE ET AGITE
- OUTILS ANALYTIQUES : HPLC, spectrophotomètres, étuves, balances, kits enzymatiques, Brix mètre, pH mètre, microscope…

<u>Déroulé de la formation :</u>

Journée 1

- Présentation des données théoriques et scientifiques
- Préparation du bioréacteur et mise en place du TP : gammes étalon, feuilles de suivi,
- Caractérisation de la matière première (MS - Masse Sèche -, Dosage de l'amidon via kit Megazyme, cendres, protéines par la méthode de dosage Bradford…).

Journée 2 : Hydrolyse enzymatique

- Préparation du substrat – mélange et catalyse enzymatique : empâtage, liquéfaction, refroidissement, saccharification selon protocole défini en Jour 1

- Mise en place des méthodes de suivi : %sucres libres par méthode HPLC (K+), Ethanol, glycérol, acide acétique par HPLC (H+), suivi de la libération des sucres par la méthode de mesure du °Brix…

+ Inoculation du fermenteur avec une levure industrielle et prélèvement T0

Journées 3 et 4 consacrées au suivi de la fermentation (durée estimée à 48h)

- Suivi de la fermentation en bioréacteurs par prélèvements et analyses
- Suivi de la fermentation en fioles pour comparaison des résultats
- Suivi simplifié en fioles par pesée pour quantification du CO_2 libéré lors de l'étape de fermentation. Analyse et comparaison pour vérifier si ce suivi est suffisant pour suivre la réaction et peut s'appliquer au criblage de matières premières.

+ Apports théoriques et méthodologiques pendant les temps de « pause »

Journée 5 : Fin d'essais, récupération et traitement des données
- Nettoyage fermenteur
- Traitement des données et analyses de résultats, calcul des productivités et rendements

A définir et à provisionner en amont du TP : la matière première d'intérêt (issue d'Afrique de l'ouest) riche en amidon.

CRITT Bio-Industries – Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4 Site Web : www.insa-toulouse.fr
Tel. : 05-61-55-95-35 – Secrétariat : 05-61-55-92-79 Fax : 05-61-55-94-34
SIRET/SIREN : 19310152400018 – TVA Intracommunautaire : FR20193101524 – Code APE/NAF : 854