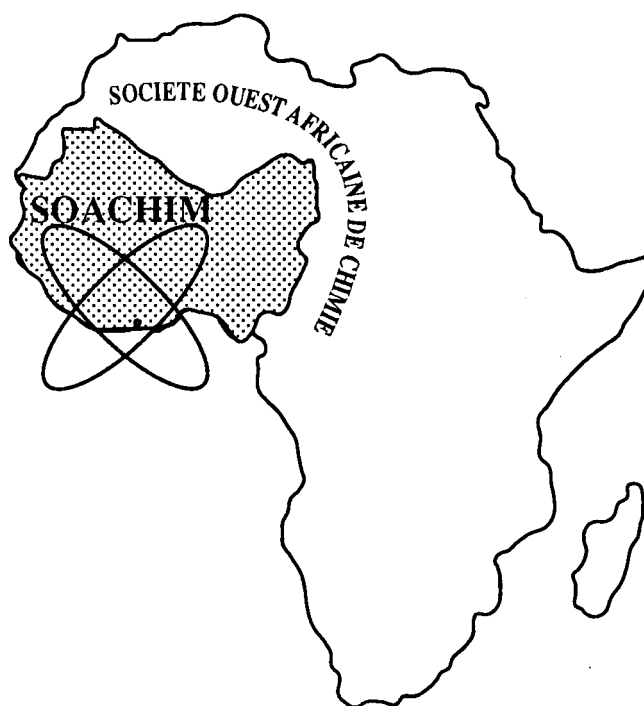


# Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie

*J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*  
Code Chemical Abstracts : JSOCF2  
Cote INIST (CNRS France) : <27680>

ISSN 0796-6687

**18<sup>ème</sup> Année, Juin 2013, N° 035**



Site Web: <http://www.soachim.org>

## Étude de la performance de quatre souches de *saccharomyces cerevisiae* au cours de la production d'éthanol à partir des moûts de sucrose enrichis.

**Kosi Mawuéna NOVIDZRO, Kokou Agbékonyi AGBODAN et Kossi Honoré KOUMAGLO\***

*Laboratoire des Extraits Végétaux et Arômes Naturels (LEVAN), Département de Chimie, Université de Lomé, 01 BP 1515, Lomé, Togo.*

(Reçu le 20/10/2012 – Accepté après corrections le 10 /05/2013)

**Résumé :** La fermentation alcoolique comparée des moûts de saccharose purs de densité normale (DN) avec quatre souches de *Saccharomyces cerevisiae* : la levure de boulangerie « SAFLEVURE » (S1) ; « Angel super alcohol active dry yeast » (S2) ; « Angel brand Thermal-tolerant alcohol active Dry Yeast » (S3) et « Angel brand super alcohol active dry yeast » (S4), donne dans les conditions expérimentales décrites, une capacité fermentaire plus intéressante pour S4 avec une diminution plus importante du Brix en fin de fermentation correspondant à un taux de production d'alcool plus élevé. L'ajout de 4 substances nutritives : urée ( $\text{CON}_2\text{H}_4$ ), glutamate de sodium ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4$ ), dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) et le sulfate de magnésium heptahydraté ( $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ ) aux moûts, a conduit à une amélioration significative de la fermentation en fonction du nutriment et de la concentration utilisée. A la concentration de 4,000 g/L d'urée ou de glutamate de sodium ou encore de dihydrogénophosphate de potassium, la diminution du Brix est plus importante que celle de 8,000 g/L. Les nutriments qui sont source d'azote sont plus efficaces.

**Mots clés :** Fermentation alcoolique, Sucrose, Moûts enrichis, *Saccharomyces cerevisiae*,

## Study of the performance of four strains of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol production with sucrose enriched musts

**Abstract :** Alcoholic fermentation comparison of sucrose musts under normal gravity (NG) using four strains of *Saccharomyces cerevisiae*: baker yeast " SAFLEVURE " (S1); "Angel super alcohol active dry yeast" (S2); "Angel brand Thermal-tolerant alcohol active Dry Yeast" (S3) and "Angel brand super alcohol active dry yeast" (S4), has shown in the experimental conditions that strain S4 has a higher fermentation capacity with a lower value of Brix at the end of the reaction. This higher rate of sucrose consumption is related to alcohol production. The addition of 4 nutrients: urea ( $\text{CON}_2\text{H}_4$ ), Monosodium glutamate ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4$ ), Potassium Dihydrogen Phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) and Magnesium sulfate heptahydrate ( $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ ), has improved significantly the fermentation rate according to the nutrient and its concentration used. At 4.000 g/L of urea or glutamate of sodium or  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , the reduction of Brix is more important than the concentration of 8.000 g/L. Nutriments with nitrogen source are more efficient for alcohol production.

**Keywords:** Alcoholic fermentation, Sucrose, Enriched musts, *Saccharomyces cerevisiae*.

---

\* Adresse de correspondance : hokkoum@gmail.com

## 1. Introduction

La demande de plus en plus croissante en pétrole et les effets écologiques néfastes tels que les changements climatiques qui en résultent ont conduit à la recherche de sources d'énergies alternatives ayant très peu d'impacts sur l'environnement<sup>[1-2]</sup>. Malgré les polémiques sur les agrocarburants quant à ce qui concerne leur efficacité à réduire le réchauffement climatique, les huiles végétales (huile des graines de *Jatropha curcas*) et le bioéthanol (alcool de canne à sucre) sont davantage utilisés en remplacement ou en association avec le gasoil ou l'essence. Certains auteurs pensent que, l'utilisation du bioéthanol pur à la place de l'essence favorise une réduction significative de l'émission du CO<sub>2</sub> de l'ordre de 90 %<sup>[3]</sup>. L'on admet aussi que la production de bioéthanol est plus respectueuse de l'environnement et sa combustion plus « propre » que celle de l'essence<sup>[4-5]</sup>. Au Brésil et aux U.S.A, la production industrielle du bioéthanol destiné à la consommation dans les transports a atteint des proportions importantes<sup>[6]</sup>.

La fermentation directe des sucres (canne à sucre, betterave sucrière et sorgho sucrier) est la méthode la plus courante. D'autres sources de carbohydrates telles que l'amidon (maïs, manioc et patate douce) et la cellulose sont aussi souvent utilisées<sup>[7]</sup>. En général, le choix des substrats de fermentation dépend du coût et de la rentabilité du procédé, et aussi de la capacité fermentaire des microorganismes associés au processus de bioconversion. Les microorganismes souvent utilisés sont : les levures du genre *Saccharomyces*<sup>[8-9]</sup>, du genre *Kluyveromyces*<sup>[10]</sup> et les bactéries comme *Zymomonas mobilis*<sup>[4, 11]</sup>. L'inconvénient majeur des bactéries est qu'elles produisent souvent d'autres sous-produits tels que les alcools supérieurs, des polyols, des acides organiques, des cétones et des gaz (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>). Dans les procédés fermentaires utilisant les levures, l'oxygène est nécessaire pour des raisons de maintenance de l'intégrité cellulaire. Malheureusement, les conditions aérées vont favoriser aussi la production de biomasse<sup>[12]</sup>. Pour pallier à cela, *Zymomonas mobilis* présente l'avantage d'être cultivée en anaérobiose stricte et donc de produire peu de biomasse mais plus d'éthanol<sup>[13]</sup>. Aussi serait-elle plus tolérante à l'éthanol que *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[14]</sup>. D'autre part, *Zymomonas mobilis* est très efficace pour la fermentation du glucose mais produit beaucoup de sous-produits (notamment des acides organiques) lorsque le saccharose est utilisé comme le substrat sucré. En général, c'est *Saccharomyces cerevisiae*

qui est utilisé pour un plus large spectre de substrats. Il est le plus efficace en termes de production d'éthanol à un pH relativement bas (pH ≈ 4). Ce qui permet d'éviter des contaminations ou des réactions parasites dues à la présence d'autres microorganismes<sup>[12]</sup>.

Le présent article porte sur l'amélioration des rendements de fermentation alcoolique du saccharose à l'aide de quatre souches de *Saccharomyces cerevisiae*. On appréciera les effets dus à l'enrichissement du moût avec l'urée, le glutamate de sodium, le dihydrogénophosphate de potassium et le sulfate de magnésium heptahydraté.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Le substrat sucré

Le saccharose (ou sucrose) est utilisé comme substrat sucré pour la fermentation. C'est un sucre en poudre produit au Brésil par la société ALTA MOGIANA. Il est disponible sur les marchés locaux de la ville de Lomé.

### 2.2. Les 4 additifs nutritionnels

Quatre produits (urée, glutamate de sodium, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), livrés par la Société de Produits Chimiques et Agricoles (SPROCA) basée à Lomé, ont été utilisés comme additifs alimentaires pouvant affecter favorablement la cinétique de fermentation.

### 2.3. La préparation des moûts de fermentation

Les moûts de sucrose de densité normale DN (20 °Brix) sont préparés comme suit. On introduit environ 230 g de sucrose en poudre et une quantité donnée (0 à 8 g) d'additifs nutritionnels dans une fiole jaugée de volume 1,0 L. On y ajoute de l'eau distillée et l'on agite le mélange jusqu'à la dissolution complète. La solution est complétée à 1,0 L avec de l'eau distillée et le pH est ajusté à environ 4,5 avec une solution molaire d'acide sulfurique. La solution est alors stérilisée à 121°C pendant 15 min dans un autoclave semi-automatique de type *Ketaj* puis refroidie à la température ambiante avant d'être utilisée comme moût de fermentation.

### 2.4. Les microorganismes et les conditions de culture.

#### ✓ Les ferments

Quatre souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont utilisées comme ferments biologiques. La 1<sup>ère</sup> souche (notée **S1**), disponible dans les supermarchés de Lomé est la levure de boulangerie « SAFLEVURE » ; tandis que les 3 autres : Angel super alcohol active dry yeast (notée **S2**), Angel brand Thermal-tolerant alcohol active Dry Yeast

(notée **S3**) et Angel brand super alcohol active dry yeast (notée **S4**) ont été livrées par la société chinoise « Angel Yeast Co., Ltd. [Hubei, China (Mainland)] ».

✓ **Milieu de préculture**

Le milieu de préculture, préparé à partir de l'eau distillée et d'un bouillon nutritif, a la composition suivante : extrait de levure (10,0 g/L), tryptone (20,0 g/L), glucose (Prolabo ®) (20,0 g/L) et NaCl (Prolabo ®) (9,0g/L).

✓ **Préparation de l'inoculum**

Une masse de 1,0 g de chaque souche de levure sèche est introduite dans 250 mL de milieu de préculture précédemment préparé. Le mélange est homogénéisé en aérobie et incubé à la température ambiante (30-32°C) sous agitation magnétique. L'inoculum ainsi préparé est conservé dans un réfrigérateur à une température voisine de 4 °C.

✓ **La préfermentation**

A 25 mL de chaque moût à fermenter (environ 10 % (v/v) du volume totale), on ajoute l'inoculum de façon à obtenir une concentration initiale en cellules viables d'environ **2,8 x 10<sup>6</sup> cellules/mL**. Le mélange est introduit dans un fermenteur, puis incubé en aérobie à la température ambiante (30-32°C) pendant 24 heures sous agitation magnétique. Les fermenteurs utilisés sont des flacons plastiques à bouchons tous identiques et de volume maximal égal à 1,0 litre chacun.

✓ **La fermentation**

Les 90 % de moût restant sont ajoutés à chaque échantillon provenant de la préfermentation. Le volume total du mélange dans chaque fermenteur est alors d'environ 250 mL. On applique la fermentation contrôlée en mode Batch se déroulant en anaérobie à la température du laboratoire (28-32°C) jusqu'à l'arrêt de chaque réaction (environ après 10 jours).

**2.5. Les méthodes analytiques**

La population levurienne a été dénombrée par comptage direct au microscope selon la méthode de coloration au bleu de méthylène utilisant l'hématocymètre de Malassez <sup>[15-16]</sup>.

✓ Le degré Brix (taux de matières solubles totales) au cours de la fermentation est déterminé à l'aide d'un réfractomètre manuel <sup>[17]</sup> de type « **Fabre Mesurelec (RAM 0-80% 106)** ». Le degré alcoolique (% v/v) des moûts à la fin de la fermentation est déterminé selon la méthode pycnométrique recommandée par « Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C) » <sup>[18]</sup>

✓ Les taux d'amélioration de rendement T.A.R (%) par rapport au sucrose non enrichi sont calculés à l'aide de la formule suivante :

$$\checkmark \text{T.A.R.} = \left( \frac{D.A.N - D.A.S.N}{D.A.S.N} \right) \times 100 \%$$

Dans cette formule, **D.A.N** est le degré alcoolique obtenu avec ajout de nutriments et **D.A.S.N**, le degré alcoolique obtenu sans ajout de nutriments. Ces deux valeurs sont déterminées selon la méthode pycnométrique recommandée par A.O.A.C <sup>[18]</sup>.

**2.6. Analyse statistique**

Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse statistique à l'aide du logiciel MSTATC. Chaque essai a été répété 4 fois dans des mêmes conditions. A partir de *one way-Anova*, le test de comparaison de Turkey a été appliqué pour classer toutes les moyennes correspondantes aux taux d'alcool produit par chaque souche et avec les différentes concentrations de nutriments. La méthode employée pour discriminer les moyennes a été celle de la plus petite différence significative au seuil de 5 %.

**3. Résultats et discussion**

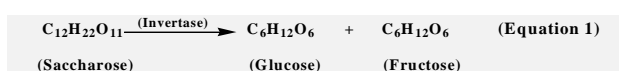
**3.1. Contrôle de la fermentation**

**Consommation de sucre**

L'évolution du Brix au cours de la fermentation contrôlée des moûts de sucrose (**DN**) pur par les 4 souches (S1, S2, S3 et S4) en fonction de la durée de fermentation est représentée sur la **figure 1**.

Dans l'ensemble, les courbes présentent la même allure. Le Brix diminue de 20,0 à 11,0 ; 10,0 ; 10,5 et 8,0 respectivement pour S1, S2, S3 et S4. La comparaison des valeurs de Brix en fin de réaction permet de déduire que S4 est la souche la plus performante en termes de consommation de sucrose et de production d'alcool. Elle est suivie dans l'ordre décroissant de S2, S3 et S1. Les 4 courbes comportent deux phases distinctes : une première phase décroissante suivie d'une seconde phase stationnaire.

En effet, la phase décroissante correspond à l'étape de la réaction où les molécules de sucrose sont consommées par les cellules levuriennes. Le mécanisme réactionnel de cette transformation procède en deux étapes. Dans la première étape, l'invertase dans la levure catalyse l'hydrolyse du saccharose pour le transformer en glucose et fructose (Equation 1 <sup>[19]</sup>) ; suivie de la deuxième étape qui est la fermentation éthanolique proprement dite (Equation 2 <sup>[20]</sup>).



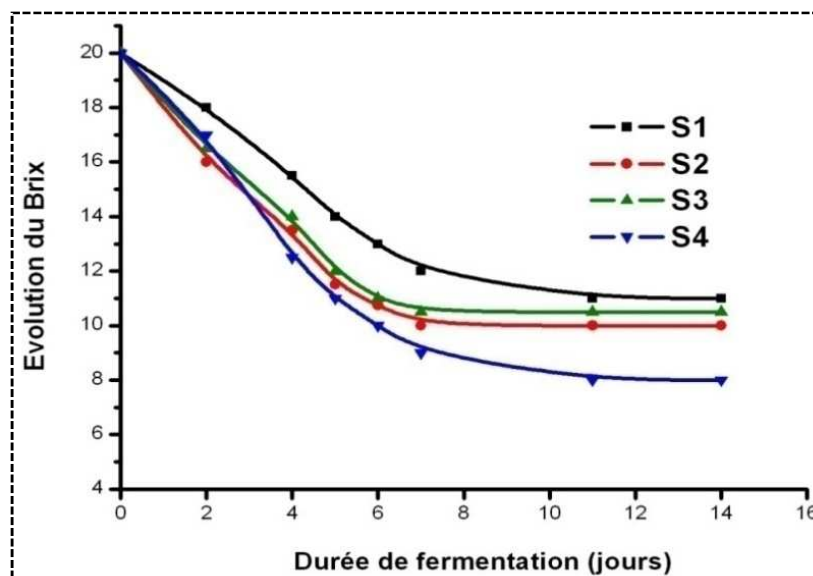
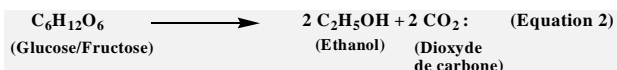


Figure 1 : Evolution du Brix en fonction de la durée de fermentation du moût de sucrose (DN) pur par les quatre souches de levures

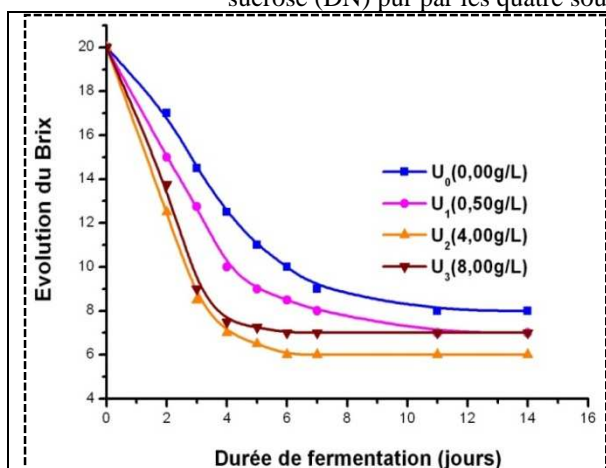


Figure 2 : Variation du Brix en fonction de la concentration en urée et de la durée de la fermentation du moût de saccharose (DN) par la souche 4

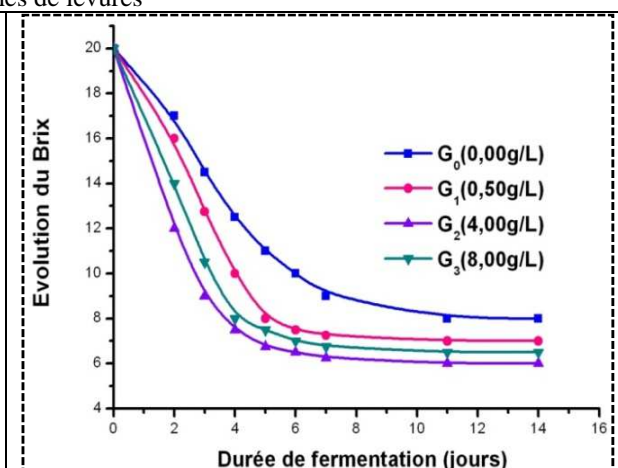


Figure 3 : Variation du Brix en fonction de la concentration en glutamate de sodium et de la durée de fermentation du moût de saccharose (DN) par la souche 4

La fermentation est la phase d'activité métabolique par laquelle les cellules se procurent de l'énergie nécessaire à leur activité enzymatique et à leur multiplication dans le milieu de culture. La phase stationnaire, caractérisée par la stabilisation du Brix, indique l'arrêt de la réaction de fermentation, dû soit au manque de sucre dans le milieu, ou soit en réponse aux différents stress subis par les microorganismes impliqués dans la fermentation. L'arrêt de la consommation du sucrose dépend de la performance de chaque souche. Selon la littérature, cet arrêt peut être provoqué par les phénomènes d'inhibition liés à la concentration du substrat sucré [21-22], de l'éthanol excrété par la levure elle-

même [23-24] et à une pression osmotique élevée [25]. De plus, l'éthanol n'est pas le seul produit susceptible d'être obtenu au cours d'une fermentation alcoolique. D'autres composés tels que le dioxyde de carbone et les co-métabolites (acide acétique, acide lactique, acide formique, acide succinique, glycérol, ainsi que d'autres alcools (formant l'huile de fusel) sont également produits, inhibant ainsi le métabolisme fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* [26]. Il est cependant possible de modifier la composition du milieu de culture des levures afin d'améliorer leur rendement de production d'alcool. C'est à cet effet que des additifs nutritionnels ont été utilisés.

### Effets des 4 additifs nutritionnels sur la fermentation des moûts de sucrose (DN)

Tous les quatre nutriments (l'urée, le glutamate de sodium, le dihydrogénophosphate de potassium et le sulfate de magnésium heptahydraté) en fonction de leur concentration étudiée ont des effets plus ou moins significatifs sur l'évolution de la consommation du saccharose par les quatre souches. Cependant, les résultats qui sont présentés ici (**figures 2 et 3**) concernent seulement les effets de la concentration en urée et glutamate de sodium sur le profil de l'évolution du Brix au cours de la fermentation des moûts de sucrose (DN) par S4.

Ces résultats montrent que l'ajout d'urée ou de glutamate de sodium à des concentrations de 0,500 g/L, 4,000 g/L et 8,000 g/L a entraîné une diminution plus rapide de Brix par rapport à celle du moût non enrichi. La fermentation prend fin à partir du 4<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> jour pour les moûts enrichis, et à partir du 11<sup>e</sup> jour pour les moûts non enrichis.

A la concentration de 4,000 g/L en urée ou glutamate, la diminution de Brix est beaucoup plus importante qu'à une concentration de 8,000 g/L. De ces constats, on peut déduire qu'il existe pour chacun des nutriments utilisés un seuil de concentration pour lequel la diminution de Brix en fin de fermentation est maximale. Et au-delà de ce seuil, la fermentation peut être plus inhibée selon l'impact de la concentration du nutriment. Ce qui laisse supposer qu'un excès de nutriments pourrait inhiber l'activité fermentaire et ainsi diminuer la capacité de consommation de sucre.

#### Le taux d'éthanol

Les **figures 4 et 5** illustrent l'évolution de la teneur en éthanol produit par S1 et S4 et en fonction de la concentration des nutriments utilisés. Les meilleurs taux d'alcool sont obtenus avec une

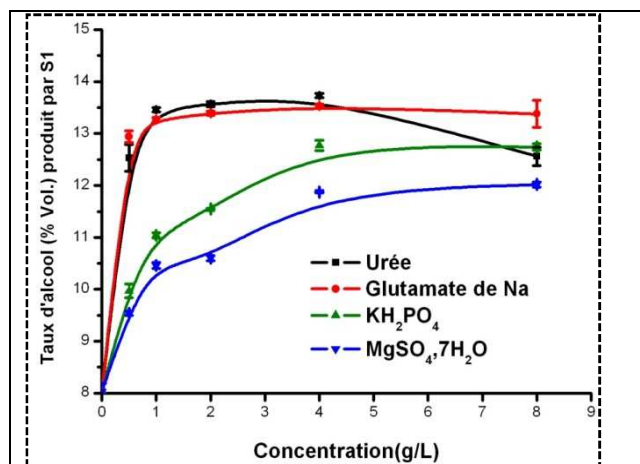
concentration de 4,000 g/L en urée pour S1 et en glutamate pour S4.

On constate une nette amélioration de la production d'alcool pour chaque souche grâce aux ajouts d'urée et de glutamate de sodium. Mais cette amélioration est plus significative pour S1 que S4. L'urée et le glutamate de sodium ont plus d'effets sur la production d'alcool par les deux souches. Cela peut être dû au fait que ces nutriments sont des sources potentiellement riches en azote, élément considéré comme essentiel non seulement pour la croissance des levures, mais aussi pour la production continue d'éthanol selon les travaux effectués par Morris (1958) [27]. Par contre l'effet de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et surtout celui de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ne sont pas aussi évidents sur les **figures 4 et 5**.

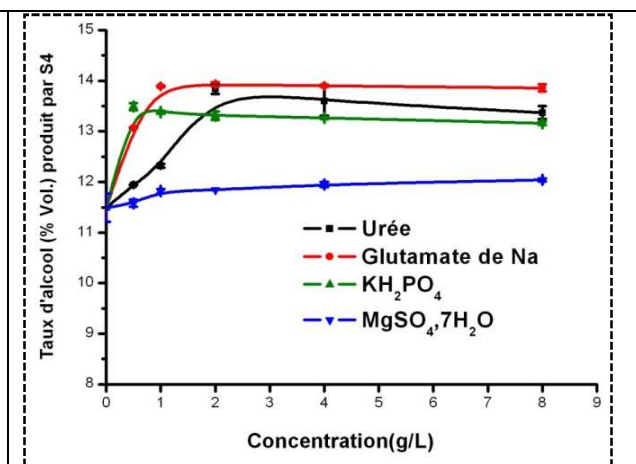
Les teneurs en alcool obtenues à la fin de la fermentation contrôlée des moûts de sucrose (DN) enrichis par les 4 nutriments et fermentés par **S1** et **S4** sont consignés dans le **tableau I**.

Les teneurs en alcool présentées dans le tableau I sont les moyennes de 4 essais  $\pm$  l'écart-type pour chacune des concentrations des 4 nutriments. La même lettre inscrite dans la même colonne indique qu'il n'y a pas de différence significative entre la teneur en alcool pour les différentes concentrations de nutriments en appliquant le test de comparaison de Turkey au seuil de signification de 5% (**P > 0,05**). Le taux d'éthanol le plus élevé pour **S1** ( $13,73 \pm 0,04$  % v/v ; 20°C) est obtenu avec de l'urée (4,000 g/L) et pour **S4** ( $13,90 \pm 0,02$  % v/v ; 20°C) avec le glutamate de sodium (4,000 g/L)

Les taux d'amélioration du rendement (**T.A.R.**) de fermentation pour **S1** varie entre **18,84-70,98** % alors que celui de S4 est compris entre **0,75-20,95** %. Ce qui montre que S1 est une souche caractérisée par une carence nutritionnelle aigüe comparativement à **S4**.



**Figure 4** : Evolution du taux d'alcool produit au cours de la fermentation de sucrose (DN) en fonction de la concentration des additifs nutritionnels avec la souche S1



**Figure 5** : Evolution du taux d'alcool produit au cours de la fermentation de sucrose (DN) en fonction de la concentration des additifs nutritionnels avec la souche S4

**Tableau I :** Le taux d'éthanol (% vol à 20°C) en fin de fermentation des moûts de sucrose (DN) enrichis et fermentés par S1 et S4

Additifs nutritionnels	Concentration (g/L)	Souche S1		Souche S4	
		Taux d'éthanol	T.A.R.	Taux d'éthanol	T.A.R.
Urée	0,00 ± 0,01	8,03 ± 0,16 <sup>g</sup>	0,00	11,49 ± 0,28 <sup>f</sup>	0,00
	0,50 ± 0,01	12,53 ± 0,26 <sup>cd</sup>	56,04	11,94 ± 0,01 <sup>e</sup>	3,89
	4,00 ± 0,01	13,73 ± 0,04 <sup>a</sup>	70,98	13,60 ± 0,29 <sup>ab</sup>	18,32
	8,00 ± 0,01	12,56 ± 0,18 <sup>cd</sup>	56,38	13,37 ± 0,13 <sup>cd</sup>	16,31
Glutamate de sodium	0,00 ± 0,01	8,03 ± 0,16 <sup>g</sup>	0,00	11,49 ± 0,28 <sup>f</sup>	0,00
	0,50 ± 0,01	12,94 ± 0,11 <sup>bc</sup>	61,15	13,07 ± 0,01 <sup>d</sup>	13,73
	4,00 ± 0,01	13,53 ± 0,04 <sup>a</sup>	68,52	13,90 ± 0,02 <sup>a</sup>	20,95
	8,00 ± 0,01	13,38 ± 0,26 <sup>ab</sup>	66,56	13,86 ± 0,07 <sup>a</sup>	20,56
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,00 ± 0,01	8,03 ± 0,16 <sup>g</sup>	0,00	11,49 ± 0,28 <sup>f</sup>	0,00
	0,50 ± 0,01	9,97 ± 0,13 <sup>f</sup>	24,13	13,49 ± 0,07 <sup>bc</sup>	17,38
	4,00 ± 0,01	12,77 ± 0,10 <sup>c</sup>	59,00	13,27 ± 0,01 <sup>bcd</sup>	15,47
	8,00 ± 0,01	12,74 ± 0,06 <sup>c</sup>	58,62	13,16 ± 0,03 <sup>cd</sup>	14,51
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00 ± 0,01	8,03 ± 0,16 <sup>g</sup>	0,00	11,49 ± 0,28 <sup>f</sup>	0,00
	0,50 ± 0,01	9,54 ± 0,04 <sup>f</sup>	18,84	11,58 ± 0,07 <sup>f</sup>	0,75
	4,00 ± 0,01	11,87 ± 0,01 <sup>e</sup>	47,79	11,95 ± 0,05 <sup>e</sup>	3,95
	8,00 ± 0,01	12,02 ± 0,05 <sup>de</sup>	49,66	12,04 ± 0,03 <sup>e</sup>	4,75

#### 4. Conclusion

Les résultats obtenus de cette étude montrent que l'utilisation d'urée, de glutamate de sodium, de dihydrogénophosphate de potassium et de sulfate de magnésium heptahydraté contribue à une amélioration de la réaction de fermentation alcoolique du moût de sucrose (DN) par quatre souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette production d'alcool dépend à la fois de la nature et de la concentration du nutriment utilisé. La capacité fermentaire de S2, S3 ou de S4 dépasse celle de S1 montrant que ces souches importées sont probablement mieux adaptées à une production intensive d'éthanol par rapport à S1. L'apport d'autres facteurs comme les vitamines, les oligoéléments, l'air et/ou la modification du mode de fermentation peut probablement conduire à une consommation totale du sucre en vue d'une optimisation du rendement de production.

#### Références bibliographiques

[1] Demirbas A. Fuel alternatives to gasoline. *Energy Source Part B. Economics, planning & Policy* (2007) 2 (3), 311-320.  
 [2] Brandberg T.; Lena G. and Frazén C. J. The impact of severe nitrogen limitation and microaerobic conditions on extended continuous cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* with cell recirculation. *Enz. Microbial Technol* (2007) 40, 585-593.  
 [3] Ward O. P. and Singh A. Bioethanol technology: Development and perspectives. *Adv. Applied Microbiol.* (2002) 51, 53-80.

[4] Bai F.W.; Anderson W. A. and Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.*(2008) 26, 89-105.  
 [5] Pokhrel C. P.; Yadav R. K. P. and Ohga S. Agricultural waste residues as potential sources of bioethanol. *Sci. World* (2008) 6, 19-23.  
 [6] Wyman C. E. Twenty years of trials, tribulations, and research progress in bioethanol technology: selected key events along the way. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2001) 91-93, 5-21.  
 [7] Khongsay N.; Laopaiboon L.; Jaisil Prasit and Laopaiboon P. Optimization of Agitation and Aeration for Very High Gravity Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae* Using an Orthogonal Array Design. *Energies* (2012) 5, 561-576.  
 [8] Olofsson K.; Bertilsson M. and Lidén G. A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels* (2008) 1, 7.  
 [9] Sanchez O. J. and Cardona C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Biorecourse Technology* (2007) 99 (13), 5270-5295.  
 [10] Limtong S.; Sringiew C. and Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolate *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technol.*(2007) 98, 3367- 3374.  
 [11] Sadae T. M. and Batista B. J. Effect of the presence of inicial etanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian J. Microbiol.* (2003) 34, 242-254.  
 [12] Cot M. Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées, Université de Toulouse, France, (2006) 265p.

- [13] Kosaric N. and Vardar-Sukan F. *Microbiology and biochemistry of ethanol formation. In The biotechnology of ethanol ed. Roehr, M. Weinheim (Germany) : Wiley-VCH. (2001) p89-107.*
- [14] Glazer A. N. and Nikaïdo H. *Ethanol. In Fundamentals of applied microbiology (Edition). W. H. Freeman and company: (1993) 359-391.*
- [15] Lange H.; Bavouzet J. M.; Taillandier P. and Delorme C. Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions. *Biotechnology Techniques* (1993) 7 (3), 223-228.
- [16] Alfenore S. ; Molina-Jouve C. ; Guillouet S. E.; Uribebarrea J. L.; Goma G. and Benbadis L. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2002) 60, 67-72.
- [17] Zoeckli B. W.; Fugelsang K.C.; Gump B. H. and Nury F. S. *Laboratory Procedures: Wine Analysis and Production. 1st (Edition). Chapman and Hall: New York, (1995).*
- [18] Sidney W. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (OAC). Fourteenth (Edition). Inc. 1111 North Nineteenth: Street Suite 210, Alington, Virginia 22209 USA (1984).*
- [19] Demirbas A.; **2010**. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management: 51, p.2738-2749*
- [20] Poitrat, E. "Les biocarburants" - techniques de l'Ingénieur, traité Génie Energétique –fascicule BE 8550-1 - BE 8550-13.
- [21] Casey G. P. and Ingledew W. M. Ethanol tolerance in yeasts. *Crit Rev Microbiol* (1986) (13), 219-280.
- [22] Duntze W.; Atzpodien W. and Holzer H. Glucose-dependent enzyme activities in different yeast species. *Arch. Mikrobiol.* (1967) 58, 296-301.
- [23] Pascual C.; Alonso A.; Garcia I. and Romay C. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* (1988) 32, 374-378.
- [24] Birch R. M. and Walker G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol* (2000) 26, 678-687.
- [25] Nishino H., Miyasaki S. and Tohjo K. Effect of Osmotic Pressure on the Growth Rate and Fermentation Activity of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic* (1985) 36 (2), 170-174.
- [26] Maiorella B. L.; Blanch H. W. and Wilke C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng* (1983) 25, 103-121.
- [27] Morris E. O. *Yeast growth in the chemistry and biology of yeasts, H. edited by cook A. Academic Press Inc: Publisher. New York (1958).*