

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Akli MOHAND OULHADJ-Bouira

Faculté des Sciences & des Sciences Appliquées
Département de Génie des Procédés



Mémoire

Présenté par

LARBI Mounir

BERRICHE Abderrazak

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Sciences & Génie de l'Environnement
Spécialité : Génie de l'Environnement

**Production d'éthanol à partir de
grignon d'olive par procédé de
Saccharification et de Fermentation
Simultanées (SFS)**

Soutenu le 26 / 02 / 2020

Devant le jury composé de :

Mr. LOUNICI H.	Professeur, Université de Bouira	Président du jury
Mr. KERNANI R.	MCB, Université de Bouira	Rapporteur
Mme. HAMMACHE F.	MCB, Université de Bouira	Examinatrice
Mme. HADIOUCHE D.	MCB, Université de Bouira	Examinatrice

Année universitaire : 2018 / 2019

Résumé: L'industrie de l'huile d'olive est un secteur industriel en croissance dans les pays méditerranéens. Malheureusement, environ 30 à 35 % du poids total des olives sont jetés sous forme de grignon d'olive, un déchet solide très polluant pour l'environnement. Comme biomasse lignocellulosique, la valorisation de grignon d'olive pour la production d'éthanol par procédé de Saccharification et de Fermentation Simultanée (SFS), a fait l'objet de ce mémoire. Le grignon est une biomasse lignocellulosique, apte à être hydrolysé par les cellulases. Le prétraitement à la soude a montré une efficacité plus au moins prononcée que le traitement à l'acide faible en ce qui concerne la solubilisation des polysaccharides lignocellulosiques et les rendre accessibles à l'hydrolyse enzymatique au cours de la SFS. Après 48 heures de fermentation, une concentration en éthanol de 4.37 g/L a été obtenue.

Mots clés : Grignon d'olive ; Saccharification ; Fermentation ; Biomasse lignocellulosique

Abstract: The olive oil industry is a growing industrial sector in the Mediterranean countries. Unfortunately, around 30 to 35% of the total weight of the olives is thrown away in the form of an olive pomace, a solid waste that pollutes the environment. As lignocellulosic biomass, the recovery of olive pomace for the production of ethanol by the process of Saccharification and Simultaneous Fermentation (SSF), was the subject of this thesis. The pomace is a lignocellulosic biomass, capable of being hydrolyzed by cellulases. The sodium hydroxide pretreatment has shown a more or less pronounced efficacy than the weak acid treatment with regard to solubilizing the lignocellulosic polysaccharides and making them accessible to enzymatic hydrolysis during SSF. After 48 hours of fermentation, an ethanol concentration of 4.37 g / L was obtained.

Keywords: Olive pomace; Saccharification; Fermentation; Lignocellulosic biomass

ملخص: صناعة زيت الزيتون قطاع صناعي متنامٍ في دول البحر المتوسط. لسوء الحظ، يتم التخلص من حوالي 30 إلى 35% من إجمالي وزن الزيتون في شكل ثفل الزيتون، وهو عبارة عن نفايات صلبة تلوث البيئة. كتلة حيوية لينيوسيلولوزية،

كان تقييم ثفل الزيتون لإنتاج الإيثانول عن طريق عملية التسكر والتخمير المتزامن موضوع هذه الأطروحة. الثفل عبارة عن كتلة حيوية قادرة على التحلل بواسطة سيلولاز، أظهرت المعالجة السابقة لهيدروكسيد الصوديوم فعالية أكثر أو أقل وضوحاً من المعالجة الحمضية الضعيفة فيما يتعلق بإذابة عديد السكريات اللينوسيلولوزية وجعلها متاحة للتحلل المائي الأنزيمي خلال عملية التسكر والتخمير المتزامن. بعد 48 ساعة من التخمير، تم الحصول على تركيز من الإيثانول بنسبة 4.37 جم / ل

كلمات البحث: ثفل الزيتون. تسكر. التخمر. الكتلة الحيوية

Remerciements

C'est plus que agréable pour nous, d'exprimer notre sincère gratitude et notre profonde reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, au succès de ce mémoire.

Notre première dette de gratitude doit aller à Mr. KERNANI R., MCB à l'université de Bouira, avec qui nous avons eu le grand plaisir de travailler tout au long de ce mémoire. Nous avons trouvé auprès de lui rigueur et disponibilité. Il nous est particulièrement agréable de le remercier pour l'aide constante et efficace qu'il n'a cessé de nous prodiguer. Qu'il en soit vivement remercié.

Nous tenons à témoigner ici nos respectueuses reconnaissances à Mr. LOUNICI H., Professeur à l'université de Bouira, pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail, en acceptant d'examiner ce travail et de présider le jury. Il nous est agréable de remercier profondément M^{me}. HAMMACHE F., MCB de l'Université de Bouira et M^{me}. HADIOUCHE D., MCB de l'Université de Bouira, de nous avoir fait l'honneur de juger ce travail. Qu'ils soient assurés de notre profonde reconnaissance.

*Nous tenons à remercier la **SARL TANGO**, de nous avoir reçu comme stagiaires et pour sa fourniture en enzyme ainsi que d'autres produits. Que les cadres et le personnel d'encadrement de l'entreprise, soient ici infiniment remerciés*

*LARBI Mounir
BERRICHE Abderrazak*

Dédicaces

*A Nos Parents ;
A Nos Familles ;
& A Nos Ami(e)s.*

*LARBI Mounir
BERICHE Abderrazak*

Table des matières

Introduction générale	9
I Etude bibliographique	12
1 Biomasse et sa disponibilité	13
1.1 Le potentiel mondial en biomasse lignocellulosiques	14
1.2 Biomasse ; Définition et sources	15
1.2.1 Déchets solides	15
1.2.2 Résidus agricoles	16
1.3 Aperçu des procédés de conversion de la biomasse	16
1.4 Noyaux d'olive comme biomasse	18
1.4.1 L'olive ; le fruit	18
1.4.2 Procédés d'extraction de l'huile d'olive et ses sous-produits associés	19
1.4.3 Composition des grignon d'olive	20
1.4.4 Sucres des grignons d'olive : structure et extraction	21
1.4.5 Production d'éthanol à partir des grignons d'olive	21
2 Substrat lignocellulosique comme source de sucres fermentissable	23
2.1 Caractéristiques du substrat lignocellulosique	24
2.2 Sucres à partir de la cellulose	25
2.3 Facteurs influant sur la digestibilité de la cellulose	26
2.3.1 La teneur en lignine	26
2.3.2 Teneur en hémicellulose	26
2.3.3 Teneur en acétyle et autres inhibiteurs	27
2.3.4 Cristallinité de la cellulose et leur degré de polymérisation	27
2.3.5 Surface spécifique et volume des pores	28
2.4 Prétraitement des substrats lignocellulosique	28
2.4.1 Prétraitements physiques	29
2.4.2 Prétraitements chimiques	30
2.4.2.1 Prétraitement catalysé par un acide dilué	30

2.4.2.2	Prétraitement catalysé par un acide concentré	30
2.4.2.3	Prétraitement en conditions alcalines	31
2.4.2.4	Les solvants organiques	32
2.4.3	Prétraitements physiques	32
2.4.3.1	Comminution ou réduction de taille	33
2.4.3.2	Hydrolyse à la vapeur	33
2.5	Prétraitement biologique	34
2.5.1	Les bactéries	34
2.5.2	Les champignons	35
2.6	Prétraitement hybride (combiné)	35
2.7	Composés inhibiteurs	35
2.8	Détoxication de la biomasse prétraitée	36
2.9	Hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique	38
2.9.1	Enzymes cellulolytiques	39
2.9.2	Facteurs affectant l'hydrolyse enzymatique	39
2.9.3	Stratégie d'hydrolyse et de fermentation	41
3	Fermentation des sucres en éthanol	44
3.1	Présentation de la molécule d'éthanol	44
3.2	Origines et applications industrielles de l'éthanol	45
3.3	Défis de la production d'éthanol	45
3.4	La fermentation alcoolique	46
3.5	Levures et autres microbes pour la fermentation	46
3.5.1	Les bactéries	47
3.5.2	Les levures	47
3.6	Fermentation des sucres en éthanol	49
3.6.1	Évolution des paramètres liés à la fermentation	49
3.6.1.1	Évolution de la densité	49
3.6.1.2	Évolution du CO ₂	50
3.6.1.3	Évolution du pH	50
3.6.1.4	Évolution de la température	50
3.6.1.5	Assimilation de O ₂	50
3.6.2	Impact de l'éthanol, de la température et du pH sur la croissance de la levure	51
3.7	Bio-réacteur ; critère de conception	51
3.7.1	Fermentation en batch	51
3.7.2	Fermentation semi-continue	52
3.7.3	Fermentation en continue	52
II	Matériels & Méthodes Analytiques	54
4	Matériels et méthodes analytiques	55

4.1	Matériel végétal	55
4.2	Préparation des échantillons	55
4.2.1	Séchage à l'air	56
4.2.2	Broyage et réduction de taille	56
4.2.3	Analyse de la distribution de la taille des particules	56
4.3	Analyses chimiques	56
4.3.1	Détermination du pH	57
4.3.2	Détermination de la teneur en eau et des solides totaux (NREL/TP-510-42621)	57
4.3.3	Détermination de la teneur en cendres (NREL/TP-510-42622)	57
4.3.4	Teneur en matières grasses résiduelle	58
4.3.5	Teneur en protéine	58
4.3.6	Détermination de la teneur en lignine soluble et insoluble (NREL/TP-510-42618)	59
4.3.7	Détermination de la teneur en hémicelluloses et en cellulose	59
4.3.8	Détermination de la teneur en sucre réducteur et non-réducteur	60
4.4	Mesure de l'activité enzymatique	61
4.4.1	L'enzyme : la Filtrase NLC L	61
4.4.2	Détermination de la teneur en protéine de l'enzyme	61
4.4.3	Détermination de l'activité enzymatique de la Filtrase NLC L	61
4.4.3.1	Détermination de l'activité de la carboxyméthyl-cellulase (CMCase) (endoglucanase)	61
4.4.3.2	Détermination de l'activité "papier filtre" (FPase)	61
4.5	Pré-traitement de l'échantillon	62
4.5.1	Pré-traitement par l'acide dilué	62
4.5.2	Pré-traitement par l'acide concentré	62
4.5.3	Pré-traitement par une base	62
4.6	Détoxication	63
4.6.1	Résidu liquide issu de prétraitement à l'acide dilué	63
4.6.2	Résidus liquides issus de prétraitement à l'acide concentrés et à la base	63
4.7	Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)	63
4.8	Hydrolyse enzymatique	63
4.9	Saccharification et fermentation simultanées (SFS)	64
4.9.1	Préparation de l'inoculum	64
4.9.2	Saccharification et fermentation simultanées (SFS) : le fermenteur	65
4.9.3	Saccharification et fermentation simultanées (SFS) : le protocole	65
4.9.4	Suivie de la fermentation	66
4.9.4.1	Détermination de la viabilité des cellules	66
4.9.4.2	Mesure de la densité	67
4.9.5	Évaluation de rendement en éthanol	67

III Résultats & Discussion	69
5 Résultats et discussion	70
5.1 Composition chimique du grignon d'olive	70
5.2 Analyse des bandes spectrales FTIR	71
5.3 Résultats de l'activité CMC _{ase} et FP _{ase}	71
5.4 Hydrolyse enzymatique	72
5.5 Viabilité des cellules	74
5.6 Essai de Saccharification et de fermentation	74
Conclusions & Perspectives	80
Références bibliographiques	81
bibliographie	81

Table des figures

1.1	Croissance des plantes	13
1.2	Cycle du carbone, photosynthèse et principales étapes des technologies de la biomasse	14
1.3	La biomasse ; potentiel & usages	15
1.4	Différentes voies de conversion de la biomasse [59]	17
1.5	Production mondiale moyenne d'huile d'olive (1000 tonnes) pour les années de récolte 1999/2000/2002/2003 [29]	18
1.6	Coupe transversale de l'olive [29]	19
2.1	Modèle de fibrilles élémentaires de cellulose des parois végétales et de leur synthèse. Les dimensions de la fibrille élémentaire de cellulose sont estimées à 3x5,5 nm [82]	24
2.2	Structure d'un polymère de cellulose avec des sous-unités n-2 anhydroglucose liées par des liaisons β - (1,4) -glycosidiques. Le monomère d'extrémité gauche n'est pas réducteur et le monomère d'extrémité droite est un glucose de type réducteur [55]	25
2.3	Particule de <i>Panicum virgatum</i> originale (à gauche), comparée à une particule de même espèce qui a subi un prétraitement hydrothermique (à droite) qui montre une augmentation de la surface et du volume des pores [55]	28
2.4	Représentation schématique montrant l'effet du prétraitement sur la biomasse lignocellulosique.[55, 28]	29
2.5	Mode d'action des enzymes cellulolytiques [19]	39

2.6	Aperçu simpliste des facteurs limitant l'hydrolyse efficace de la cellulose (symbolisé par les lignes droites). 1 : Inhibition des β -glucosidases et cellobiohydrolases par le glucose et le cellobiose, respectivement. 2 : Liaison improductive des cellobiohydrolases sur une chaîne cellulosique. En raison de la processivité des cellobiohydrolases et de leur forte liaison de la chaîne cellulosique dans leur noyau catalytique, des obstacles peuvent faire en sorte que les enzymes s'arrêtent et deviennent liées de manière improductive. 3 et 4 : Les hémicelluloses et la lignine associées ou couvrant les microfils brils empêchent les cellulases d'accéder à la surface de la cellulose. 5 : Les enzymes (cellulases et hémicellulases) peuvent être adsorbées de manière non spécifique sur des particules ou des surfaces de lignine. 6 : dénaturation ou perte d'activité enzymatique due au cisaillement mécanique, à l'activité protéolytique ou à une faible thermostabilité. [19]	40
2.7	Schéma simplifiant le procédé d'Hydrolyse et Saccharification Simultanée (HSS) des Hexoses [37]	42
2.8	Schéma simplifiant le procédé d'Hydrolyse et de Saccharification séparé des Hexoses [37]	42
3.1	Production d'éthanol de 1981 à 2016 (milliers de barils) Agence d'information sur l'énergie (U.S. Energy Information Administration, EIA).	46
3.2	Conversion théorique du glucose en éthanol	46
3.3	Principales caractéristiques d'une cellule typique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . [26]	47
3.4	Micrographie (x10000), montrant des tissus cicatriciels à la surface des cellules de <i>S. cerevisiae</i> , cicatrice de bourgeon et cicatrice de naissance [26]	48
3.5	Schéma de principe de la fermentation en continue : (a) culture continue en une étape utilisant un CSTR, (b) culture continue en plusieurs étapes utilisant plusieurs CSTR. Q = débit du flux d'alimentation ; S, X, P = concentrations de substrat, de biomasse cellulaire et de produit, respectivement ; V = volume de bouillon de culture dans une cuve de fermentation. Sous-indices : i, flux d'alimentation (influent) ; 1,2,...n-1, n, étapes du schéma en cascade [28]	52
4.1	Schéma de l'analyse compositionnelle des échantillons de grignon d'olive	55
4.2	Distribution des tailles des particules	57
4.3	Courbe d'étalonnage reliant la concentration en protéine à l'augmentation d'absorbance à 595 nm	58
4.4	Courbe d'étalonnage reliant la concentration en glucose à l'augmentation de l'absorbance à 490 nm.	60
4.5	Configuration expérimentale de fermenteur	65
4.6	Test de viabilité cellulaire utilisant la coloration au bleu de méthylène [72]	66
4.7	Courbe d'étalonnage reliant l'absorbance des solutions de dichromate de potassium à 584 nm en fonction de la concentration éthanol ayant réagi.	67

5.1	Spectres infrarouges de grignon d'olive brut (rouge), traité à l'acide (noir) et traité à la soude (bleu)	72
5.2	Hydrolyse enzymatique de résidus solide prétraité à l'acide dilué	72
5.3	Hydrolyse enzymatique de résidus solide prétraité à la base	73
5.4	Hydrolyse enzymatique de résidus solide prétraité à l'acide concentré	73
5.5	Image microscopique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sans dilution	75
5.6	Image microscopique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , dilution x 5	76

Liste des tableaux

1.1	Une composition chimique représentative de fruits d'olive (%)	19
1.2	Caractéristiques des grignons d'olives [29]	20
2.1	Liste de méthodes de prétraitement et mécanisme impliqués. [19]	29
2.2	Rendement en éthanol des tiges de maïs prétraitées par hydrolyse a l'acide sulfurique concentré [13]	31
4.1	Bandes d'absorbance FTIR dans la biomasse [27, 14, 2]	64
5.1	Composition chimique de grignon d'olive exprimée en pourcentage de poids sec	70
5.2	Évolution de la température interne, du pH de milieu, de la concentration en glucose, la densité et le pH milieu collecteur de CO ₂ pendant la fermentation de moût issu de prétraitement à l'acide dilué	75
5.3	Évolution de la température interne, du pH de milieu, de la concentration en glucose, la densité et le pH milieu collecteur de CO ₂ pendant la fermentation de moût issu de prétraitement à la soude	77
5.4	Rendement de fermentation des moût issu des prétraitements à l'acide dilué et à la base	77

Introduction générale

L'huile d'olive est considérée comme l'une des huiles les plus anciennes et les plus nutritives au monde. Au fil des siècles, l'huile d'olive est passée d'un aliment de base à un aliment de luxe et même fonctionnel en raison de ses bienfaits pour la santé, notamment la réduction de la prévalence du cancer et la diminution des cas de maladies cardiovasculaires [56].

Comme la production et la consommation mondiale d'huile d'olive continue d'augmenter, doublant de 2005 à 2019, la production de déchets d'olives, de résidus solides et liquides, ont également augmenté (International Olive Council, 2019). Et bien que, la mise en oeuvre de procédé de centrifugation en deux étapes (sans ajout externe d'eau) pour l'extraction de l'huile d'olive a considérablement réduit la consommation d'eau, un résidu à haute teneur en sucre, appelé grignons d'olive, qui est une combinaison de déchets d'olives solides et liquides, est toujours généré. Ces déchets hautement polluants contiennent de la pulpe, de l'eau de l'olive et des portions de graines et de noyaux d'olive, et constituent un handicap pour le développement et la croissance de cette industrie. Ainsi, l'impact environnemental du déversement incontrôlé de grignons d'olive devrait être réduit [4].

Plusieurs démarches ont été entreprise afin de réduire l'effet de ces déchets sur l'environnement, en passant de la simple tentative de leurs traitement, on est récemment passé à leur valorisation à savoir l'extraction et la fabrication de produits à valeur ajoutée. De plus, la production de biocarburant (bio-éthanol par fermentation [4, 46], bio-diesel par réactions chimiques de transestérification et d'estérification [24]. et/ou bio-gaz par méthanisation), a été démontrée.

D'un autre côté, les facteurs environnementaux et économiques pressants, en particulier la question du réchauffement climatique et la diminution des réserves des hydrocarbures fossiles, ont suscité un intérêt mondial pour la recherche d'énergies renouvelables pour remplacer les combustibles fossiles. Les biocarburants ont été considérés comme des alternatives potentielles aux combustibles fossiles pour l'avenir. Les biocarburants sont définis comme des carburants liquides, solides ou gazeux dérivés de sources biologiques renouvelables. Le bioéthanol a été considéré comme une alternative d'énergie propre en

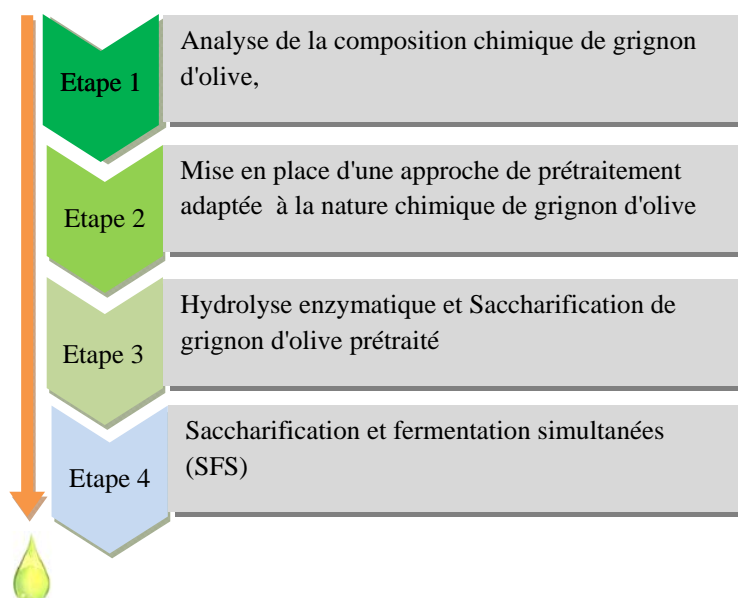
raison de sa combustion plus complète et de ses émissions de monoxyde de carbone plus faibles [64].

Actuellement, le bio-éthanol commercialisé est produit par fermentation de l'amidon ou du sucre simple à partir de cultures telles que le grain de maïs, la canne à sucre et les betteraves. Par conséquent, les coûts de production sont élevés en raison des frais de source et des frais d'exploitation plus élevés. De plus, la demande croissante et concurrente de bioéthanol peut entraîner une grave pénurie d'approvisionnement et des hausses de prix indésirables de ces produits alimentaires et de ses dérivés. Cependant, la biomasse lignocellulosique, en particulier les résidus agricoles, représente une ressource de biomasse qui a été reconnue comme une source durable pour produire du bioéthanol. A titre d'indication, la cellulose représente environ 20 à 30% des grignons d'olive et pourrait constituer une matière première intéressante à bas prix [46].

Toutefois, la conversion de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol est trop coûteuse pour être utilisée à l'échelle commerciale. Par conséquent, les chercheurs travaillent à améliorer l'efficacité et l'économie du processus de conversion de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol en concentrant leurs efforts sur deux volets à savoir, le choix de la biomasse, qui doit être disponible et l'hydrolyse de la cellulose qu'elle contient en sucre fermentescibles.

Objectifs de l'étude

La production de bio-éthanol, à partir de grignon d'olive est une recherche prometteuse, car elle jouerait un rôle important dans la protection de l'environnement, en tant que méthode de gestion de ce déchet, elle pourrait même être une alternative aux autres méthodes de traitement et de valorisation et pourrait également être une recherche exploratoire pour d'autres déchets agricoles. Les principaux points abordés dans ce mémoire sont résumés comme suit : (I) comprendre clairement la notion de biomasse et la composition de grignon d'olive en sucres fermentescibles ; (II) une étude des prétraitements disponibles de la biomasse (III) et l'étude de procédé de saccharification enzymatique et de fermentation ; (IV). Ce mémoire se concentrera principalement sur la recherche de la faisabilité de la conversion de grignon d'olive en éthanol. Les points qui ont fait l'objet de l'étude, en ordre, sont démontrés ci-dessous.



Première partie

Etude bibliographique

Chapitre 1

Biomasse et sa disponibilité

Introduction

Les plantes sont des cellules solaires naturelles qui capturent la lumière du soleil et la stockent sous forme de glucides, consommant de l'eau et du dioxyde de carbone (CO_2) et libérant de l'oxygène (O_2) au cours du processus (Fig.1.1)

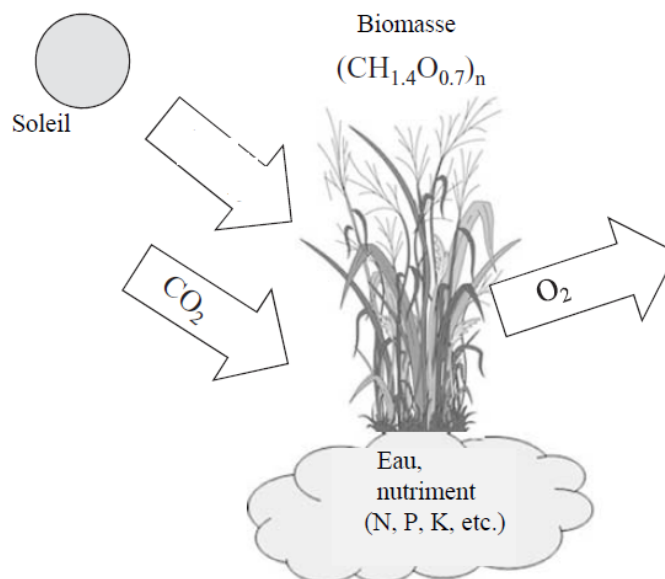


FIGURE 1.1 – Croissance des plantes

Les plantes terrestres ne capturent que 0,02 % de l'énergie solaire atteignant la Terre. Cependant, en raison de la grande surface de la terre, cette quantité d'énergie équivaut à environ sept fois la consommation d'énergie de la population mondiale. En règle générale, un mètre carré de terrain d'une culture en croissance, peut stocker environ 18 MJ par an. Certaines plantes ne produisent pas de nourriture, alors que d'autres produisent des composants alimentaires et non alimentaires. Le composant non alimentaire contient de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses, appelées "biomasse lignocellulosique" [59].

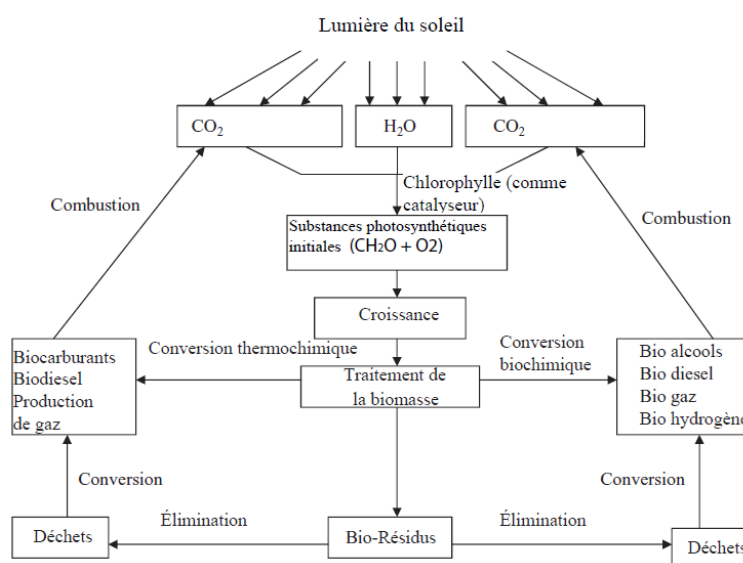


FIGURE 1.2 – Cycle du carbone, photosynthèse et principales étapes des technologies de la biomasse

La biomasse est convertie en énergie par combustion directe ou par conversion en gaz ou en combustible liquide, qui est ensuite suivie d'une combustion. Le produit de l'utilisation des biocarburants est le CO_2 , qui s'inscrit dans le cycle naturel du carbone (Fig. 1.2)

1.1 Le potentiel mondial en biomasse lignocellulosiques

La biomasse peut être considérée comme la meilleure option d'énergie renouvelable. Le potentiel annuel mondial de biomasse est de 6.49 milliards de tonnes, dont 2.48 milliards sont déjà utilisées. La biomasse excédentaire, 4.01 milliards de tonnes, peut être utilisée pour la production de biocarburants. En effet, la biomasse lignocellulosiques peut contenir jusqu'à 75% de glucides et dans un avenir proche, elle deviendra une source essentielle de glucides fermentescibles qui peuvent constituer la base de la production de biocarburant liquide pour le secteur des transports ainsi que pour la production d'une grande variété de produits chimiques de base et de matériaux biodégradables (Fig. 1.3). Il est prévu que l'industrie pétrochimique actuelle basée sur les ressources fossiles sera progressivement remplacée par des bioraffineries, qui produisent un certain nombre de produits précieux à partir de la biomasse lignocellulosiques, y compris de l'énergie sous forme de combustibles, de la chaleur et d'électricité [19].

L'utilisation d'hydrates de carbone fournira dans l'avenir, une voie viable vers des produits tels que les alcools, les esters et les acides carboxyliques, qui sont chers à produire dans l'industrie pétrolière. Un problème clé pour les bioraffineries est la conversion des glucides des biomasses lignocellulosiques en sucres fermentescibles. L'hydrolyse efficace et économique de la cellulose et de l'hémicellulose en monosaccharides est un défi pour leur utilisation et une attention particulière devrait être portée à cette étape [19].

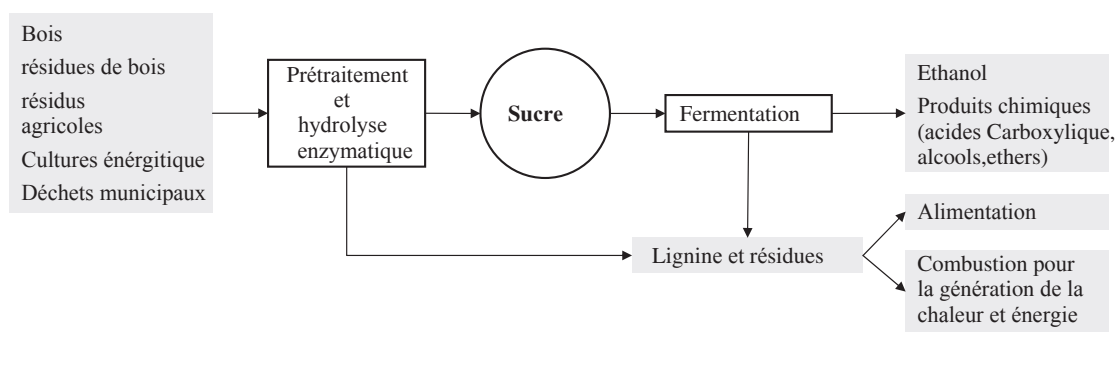


FIGURE 1.3 – La biomasse ; potentiel & usages

1.2 Biomasse ; Définition et sources

La biomasse désigne généralement le bois, l'herbe, les cultures ligneuses et herbacées à rotation courte, la bagasse (résidu fibreux de la canne à sucre), les déchets de bois, la sciure de bois, les déchets agricoles, les résidus industriels, les vieux papiers, les déchets solides municipaux, les déchets issus du traitement des produits alimentaires, les plantes aquatiques ; les algues, les déchets d'animaux et similaires. En théorie, les combustibles fossiles peuvent également être qualifiés de biomasse, car ce sont les vestiges fossilisés de plantes qui ont poussé il y a des millions d'années. Cependant, dans la pratique, les combustibles fossiles sont exclus de la définition de la biomasse, principalement parce que l'utilisation de combustibles fossiles entraîne une augmentation de la concentration de CO_2 dans l'atmosphère. On trouve de nombreuses définitions de terme "biomasse". Elle est définie comme "une ressource énergétique dérivée de la matière organique". La FAO définit la biomasse comme "une matière d'origine biologique à l'exclusion du matériel incorporé dans les formations géologiques et transformé en fossile" [59].

1.2.1 Déchets solides

Les déchets industriels et municipaux représentent une source de biomasse intéressante, car ils ont déjà été collectés et peuvent être acquis à un coût négatif en raison des frais de déversement (c'est-à-dire que les sources paieront pour se débarrasser des déchets) [76, 59].

Jusqu'au début des années 90, la combustion était la principale technologie utilisée dans le traitement des déchets solides et dans certains cas, leur tri. Dans les années 90, les préoccupations environnementales et socioéconomiques ont favorisées le recyclage direct des déchets et des résidus. Toutefois, l'approche de recyclage a été limitée en raison des préoccupations liées aux coûts et à la présence de polluants tel que les métaux lourds dans ces déchets. Cependant, avec la facture énergétique qui devient de plus en plus élevée, la transformation des déchets solides en matériaux de valeur et en énergie, par valorisation, est en train de devenir une forte tendance [76, 59].

1.2.2 Résidus agricoles

Les résidus agricoles pourraient être utilisés comme matière première pour la production de bioéthanol. Les progrès de la biotechnologie industrielle offrent de nombreuses possibilités d'utilisation économique des résidus agro-industriels. Les résidus agricoles peuvent être divisés en deux catégories : (1) résidus de champs : qui correspondent aux matériaux laissés dans les champs ou les vergers après la récolte, et (2) les résidus du traitement : qui consiste en matériaux laissés après le traitement de la culture en une ressource utilisable. Les résidus de terrain comprennent les tiges, les feuilles et les gousses et les résidus du traitement comprennent les cosses, les noyaux d'olive, les graines, la bagasse et les racines [76, 3, 59].

Une grande quantité de résidus agricoles est produite et utilisée de manière inefficace dans de nombreux pays en développement, entraînant une contamination de l'environnement. Les difficultés surviennent pendant le transport, et le stockage à long terme. Les résidus volumineux créent également des problèmes lors de la combustion directe traditionnelle ou dans des fours conventionnels, en association avec des rendements de combustion très faibles et une pollution de l'air. Les rendements de conversion énergétique des résidus sont aussi faibles (20 à 40 %), en association avec une combustion incomplète de carbone sous forme de CO, dépassant 10 000 ppm dans les gaz de combustion, et des émissions de particules qui dépassent 3 000 mg.Nm⁻³ [3, 59].

D'autre part, une partie de ces résidus est utilisée pour produire de biogaz par phénomène de digestion anaérobie, par lequel la matière organique est transformée en méthane (CH₄) en l'absence d'air (oxygène). Le méthane libéré par l'activité microbienne est estimé à environ 590 à 880 millions de tonnes dans l'atmosphère dans le monde, et le méthane émis par des sources biogéniques contribue à environ 90% des émissions mondiales de méthane. Le reste est d'origine fossile. Le potentiel de réchauffement planétaire dû au méthane est 21 fois supérieur à celui du CO₂ [3, 59].

De plus, la gazéification de la biomasse signifie la combustion incomplète de la biomasse, ce qui entraîne la production de gaz combustibles constitués de monoxyde de carbone (CO), d'hydrogène (H₂) et de méthane (CH₄). Ce mélange de gaz peut être utilisé pour faire fonctionner les moteurs à combustion interne et peut remplacer le mazout de chauffage et aussi peut être utilisé pour produire de méthanol, un produit chimique extrêmement attrayant [3, 59].

1.3 Aperçu des procédés de conversion de la biomasse

Pour utiliser l'énergie disponible dans la biomasse, il est nécessaire d'utiliser un procédé soit pour libérer l'énergie directement, comme dans la combustion directe pour la production de la chaleur, soit pour la transformer en d'autres formes telles que les combustibles ; solide, liquide ou gazeux. Il existe actuellement trois principaux types de technologies

de conversion : thermique, chimique et biochimique (Fig.1.4). Ces technologies peuvent également être utilisées en combinaison. Comme leur noms l'indiquent, les procédés de conversion thermique utilisent principalement la chaleur pour convertir la biomasse en d'autres formes. Les procédés de conversion thermique incluent la combustion, la pyrolyse, la torréfaction et la gazéification. La pyrolyse est la décomposition de la biomasse à des températures élevées en l'absence d'oxygène. La torréfaction est une pyrolyse à basse température. La gazéification est la conversion de la biomasse solide en divers gaz en utilisant de la chaleur et des quantités variables d'oxygène. La conversion chimique implique l'utilisation d'agents chimiques pour convertir la biomasse en combustibles liquides. La conversion biochimique implique l'utilisation d'enzymes, de bactéries ou d'autres micro-organismes pour décomposer la biomasse par les processus de digestion anaérobie, de fermentation ou de compostage [59].

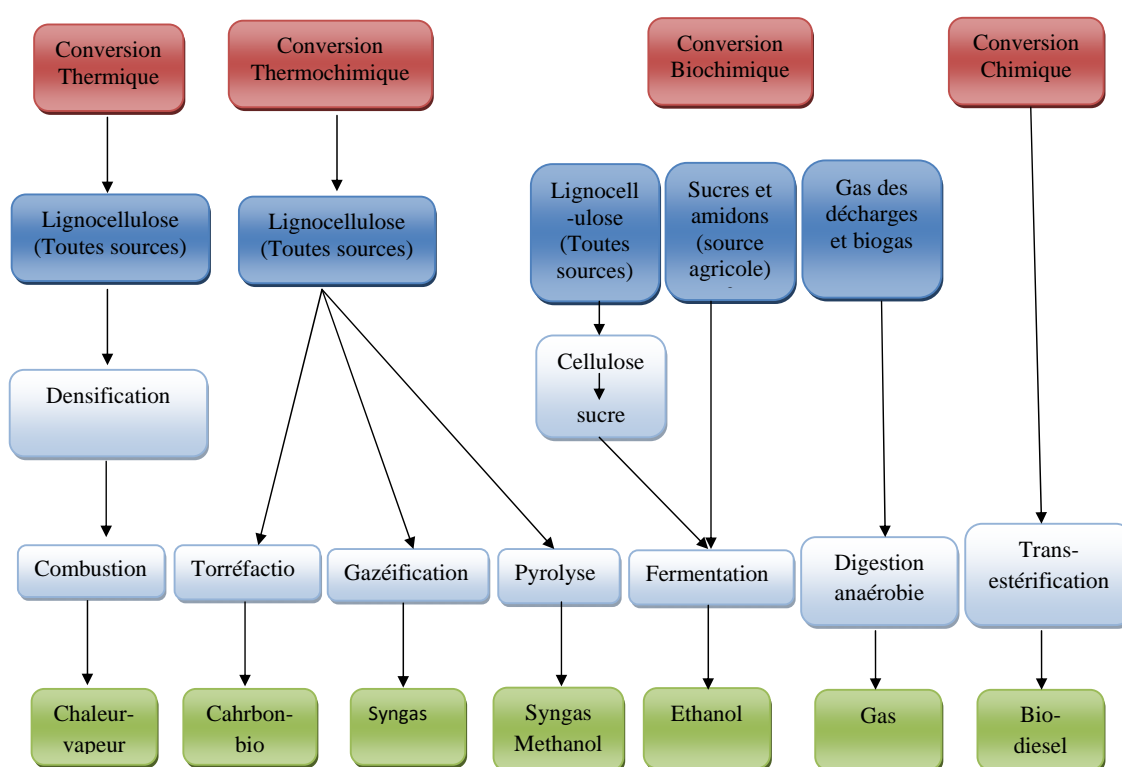


FIGURE 1.4 – Différentes voies de conversion de la biomasse [59]

Dans la conversion biologique des biomasses lignocellulosiques, un prétraitement est nécessaire. Les prétraitements décomposent la cellulose et l'hémicellulose en sucres et séparent la lignine et les autres composants végétaux des matières fermentescibles. Les technologies de prétraitement sont physiques, chimiques, biologiques et combinatoires ; le prétraitement à utiliser dépendra de la nature de la matière première. Le prétraitement physique comprend l'exposition aux rayons gamma ; les méthodes chimiques comprennent l'utilisation d'acides, de bases et de liquides ioniques ; et les méthodes biologiques comprennent l'utilisation de micro-organismes pour dégrader la lignine et l'hémicellulose [59].

1.4 Noyaux d'olive comme biomasse

L'olivier est largement cultivé en Algérie, dans le nord de l'Afrique, le sud de l'Europe, le Moyen-Orient et dans d'autres régions de la planète à climat méditerranéen, afin de produire des olives comestibles et de l'huile d'olive. Ces pays fournissent 98% de la superficie totale consacrée à la culture de l'olivier. L'Espagne se classant au premier rang pour une superficie totale cultivée (2 400 000 ha) et l'Union européenne (UE) est le premier producteur d'huile d'olive avec 80,2% du total produit dans le monde (Fig.1.5) [29].

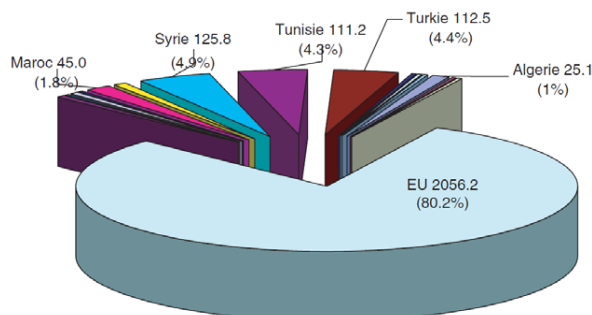


FIGURE 1.5 – Production mondiale moyenne d'huile d'olive (1000 tonnes) pour les années de récolte 1999/2000/2002/2003 [29]

La production mondiale de l'huile d'olive n'a cessé d'augmenter pour atteindre 2.861.500 tonnes pour la période de 2009/2010. Ceci peut être expliqué par la réussite de régime méditerranéen, qui est associé à des incidences plus limitées de certaines maladies comme le cancer et les maladies cardio-vasculaires [53].

Cependant, la culture de l'olivier, produit une grande quantité de sous-produits. On estime que la taille à elle seule produit 25 kg de sous-produits (brindilles et feuilles) par arbre et par an. D'autre part, les déchets liés à l'extraction de l'huile d'olive sont un problème environnemental important, en particulier dans les espaces méditerranéens. L'extraction de l'huile d'olive est réalisée par des procédés discontinus (pressage) ou continus (centrifugation) [53, 32]. Les deux procédés fournissent trois fractions : un résidu solide et deux phases liquides. Dans ce contexte, des travaux de recherche récents mettent en évidence les approches du traitement et les options de valorisation des résidus et déchets de l'olivier, principalement ceux permettant la récupération de composants naturels de valeur tels que les composés phénoliques, les fibres alimentaires, les aliments pour animaux, les biocarburants, le biogaz, les enzymes et les polymères [38, 32, 23].

1.4.1 L'olive ; le fruit

L'olive est techniquement une drupe et se compose essentiellement de trois parties : l'épicarpe, le mésocarpe et l'endocarpe (Fig.1.6). L'épicarpe (peau ou épiderme) est recouvert de cire et reste vert tout au long de la phase de croissance. Il peut ensuite virer au violet, au marron ou au noir à maturité selon la variété. Le mésocarpe (pulpe ou chair)

TABLE 1.1 – Une composition chimique représentative de fruits d'olive (%)

Composant	Le mésocarpe	L'endocarpe	Noyau
Eau	50-60	9.3	30
Huile	15-30	0.7	27.3
sucre	3-7.5	41	26.6
Cellulose	3 - 6	38	1.9
Minéraux	1-2	4.1	1.5
Poly phénol	2.25 - 3	0.1	5-1

a une faible teneur en sucre (3-7,5%) et une teneur élevée en huile (15-30%) qui varie en fonction de la variété et de la maturité du fruit. L'endocarpe (noyau) est dur et constitué de lignine fibreuse. Sa forme ovoïde et son étendue de sillon sont des caractéristiques variétales. L'endocarpe renferme le noyau d'olive (graine) qui représente environ 3% du poids du fruit et 2 à 4% de l'huile de fruit totale. Les compositions chimiques des différentes parties de l'olive sont indiquées dans le tableau 1.1 [29].

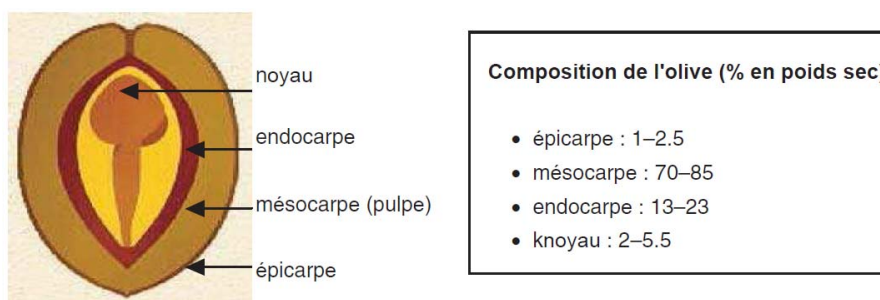


FIGURE 1.6 – Coupe transversale de l'olive [29]

1.4.2 Procédés d'extraction de l'huile d'olive et ses sous-produits associés

Le procédé dit discontinu ou par pressage est la méthode la plus ancienne et la plus répandue pour le traitement des olives afin d'obtenir de l'huile. Après le broyage, la pâte d'olive est étalée sur des disques en fibres (d'origine naturelle ou synthétiques) empilés les uns sur les autres, puis placés dans une presse. Une pression est exercée sur les disques pour compacter la phase solide et percoler les phases liquides (huile et eau de végétation). Ce procédé produit une fraction solide appelée grignons d'olive (tourteaux d'olive) contenant de la pulpe d'olive, de la peau, des noyaux et de l'eau [53, 32, 31].

Les procédés d'extraction en continue utilisent un décanteur industriel pour séparer toutes les phases par centrifugation. Il sont basés sur les différences de densité des composants de la pâte d'olive (huile d'olive, eau et solides insolubles). Ces procédés produisent une grande quantité de margine (80 à 120 L / 100 kg d'olives) [53, 32, 31]. Les quantités de grignon d'olive produites sont relativement faibles par rapport aux autres résidus agri-

coles et forestiers. Cependant, plusieurs recherches soulèvent la possibilité d'utiliser des noyaux d'olive, qui seraient autrement gaspillés, pour produire de l'énergie ou décomposés en sucre puis fermentés pour produire de l'éthanol [20, 5, 45].

1.4.3 Composition des grignon d'olive

Le grignons d'olive est un sous-produit précieux issu de l'extraction de l'huile d'olive contrairement aux margines, qui sont des effluents industriels indésirables (charge organique élevée, avec une DCO allant jusqu'à 220 g.L^{-1}). Le grignon d'olive est obtenu par pressage traditionnel et centrifugation en décanteur triphasé. La composition chimique des grignons d'olive varie selon l'espèce, les conditions de culture, l'origine des olives et le procédé d'extraction. La cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont les composants principaux. Cependant, les graisses sont également présentes en quantités significatives. Les grignons issus des systèmes d'extraction en continu présente des caractéristiques très différentes de ceux des grignons d'olive des systèmes à presse traditionnels. Le premier se présente sous forme d'une boue épaisse et sa teneur en humidité est compris entre 65 et 75%, contre 22 à 25% dans les grignons d'olive pressés de façon traditionnelle [33, 17].

La majorité de la matière organique est constituée de composant de la paroi cellulaire : l'hémicellulose, la cellulose et la lignine. La teneur en lignine est particulièrement élevée. La quantité moyenne de lignine estimé de 10 à 30%, qui est similaire à celle des pailles (10-20%). Cependant, la teneur en lignine du tourteau d'olive est souvent surestimée en raison de la formation de complexes polysaccharide-protéine-composés phénolique, qui ressemblent étroitement à la lignine. La pulpe d'olive se compose de microfibrilles de cellulose existant dans une matrice de polysaccharides non celluliques, d'oligosaccharides, de glycoprotéines et de phénols maintenus ensemble avec une combinaison de liaisons covalentes et non covalentes telles que des liaisons hydrogène. Les conditions de traitement ont un effet important sur la quantité d'huile résiduelle laissée dans le tourteau d'olive, la quantité d'huile restant allant de 7,8 à 22,0%. Cette huile résiduelle est ensuite extraite à l'aide de solvants tels que l'hexane. La teneur en protéines brutes est généralement faible (3,3-10,3%). le tableau 1.2 résume la composition chimique des grignons d'olive obtenus des différents types de systèmes d'extractions de l'huile d'olive

TABLE 1.2 – Caractéristiques des grignons d'olives [29]

Paramètres	Système de pression	Système triphasé	Système biphasé
Humidité (%)	27,21 ±1,048	50,23 ±1,935	56,80 ±2,188
Huiles résiduelles (%)	8,72 3,254	3,89 1,449	4,65 1,736
Protéines (%)	4.77±0.024	3.43±0.017	2.87±0.014
Sucres total (%)	1.38±0.016	0.99±0.012	0.83±0.010
Cellulose (%)	24.14±0.283	17.37±0.203	14.54±0.170
Hémicelluloses (%)	11.00±0.608	7.92±0.438	6.63±0.366
Cendre (%)	2.36±0.145	1.70±0.105	1.42±0.088
Lignine (%)	14.18±0.291	0.21±0.209	8.54±0.175

1.4.4 Sucres des grignons d'olive : structure et extraction

La lignine, les polysaccharides cellulosiques et hémicellulosiques sont les principaux glucides isolés de résidu solide. Différentes méthodes ont été mise au point pour extraire et récupérer toutes ces fractions de polysaccharide et certains procédés ont été développés [48, 21]. Un traitement à la vapeur à haute pression suivi d'une décompression rapide a été présenté comme un prétraitement efficace pour le traitement des grignons d'olive. Ce prétraitement conduit à l'auto hydrolyse des hémicelluloses en oligomères ou en monosaccharides solubles dans l'eau et semble être un prétraitement prometteur pour convertir une biomasse de faible valeur riche en composants cellulosiques, hémicellulosique et lignocellulosiques, en produits utiles sur le plan commercial (aliments, carburants et produits chimiques). Dans ces conditions, le grignon d'olive est décrit comme une bonne source de glucides fermentescibles [2, 21].

1.4.5 Production d'éthanol à partir des grignons d'olive

Le grignon d'olive est un substrat candidat et une alternative prometteuse pour la production de l'éthanol. Les différents types de polysaccharides peuvent être convertis en éthanol via un ensemble de processus déployés en deux étapes distinctes. La première étape qui consiste en un prétraitement physico-chimique suivie d'une hydrolyse enzymatique pour la libération des sucres réducteurs, tandis que la seconde étape est leur bioconversion en éthanol par des levures ou des bactéries. D'autre part, les composants lignocellulosiques ont été prétraités à 160 °C avec de l'acide sulfurique dilués, suivis d'une précipitation et d'une filtration pour éliminer les inhibiteurs de fermentation. Les hydrolysats obtenus contenaient 18,1 g.L⁻¹ de sucres solubles, qui ont été fermentés par une souche d'*Escherichia coli* pour produire de l'éthanol avec un rendement de 0,45 g / g de sucre

Un prétraitement enzymatique de grignon d'olives, associant deux enzymes cellulosiques, Celluclast et Novozyme 188, combinée à une oxydation par voie humide a permis d'obtenir des concentrations de glucose et de xylose plus élevées par rapport aux expériences menées uniquement avec les enzymes. L'éthanol a été produit après une étape de fermentation ultérieure par *Saccharomyces cerevisiae* et *Thermoanaerobacter mathranii*. Cependant, Le rendement en éthanol le plus élevé a été obtenu lorsque seule l'étape de prétraitement enzymatique a été appliquée [6].

Des champignons sont aussi impliqués dans la production de l'éthanol à partir des résidus de l'huile d'olive. En effet, un prétraitement avec *Pleurotus sajor-caju* a montré sa capacité pour améliorer les rendements en éthanol, la production d'éthanol était de 14,2 g.l⁻¹ après 48 h de fermentation à l'aide de la levure. Cette souche est également capable d'éliminer les composés phénoliques [51].

D'autre part, Cuevas et al., (2009) ont prétraités les noyaux d'olives avec de l'eau chaude, à des températures comprises entre 175 et 225 °C et à haute pression (dans un autocuiseur), pour ensuite soumettre les composants liquides et solides à une hydrolyse enzymatique avec *Trichoderma viride*. L'hydrolysate obtenu a ensuite été fermenté avec une levure non traditionnelle à savoir *Pachysolen tannophilus* ATCC 3269. Des rendements de 5,7 kg d'éthanol par 100 kg de noyaux d'olive ont été atteints [47],

Chapitre 2

Substrat lignocellulosique comme source de sucres fermentissable

Introduction

L'utilisation des réserves mondiales en substrats lignocellulosiques et leur conversion en sucres fermentissable pour la production de l'éthanol, suscite de plus en plus un intérêt considérable [79]. De loin, la production et les stocks mondiale en biomasse lignocellulosique, en volume, est plus important que toute autre source de glucides. Étant donné que la valeur annuelle moyenne de l'énergie solaire incidente atteignant la surface de la Terre est estimée à $3,67 \cdot 10^{21}$ kJ par année. La photosynthèse globale (avec un rendement de 0,07 %) pourrait convertir $2,57 \cdot 10^{18}$ kJ par année, en biomasse contenant de la cellulose. Cette efficacité donnerait une production annuelle de $1,8 \cdot 10^{11}$ t de masse biodégradables, dont 40% de cellulose [77].

La lignocellulose (bois, résidus agricoles et déchets solides municipaux) est une matière première attrayante pour la production d'éthanol en raison de sa disponibilité à faible coût. Bien que les processus biologiques soient intrinsèquement efficaces, le prix de cette efficacité est la nécessité de traiter séparément chaque composant de la lignocellulose. Par exemple, la cellulose est difficile à hydrolyser en glucose, mais il est simple de fermenter le glucose en éthanol. De même, l'hémicellulose (principalement le xylose dans les feuillus et les herbes) se décompose facilement en sucres monomères avec des rendements élevés, mais le xylose est difficile à fermenter en éthanol. La lignine est un polymère phénolique qui, une fois séparé de la matrice lignocellulosique, doit être traité catalytiquement pour obtenir des produits utiles. Dans l'ensemble du procédé de production d'éthanol à partir de substrat lignocellulosique, la matière première est prétraitée, la cellulose est hydrolysée en glucose par un acide ou une enzyme, puis le glucose est fermenté en éthanol [77].

2.1 Caractéristiques du substrat lignocellulosique

Les substrats lignocellulosique sont principalement composée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine, ainsi que de petites quantités de protéines, de pectine, de substances extractives (par exemple, les sucres, la chlorophylle, les cires) et de cendres. La cellulose et les hémicelluloses sont deux grandes catégories de glucides ayant une valeur significative. Lorsqu'ils sont combinés, ils sont appelés holocellulose. La fraction de lignine est constituée de molécules de type non sucre.

La cellulose et les hémicelluloses sont la principale source de sucres fermentables en C6 et C5 dans la matière première lignocellulosique ; La cellulose est située principalement dans la paroi cellulaire secondaire et fait partie d'une structure fibreuse organisée (Fig. 2.4). Au niveau moléculaire, il s'agit d'un polymère linéaire de glucose composé d'unités d'anhydroglucose couplées les unes aux autres par des liaisons glycosidiques -1-4. Le nombre d'unités de glucose dans la molécule de cellulose varie de 250 à 10 000 selon la source et le prétraitement et présente un degré de polymérisation (DP) qui varie de 1 000 à 10 000 en fonction de la source [66, 19].

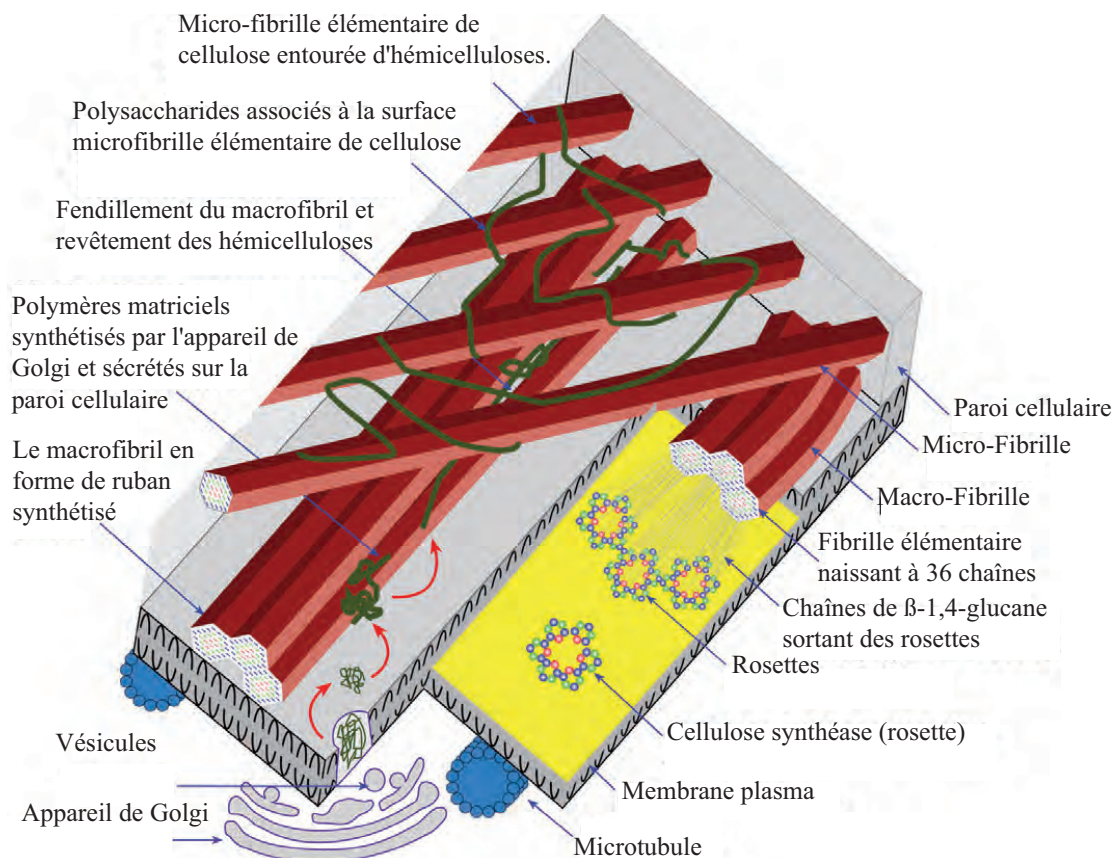


FIGURE 2.1 – Modèle de fibrilles élémentaires de cellulose des parois végétales et de leur synthèse. Les dimensions de la fibrille élémentaire de cellulose sont estimées à $3 \times 5,5$ nm [82]

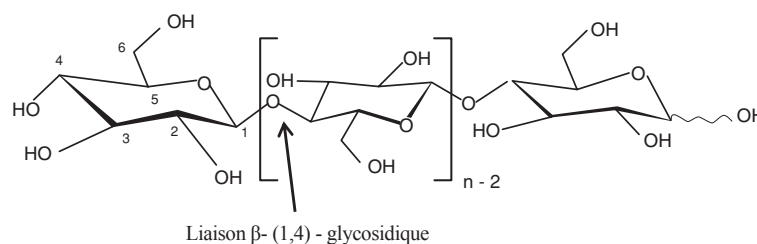


FIGURE 2.2 – Structure d'un polymère de cellulose avec des sous-unités $n-2$ anhydroglucose liées par des liaisons β - (1,4) -glycosidiques. Le monomère d'extrémité gauche n'est pas réducteur et le monomère d'extrémité droite est un glucose de type réducteur [55]

Les hémicelluloses contiennent différentes unités répétées de monosaccharide. Les hémicelluloses sont des polymères répéter d'unités de pentoses (xylose, rhamnose et arabinose), hexoses (glucose, mannose et galactose), et les acides uroniques (acides d-glucuroniques, d-galactouroniques et 4-O-méthylglucuroniques). Une autre différence avec la cellulose est que les molécules d'hémicellulose ont des chaînes ramifiées, bien que la chaîne principale puisse être un homopolymère ou un hétéropolymère (mélange de différents sucres). Les hémicelluloses ont pour principale fonction d'agir comme un ciment maintenant ensemble les micelles et les fibres de cellulose. Les hémicelluloses sont beaucoup plus faciles à hydrolyser que la cellulose, et ne sont pas agrégés même quand ils co-cristallisent avec des chaînes de cellulose et sont en grande partie solubles dans des solutions alcalines. Pour la viabilité économique de tout procédé impliquant l'utilisation de lignocellulosiques, un moyen de récupération de l'hémicellulose et / ou d'assimilation doit être inclus [77].

Le xylose ($C_5H_{10}O_5$), qui constitue le squelette du xylane, figure parmi les sucres les plus importants de l'hémicellulose. La chaîne des xylanes est constituée d'unités de xylose liées par des liaisons β - (1,4) -glycosidiques et ramifiées par des liaisons α - (1,2) -glycosidiques avec des groupes acide 4-O-méthylglucuronique.

La lignine est un polymère hautement réticulé de monomères phénoliques (par exemple, le guaiaacylpropanol, le p-hydroxyphényl propanol et l'alcool syringylique). La principale fonction de la lignine chez les plantes est d'apporter un support structurel et d'assurer l'imperméabilité et la résistance aux attaques microbiennes. Par conséquent, la lignine offre une résistance à l'utilisation de la cellulose et des hémicelluloses pour la production d'éthanol. Les quantités relatives varient avec la source. La matrice de lignine forme une gaine protectrice autour des microfibrilles de cellulose. [77, 66].

2.2 Sucres à partir de la cellulose

L'étape clé dans la production d'éthanol à partir de la cellulose (et éventuellement l'hémicellulose) est l'hydrolyse de la cellulose en sucre. Après cela, la fermentation, peut être utilisée. La cellulose et les hémicelluloses de la biomasse fournissent des sucres. En

plus du glucose ($C_6H_{12}O_6$), les hémicelluloses fournissent également du pentose ($C_5H_{10}O_5$).

Étant donné que les molécules de pentoses (sucres à cinq carbones) constituent une partie non négligeable des sucres disponibles, la capacité de les récupérer et de les fermenter en éthanol est importante pour l'efficacité et la rentabilité de procédé. Les sucres à six carbones (glucose, galactose et mannose) sont facilement fermentés en éthanol par des organismes tels que la levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) utilisée dans l'industrie brassicole. Récemment, des microorganismes spéciaux ont été modifiés par génie génétique, capables de fermenter des sucres à cinq carbones en éthanol avec un rendement relativement élevé.

2.3 Facteurs influant sur la digestibilité de la cellulose

La biomasse cellulosique contient généralement entre 55 et 75% en poids de cellulose et d'hémicelluloses. Le paramètre clé de la production d'éthanol est la digestibilité de la biomasse pour produire des sucres. Différents facteurs affectant la digestibilité de la biomasse sont discutés ci-dessous.

2.3.1 La teneur en lignine

La lignine est en grande partie concentrée entre les couches extérieures des fibres de cellulose / hémicellulose, offrant une rigidité structurelle. Une partie de la lignine est liée à la cellulose et aux hémicelluloses. De plus, la lignine assure une protection contre la dégradation microbienne des fibres par l'effet inhibiteur des phénols. Par conséquent, sa teneur affecte de manière significative l'hydrolyse de la biomasse. Elle peut également se lier à l'enzyme (cellulase), entraînant une moindre disponibilité de l'enzyme pour l'hydrolyse. Il a été démontré que les structures chimiques et physiques de la lignine jouent un rôle important dans la détermination de l'ampleur de l'inhibition qu'elle contribue à l'hydrolyse et que la structure de la lignine dépend fortement des conditions de traitement préalable du substrat. Les phénols, les phénolaldéhydes et les phénolcétones (cétones de Hibbert) sont de puissants inhibiteurs ; par conséquent, leur formation au cours du processus de prétraitement devrait être minimisée [49].

2.3.2 Teneur en hémicellulose

L'élimination des hémicelluloses peut améliorer considérablement l'hydrolyse de la cellulose. En outre, l'hydrolyse des hémicelluloses elle-même peut améliorer le rendement en sucre disponible pour la production d'éthanol. Par conséquent, les conditions de prétraitement sont optimisées pour éliminer la lignine et les hémicelluloses tout en maximisant le rendement en sucre. Les produits de dégradation des hémicelluloses furfural et hydroxyméthylfurfural inhibent la fermentation ultérieure. Le furfural et l'hydroxyméthylfurfural sont le résultat de la dégradation des pentoses et des hexoses, respectivement. Le furfural peut réagir davantage pour donner de l'acide formique. Avec l'optimisation des procédés,

il est possible de diminuer les composés inhibiteurs et augmenter les concentrations en sucre total. En fin de compte, c'est l'hydrolyse de la cellulose qui fournit la plus grande partie du glucose nécessaire à la production d'éthanol. L'augmentation de la récupération totale de sucres tout en minimisant la production d'inhibiteurs doit être comparée à l'effet négatif de l'hémicellulose du substrat [49, 19].

2.3.3 Teneur en acétyl et autres inhibiteurs

Dans les hémicelluloses, environ 70 % du xylane est acétylé de manière aléatoire (ils possèdent des groupes CH_3COO^-), ce qui peut entraver l'action enzymatique. Il a été démontré que l'élimination des groupes acétyl peut améliorer la digestibilité de la biomasse en augmentant la capacité de gonflement. Cependant, l'impact n'est pas aussi prononcé que celui de la réduction de la teneur en lignine [73, 19].

Globalement, les produits de dégradation tels que les phénols, les furannes et les acides carboxyliques sont des inhibiteurs de la fermentation. Pour que la production d'éthanol soit économiquement réalisable, il est nécessaire d'éliminer ou de détoxifier ces composés. En effet, la séparation de la fraction d'hémicellulose liquide contenant les composés inhibiteurs de la fraction de cellulose avant l'hydrolyse enzymatique et la fermentation peut réduire la teneur en composés inhibiteurs [36].

2.3.4 Cristallinité de la cellulose et leur degré de polymérisation

Similaire à l'amidon, la cellulose est un polymère de glucose. La disposition des monomères dans l'amidon est telle que les molécules de polymère ne s'assemblent pas dans une structure cristalline ; par conséquent, l'amidon reste amorphe et facilement accessible à l'hydrolyse et à la digestion enzymatique. D'autre part, les monomères de glucose dans la cellulose sont arrangés de manière à ce que les molécules de polymère puissent s'organiser en une structure cristalline. La cristallinité de la cellulose les protège des attaques enzymatiques et de la solubilisation dans l'eau ; par conséquent, la cristallinité de la cellulose affecte directement la digestibilité. Lors de la mesure de la cristallinité, il faut séparer la partie cristalline de la cellulose de celle de la biomasse entière, car la lignine est amorphe et son élimination se traduira par une augmentation de la cristallinité globale de la biomasse lorsque la cristallinité de la cellulose est constante [13].

Il est difficile d'évaluer uniquement l'effet du degré de polymérisation (DP) sur la digestibilité, ce dernier étant étroitement lié à la cristallinité et à la surface accessible. Si le prétraitement coupe les liaisons cellulosiques internes (par exemple, dans le prétraitement acide), il devient alors plus facile pour les enzymes (exocellulases) d'attaquer les chaînes restantes de polymère à faible DP. Ceci est en contraste avec le prétraitement qui protège les liaisons cellulosiques internes (par exemple, le prétraitement alcalin), qui ne causent pas une diminution importante du DP [13].

2.3.5 Surface spécifique et volume des pores

La biomasse lignocellulosique possède une surface limitée sur laquelle une enzyme peut travailler. Par conséquent, l'augmentation de la surface et du volume des pores est d'une importance capitale lors du prétraitement. La vitesse et l'étendue de l'hydrolyse ont été directement corrélées à la surface spécifique initiale des fibres et la taille des particules est inversement liée à la surface extérieure spécifique. Par conséquent, on s'attendrait à ce que la biomasse ayant une taille de particules plus petite s'hydrolyse plus rapidement. De plus, il a été suggéré que l'efficacité de l'hydrolyse de la cellulose est améliorée lorsque les pores du substrat sont suffisamment grands pour contenir des composants enzymatiques grands et petits afin de maintenir l'action synergique du système enzymatique (Fig.2.3) [22].

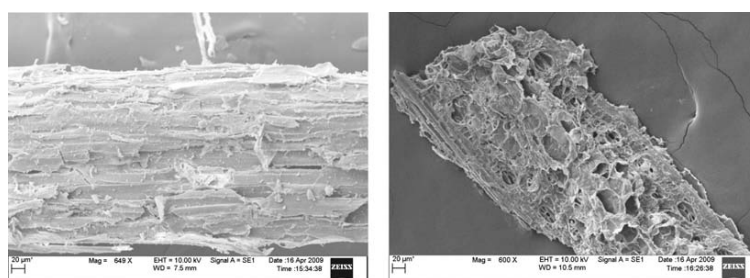


FIGURE 2.3 – Particule de *Panicum virgatum* originale (à gauche), comparée à une particule de même espèce qui a subi un prétraitement hydrothermique (à droite) qui montre une augmentation de la surface et du volume des pores [55]

2.4 Prétraitement des substrats lignocellulosique

Dû à la structure robuste de la biomasse lignocellulosique, le prétraitement est préalable à l'hydrolyse enzymatique. Le prétraitement de la biomasse lignocellulosique est un domaine de recherche actif depuis plusieurs décennies et une grande variété d'approches de prétraitement thermique, mécanique, chimique et biologique (et leurs combinaisons) ont été étudiées et rapportées dans la littérature (Tab. 2.1). Il est important que la procédure de prétraitement sélectionnée inclue un certain nombre d'exigences : [1, 28]

1. Elle devrait améliorer l'accessibilité enzymatique du composé lignocellulosique, en éliminant les hémicelluloses, dilater la structure pour augmenter le volume des pores et la surface interne; et réduire le degré de polymérisation de la cellulose et la dé-cristalliser ;
2. Entraîner une perte minimale de sucres potentiels ;
3. Empêcher la formation de molécules inhibitrices de la dégradation microbienne ou de l'action enzymatique ;
4. Elle devrait être économiquement réalisable, c'est-à-dire que la conversion de la biomasse en sucre simple, soit une technologie rentable ;

5. Nécessite un apport minimal d'énergie et de produits chimiques, et des dépenses minimales en capital et d'exploitation ;
6. Et enfin, il convient à une variété de matières premières de biomasse.

TABLE 2.1 – Liste de méthodes de prétraitement et mécanisme impliqués. [19]

Méthode de prétraitement	Objectif
Acide dilué	Hydrolyse et solubilisation partielles des hémicelluloses,
Explosion à la vapeur (auto-hydrolyse)	redistribution de la lignine sur des surfaces de fibre et
Explosion à la vapeur catalysée par un acide	fractionnement des fibres
Lime	Élimination des lignines.
Solvants organiques	Élimination de lignine et de quelques hémicelluloses.
eau chaude	Élimination de lignine et de quelques hémicelluloses.

Plusieurs schémas de conversion des lignocellulosiques en sucres ont été démontrés à l'échelle du laboratoire et à l'échelle pilote. Le concept général implique une étape de prétraitement qui augmente la digestibilité de la matière première afin de rendre la cellulose plus accessible pendant l'hydrolyse (Fig.2.4). Il en résulte la séparation des composants de la lignine et de l'hémicellulose de la cellulose, ainsi que l'élargissement de la surface interne des fibres, ouvrant ainsi la voie à l'hydrolyse enzymatique. L'explosion de vapeur, le traitement préalable aux bases et aux acides sont quelques-unes des méthodes courantes de traitement préalable [1, 64, 19].

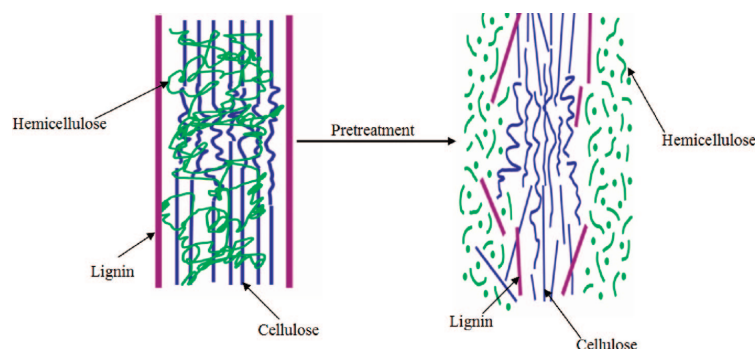


FIGURE 2.4 – Représentation schématique montrant l'effet du prétraitement sur la biomasse lignocellulosique. [55, 28]

2.4.1 Prétraitements physiques

Les prétraitements physiques, tels que le déchiquetage et le broyage sont principalement utilisés pour réduire la taille, augmenter la surface (mécaniquement) de la biomasse. Des méthodes non mécaniques telles que des températures élevées, des cycles de congélation / décongélation et l'irradiation ont été tentées pour modifier une ou plusieurs caractéristiques structurelles de la cellulose et améliorer l'hydrolyse. Cependant, la plupart de ces méthodes ont une efficacité limitée et sont souvent coûteuses [1, 64, 65].

2.4.2 Prétraitements chimiques

Les méthodes de prétraitement chimiques utilisent des acides ou des bases pour fractionner les composants de la biomasse, augmenter la surface et le volume des pores et gonfler la cellulose. Il existe deux types de gonflement de la cellulose : (1) intercrystalline, qui peut être affectée par l'eau, et (2) intracrystalline, qui peut être affectée par l'utilisation d'agents chimiques pour la rupture des liaisons hydrogène. Certaines des méthodes de prétraitement les plus couramment utilisées sont discutées ci-dessous [1, 64, 65].

2.4.2.1 Prétraitement catalysé par un acide dilué

Différents acides, tels que l'acide sulfurique, l'acide nitrique, l'acide chlorhydrique, l'acide phosphorique, ont été utilisés dans le procédé de prétraitement. Le prétraitement à l'acide dilué élimine principalement les fractions hémicellulose des lignocelluloses. La suppression des hémicelluloses augmente la porosité de la biomasse et augmente ainsi l'accessibilité enzymatique aux fractions cellulosiques. L'acide dilué est une méthode de prétraitement efficace qui convient à la plupart des matières premières lignocellulosiques. Deux approches de prétraitement acide dilué sont utilisées, à des températures élevées (> 160 °C) dans un réacteur à flux continu à faible charge en solides. Dans une autre approche, le traitement par lots à basse température est utilisé avec une charge en solides élevée. Dans l'opération par lots, la biomasse est imbibée d'acide dilué pendant environ 4 heures, puis chauffée avec une injection de vapeur dirigée. Lors de l'opération en flux continu, l'acide dilué chaud est pompé à travers un lit de biomasse. L'acide sulfurique dilué (0,5 à 1,5%) au-dessus de 160 °C s'est avéré le plus approprié pour l'application industrielle, et cette méthode fractionne la majorité des hémicelluloses (75 à 90%) [1, 64, 65].

Le principal avantage du prétraitement à l'acide dilué est la rapidité de la réaction, ce qui facilite le traitement en continu. Étant donné que les sucres à cinq carbones se dégradent plus rapidement que les sucres à six carbones, un processus permettant de réduire la dégradation des sucres consiste à utiliser un processus en deux étapes. La première étape est conduite dans des conditions douces pour récupérer les sucres à cinq carbones. Cette étape est suivie par la deuxième étape, réalisée dans des conditions plus difficiles pour récupérer les sucres à six carbones [1, 64, 65].

L'inconvénient majeur de ce procédé est l'élimination des acides ou la neutralisation, qui produit une grande quantité de gypse avant l'étape suivante de l'hydrolyse enzymatique. Bien que des rendements en sucre théoriques puissent être atteints, le procédé nécessite des coûts d'investissement élevés, associés à des problèmes de corrosion, à la consommation d'acide et aux coûts de récupération [1, 64, 65].

2.4.2.2 Prétraitement catalysé par un acide concentré

L'acide sulfurique est un fort agent gonflant et hydrolysant de la cellulose. Dans l'intervalle de concentrations compris entre 62,5 et 70%, il se produit un gonflement intra-

TABLE 2.2 – Rendement en éthanol des tiges de maïs prétraitées par hydrolyse a l'acide sulfurique concentré [13]

Masse de tige de maïs	1000 kg
Teneur en cellulose	430 kg
Conversion de la cellulose et efficacité de récupération	76 %
Rendement stchiométrique à l'éthanol	51 %
Efficacité de la fermentation du glucose	75 %
Rendement en éthanol à partir de glucose	125 kg
Rendement en éthanol à partir de glucose	125 kg
Conversion d'hémicellulose et efficacité de récupération	90 %
Rendement stchiométrique à l'éthanol	51 %
Efficacité de la fermentation au xylose	50 %
Rendement en éthanol à partir de xylose	66 kg
Rendement total en éthanol de 1 000 kg de tiges de maïs	191 kg (242 Litres)

crystallin de la cellulose et, au-dessus de 75%, une dissolution et une décomposition de la cellulose se produisent. La cellulose dissoute est reprécipitée par addition de méthanol ou d'éthanol. Lors du traitement préalable avec de l'acide sulfurique à 75%, le DP de la cellulose passe de 2150 à 300. La cellulose reprécipitée est facilement hydrolysée par un acide ou une enzyme dilué avec une conversion élevée en sucres. L'acide sulfurique peut être réutilisé après la distillation du méthanol ou de l'éthanol [1, 64, 65].

Le prétraitement à l'acide concentré nécessite une température et une pression relativement douces, le temps de réaction étant généralement beaucoup plus long que pour le prétraitement acide dilué. Ce traitement peut être suivi d'une dilution avec de l'eau pour hydrolyser le substrat en sucres. Ce procédé permet une conversion complète et rapide de la cellulose en glucose et des hémicelluloses en sucres à cinq carbones peu dégradés [1, 64, 65].

Le tableau 2.2, montre les rendements en éthanol à partir de tiges de maïs prétraitées par hydrolyse a l'acide sulfurique concentré. Le fonctionnement à basse température et sous pression permet l'utilisation de matériaux relativement peu coûteux et minimise également la dégradation des sucres. Malheureusement, l'acide concentré est un processus relativement lent et les systèmes de récupération d'acide rentables ont été difficiles à mettre au point. L'acide phosphorique concentré a été appliqué auparavant comme solvant de la cellulose. Cependant, il provoque moins de dégradation de la cellulose que d'autres acides. [1, 64].

2.4.2.3 Prétraitement en conditions alcalines

Un certain nombre de méthodes de prétraitement dans des conditions alcalines ont également été testées avec succès. Contrairement aux méthodes catalysées par un acide, le principe général des méthodes de prétraitement alcalin est l'élimination de la lignine

tandis que la cellulose et une grande partie des hémicelluloses restent dans le matériau solide. Le succès de la méthode dépend de la quantité de lignine dans la biomasse. Les principaux réactifs utilisés sont l'hydroxyde de sodium (NaOH), la chaux ; l'ammoniac et l'hydroxyde de calcium [19, 42].

Un prétraitement avec NaOH dilué, provoque une rupture des liaisons lignine et glucidique, un gonflement de la cellulose, l'élimination de la lignine et des hémicelluloses, une augmentation de la surface et une diminution du DP. Le mécanisme est considéré comme une saponification des liaisons ester intermoléculaires réticulant les hémicelluloses et la lignine. Les niveaux optimaux se situent entre 5 et 8 g de NaOH / 100 g de substrat. L'efficacité du prétraitement dépend du type de substrat [13, 65].

Le prétraitement à la chaux avec du carbonate de calcium ou de l'hydroxyde de sodium est généralement utilisé à basses températures (85 - 150 °C) mais à des durées plus longues, de 1 h à plusieurs jours. Ce prétraitement n'a pas été mis en oeuvre à grande échelle. L'explosion des fibres en présence d'ammoniac consiste à traiter la biomasse avec de l'ammoniac liquide à des températures modérées (90 - 100 °C) et à haute pression (17 - 20 bar) pendant 5-10 min. ce prétraitement entraîne une dépolymérisation de la cellulose et une hydrolyse partielle des hémicelluloses. Seule une faible dégradation des sucres se produit et donc de faibles concentrations d'inhibiteurs se forment [19, 42].

2.4.2.4 Les solvants organiques

Le prétraitement utilisant des solvants organiques avec des acides minéraux comme catalyseurs a montré son efficacité dans la délignification de la biomasse. Les solvants organiques rompent les liaisons glucidiques de la lignine de manière sélective et fractionnent la lignine et les hémicelluloses. Des solvants tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'éthylène glycol, ont été utilisés. Des acides minéraux tels que l'acide sulfurique et des acides organiques tels que les acides oxalique, acétylsalicylique et salicylique peuvent être utilisés comme catalyseurs. Les solvants organiques doivent être recyclés pour une utilisation rentable. De plus, il est nécessaire d'éliminer les solvants organiques du système après le prétraitement, car ils risquent d'inhiber la croissance des organismes, de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation [13, 65].

2.4.3 Prétraitements physiques

Le prétraitement physique se réfère aux techniques qui provoquent une déstabilisation structurelle de la biomasse sans assistance chimique ou biologique. Des exemples de ce type de prétraitement sont la fragmentation, l'explosion ou hydrolyse à la vapeur et le lavage à l'eau chaude.

2.4.3.1 Comminution ou réduction de taille

La réduction intensive de la taille, communément appelée comminution, implique divers moyens physiques de réduction de la taille, tels que le broyage par compression. Les coûts énergétiques élevés associés à l'équipement mécanique constituent le principal problème de la méthode de broyage [42].

2.4.3.2 Hydrolyse à la vapeur

Le traitement à la vapeur à haute pression, avec ou sans décompression rapide, est considéré comme l'une des options les plus efficaces pour fractionner le bois en trois composants principaux. Le chauffage de la biomasse en présence d'eau saturée de vapeur (environ 200 °C et 15 bars, pendant typiquement 1 à 10 minutes) entraîne la production d'acide organique en raison de clivage des groupes hémicellulose acétyle. L'acide dégagé hydrolyse une partie des hémicelluloses et modifie la structure de la lignine [13, 3, 65].

Si l'autohydrolyse est suivie d'un relâchement rapide de la pression, l'eau comprimée à l'intérieur de la biomasse se vaporise de manière explosive, ce qui brise la biomasse avec un effet de maïs éclaté et augmente ainsi la surface. Cette approche combine des prétraitements chimiques et physiques en une seule étape, ce qui explique pourquoi l'explosion à la vapeur est une méthode largement utilisée pour le prétraitement de la biomasse. Le processus se déroule généralement entre 190 et 220 °C et une pression de 12 à 41 bars. Les modifications structurelles de la biomasse après le traitement, telles que l'élimination et la redistribution de l'hémicellulose et de la lignine, augmentent le volume des pores. Des éclairs rapides à la pression atmosphérique et un écoulement turbulent fragmentent le matériau, augmentant ainsi la surface accessible [13, 3, 65].

En fonction de la sévérité du prétraitement, une certaine dégradation de la cellulose en glucose se produit. Cependant, elle ne décompose pas toujours toute la lignine, nécessite des particules de petite taille et produit également des composés inhibiteurs pour les étapes ultérieures d'hydrolyse et de fermentation enzymatiques. Parfois, l'ajout de dioxyde de soufre (SO₂) ou de dioxyde de carbone (CO₂) lors du traitement par explosion à la vapeur améliore encore l'hydrolyse enzymatique de la biomasse en rendant l'environnement de prétraitement plus acide (le SO₂ forme de l'acide sulfurique et le CO₂ forme de l'acide carbonique en milieu aqueux). La limite de ces méthodes est le faible rendement en sucres d'hémicellulose. D'autre part, le faible apport d'énergie et les effets environnementaux négligeables sont les principaux avantages de ce processus [13, 3, 65].

D'autre part, l'oxydation par voie humide a été utilisée comme méthode de prétraitement pour un certain nombre de matériaux lignocellulosiques. L'oxydation humide est un prétraitement thermique à 180-200 °C pendant 5-15 min avec l'addition d'un agent oxydant tel que H₂O₂ et souvent le pH initial est augmenté par l'addition d'une base tels que le carbonate de sodium. L'oxydation par voie humide dans des conditions acides ne

s'est pas avérée bénéfique [42, 28].

Le traitement à la vapeur a été utilisée pour récupérer les principaux composants des grignons d'olives, suivie d'un fractionnement pour séparer les principaux composants. Dans la fraction hydrosoluble, les principaux composés étaient les glucides. Le glucose représentait une partie importante de la teneur totale en monosaccharides, en particulier dans des conditions de sévérité légère, suivi de l'arabinose, mais la solubilisation des sucres s'est produite principalement dans la fraction oligomérique [29, 30]. Les polymères constitutifs ont été quantifiés dans la fraction insoluble, et la composition en sucre a montré que la cellulose était associée à une forte proportion de xylanes et d'autres polysaccharides riches en arabinose et galactose. Cette cellulose était presque amorphe, car elle était très sensible aux enzymes hydrolytiques. L'hydrolyse enzymatique de la fraction insoluble à l'aide d'un complexe cellulolytique a également été étudiée, Lorsque les résidus ont été efficacement délignifiés avec un traitement au chlorite, la sensibilité à l'hydrolyse enzymatique a considérablement augmenté [30, 28].

2.5 Prétraitement biologique

La capacité des micro-organismes à dégrader le substrat lignocellulosique est connue depuis des siècles, comme en témoigne la gamme d'espèces fongiques qui peuvent se propager sur les surfaces ligneuses des forêts. Le prétraitement biologique de la biomasse est attrayant car il évite l'utilisation de produits chimiques toxiques, nécessite moins d'énergie et les conceptions des réacteurs sont généralement moins complexes. L'intérêt pour l'application de techniques microbiennes pour la production d'éthanol n'a cependant pas été très populaire jusqu'à récemment en raison de la vitesse lente et de la perte possible de sucres associés à la consommation microbienne [42].

2.5.1 Les bactéries

Différentes espèces de bactéries sont capables de produire des cellulases dans des environnements aérobies et anaérobies. Certaines des souches étudiées comprennent : *Rhodospirillum rubrum*, *Pyrococcus furiosus*, *Saccharophagus degradans*, *Cellulomonas fimi* et *Clostridium spp.* Contrairement aux champignons, anaérobie les bactéries ont la capacité unique de produire un complexe multi-enzymatique appelé cellulosome. Les cellulosomes sont composés de deux sous-unités (la région non catalytique et la région catalytiquement active) et sont censés améliorer l'efficacité de l'hydrolyse en maintenant les composants enzymatiques clés à proximité. Bien que des tentatives aient été faites pour concevoir des cellulosomes, le succès a été limité en raison d'un manque de compréhension des interactions moléculaires [42].

2.5.2 Les champignons

Les organismes les plus courants pour la bio-conversion de la biomasse lignocellulosique sont les espèces fongiques, notamment les champignons de la pourriture blanche. Les champignons de la pourriture blanche présentent un intérêt particulier dans l'industrie de la production d'éthanol en raison de leur capacité à sécréter des enzymes extracellulaires capables de dégrader les structures des plantes. Malheureusement, chaque espèce diffère par la quantité d'enzyme produite, ce qui affecte finalement l'efficacité et l'étendue de l'hydrolyse de la biomasse. Par exemple, les champignons de la famille *Aspergillus* ont une activité β -glucosidase élevée et une activité endoglucanase faible, tandis que les champignons de la famille *Trichoderma* ont une activité endo / exoglucanase élevée mais une activité β -glucosidase faible. La co-culture de deux espèces de champignons a été menée avec un succès relatif, améliorant le rapport cellulase : β -glucosidase avec l'utilisation de *Trichoderma reesei* et *Aspergillus spp*[42].

2.6 Prétraitement hybride (combiné)

Les prétraitements hybrides cherchent à utiliser et à combiner les avantages associés aux différents types d'options de prétraitement de la biomasse. Le plus courant est peut-être l'association de prétraitements physiques avec une assistance chimique ou microbienne. Le broyage à boulets utilise des objets sphériques pour écraser (et broyer) la biomasse en particules plus fines. L'augmentation de surface qui en résulte permet plus d'emplacements pour la dégradation catalytique des sucres par les enzymes. Un autre appelé prétraitement qui combine les conditions humides-oxydantes et alcalines au prétraitement de la biomasse lignocellulosique. Contrairement au prétraitement acide dilué, les conditions alcalines humides oxydantes ne permettent pas la formation d'inhibiteurs microbiens qui limitent la fermentation de l'éthanol. Un autre procédé qui utilise l'ammoniac en combinaison avec une décompression explosive analogue à celle de l'explosion à vapeur. Semblable aux prétraitements physiques, ce procédé utilise des moyens puissants pour créer des ouvertures dans la biomasse pour faciliter la digestion enzymatique. Le concept de base consiste à charger les réacteurs avec la biomasse et l'ammoniac liquide avant d'être chauffés pendant une période de temps spécifiée. L'ammoniac liquide se fraye un chemin entre les sucres structuraux du substrat et, à mesure que la température augmente, la pression commence à s'accumuler dans le réacteur. Après un temps de séjour défini, la pression est soudainement relâchée provoquant la volatilisation instantanée d'une fraction de l'ammoniac liquide. L'explosion soudaine crée des ouvertures physiques au sein de la structure de la biomasse [42].

2.7 Composés inhibiteurs

De nombreux composés présents ou générés lors du prétraitement de la biomasse lignocellulosique en éthanol peuvent nuire au rendement global du produit. Par exemple,

les cellulases naturelles ont souvent un mécanisme d'inhibition du produit qui diminue systématiquement l'efficacité de l'hydrolyse lorsque les concentrations en sucre (comme le glucose) deviennent trop élevées. La saccharification et la fermentation simultanées sont un moyen de contourner cette barrière, qui couple la consommation de sucres par des microbes tels que la levure, avec la génération d'éthanol. Cependant, de nombreux autres types de facteurs gênants doivent être pris en compte avant la mise à l'échelle industrielle de la production d'éthanol cellulosique [42].

Le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) est un composé inhibiteur de fermentation qui est généré par la dégradation de sucres à six carbones, comme le glucose, dans des conditions de prétraitement sévères telles que des températures, des pressions, des temps de rétention et une concentration de produits chimiques élevés. De telles conditions de prétraitement favorisent trois réactions de déshydratation de l'hexose formant le composé phénolique HMF. Le furfural, comme le HMF, est un produit de dégradation formé par la déshydratation des pentoses et dans des conditions sévères de prétraitement, le furfural peut être encore dégradé en acide formique [42].

Les acides faibles sont également considérés comme des inhibiteurs affectant la conversion lignocellulosique en éthanol. Trois acides en particulier (acétique, formique et lévulinique) sont le plus souvent caractérisés dans la fraction liquide sortant du prétraitement de la biomasse. L'acide acétique provient généralement de l'hémicellulose, tandis que les acides formique et lévulinique sont des produits de la dégradation du furfural et du HMF, comme mentionné précédemment. Bien que de petites quantités d'acide faible (moins de 100 mmol / L) augmentent les rendements en éthanol, des concentrations supérieures à 200 mmol / L présentent des effets néfastes sur les microbes [42]. Les composés phénoliques provenant de la dégradation de la lignine peuvent être toxiques pour *S. cerevisiae* à des concentrations proches de 1 g / L. Il a été suggéré que ces composés (à des niveaux élevés) perturbent efficacement les membranes biologiques.

2.8 Détoxification de la biomasse prétraitée

Au cours du prétraitement de la biomasse lignocellulosique et des sucres fermentescibles, une quantité importante de composés qui peuvent sérieusement inhiber le processus de fermentation subséquent. Les substances inhibitrices sont générées à la suite de l'hydrolyse des composants extractifs, des acides organiques et des sucres estérifiés en hémicellulose (acétique, formique, glucuronique, galacturonique) et des dérivés phénoliques solubilisés. De la même manière, les inhibiteurs sont produits à partir des produits de dégradation des sucres solubles (furfural, hydroxyméthylfurfural [FHM]) [28].

L'extrait liquide résultant du prétraitement subit une détoxification. Cet extrait représente essentiellement les hydrolysats d'hémicellulose. La fraction solide contenant de la cellulose et de la lignine est lavée à l'eau afin d'éliminer toutes les substances solubles dont

les inhibiteurs. L'eau de lavage résultante est mélangée aux hydrolysats d'hémicellulose pour obtenir un milieu liquide qui est utilisé pour la fermentation alcoolique. Si ce milieu liquide est utilisé pour produire de l'éthanol, la fermentation des pentoses et hexoses libérés de l'hydrolyse de l'hémicellulose pendant le prétraitement peut être effectuée de manière parallèle à la fermentation du glucose formé lors de l'hydrolyse de la cellulose. Une autre option est l'unification de l'hydrolysat de cellulose et de l'hydrolysat d'hémicellulose pour leur fermentation conjointe. Dans les deux cas, la désintoxication précédente de l'hydrolysat d'hémicellulose est nécessaire, en particulier lorsque des fermentations parallèles sont effectuées. Cela s'explique par le fait que les levures assimilables au pentose sont très sensibles à la présence d'inhibiteurs [28].

Les méthodes utilisées pour la détoxification peuvent être physiques, chimiques ou biologiques. Les méthodes physiques employées pour éliminer les substances toxiques pour la fermentation ultérieure sont basées sur la séparation de ces composés inhibiteurs par des techniques telles que l'évaporation, l'extraction ou l'adsorption. Lors de la détoxification par évaporation, l'hydrolysat d'hémicellulose est évaporé afin de séparer les fractions volatiles des fractions non volatiles. L'acide acétique et les composés phénoliques font partie des composés volatils toxiques qui peuvent être partiellement éliminés par cette technique [28].

L'application de cette procédure est principalement réalisée à l'échelle du laboratoire à l'aide de rotoévaporateurs. La détoxification par les solvants utilise des agents d'extraction comme les solvants organiques. Les substances inhibitrices présentent une plus grande affinité pour ces solvants que pour le milieu aqueux de l'hydrolysat permettant leur migration vers la phase organique. Dans le cas de la détoxification par adsorption, les inhibiteurs sont retenus à la surface d'un matériau solide (adsorbant) diminuant leur concentration dans l'hydrolysat. Cependant, il est possible que des substances utiles comme le glucose soient également adsorbées dans le lit d'adsorbant [57, 58].

Les méthodes chimiques de détoxification sont basées sur l'addition de certains composés chimiques qui font varier les conditions du milieu aqueux provoquant des changements de pH, la formation de précipités ou la transformation directe des composés toxiques. Par neutralisation, la solubilité de nombreuses substances inhibitrices est modifiée. Cela permet leur élimination par une filtration ou une adsorption ultérieure. Cependant, l'ajout d'une base jusqu'à des valeurs de pH très élevées (détoxification alcaline) conduit à la formation d'une quantité importante de précipité composé de sels de calcium (si de la chaux est utilisée), qui entraîne les composés inhibiteurs ou les amène à se déposer. De plus, de nombreux inhibiteurs sont instables à un pH supérieur à 9. Le traitement alcalin est considéré comme l'une des meilleures méthodes de détoxification, car un pourcentage élevé de substances telles que les furaldéhydes et les composés phénoliques peut être éliminé par cette méthode, améliorant la fermentabilité du milieu liquide résultant. en particulier lorsque des hydrolysats de biomasse prétraités avec de l'acide dilué sont employés [54].

L'ajout d'hydroxyde de calcium (saturation excessive) ou d'ammonium a donné de meilleurs résultats que l'utilisation d'hydroxyde de sodium ou de potassium. Certaines méthodes pour déterminer la quantité optimale de chaux à ajouter en fonction de la teneur en acide de l'hydrolysate ont été développées. Les effets positifs du traitement alcalin sur la fermentabilité de l'hydrolysate ne s'expliquent pas uniquement par l'élimination des inhibiteurs. Il a été postulé que cette méthode de détoxification pourrait avoir des effets stimulants sur les micro-organismes producteurs d'éthanol [57, 58].

Différentes méthodes de détoxification combinant des méthodes physiques et chimiques ont été proposées, telles que la neutralisation avec CaO ou Ca(OH)₂ suivie de l'ajout de charbon actif et la filtration pour éliminer l'acide acétique. Pour les matières lignocellulosiques prétraitées par pyrolyse et hydrolysées à l'acide dilué, l'utilisation de plusieurs adsorbants, comme le charbon actif, la bentonite et les zéolites, après le traitement par neutralisation a également été étudiée. La détoxification enzymatique est l'une des nouvelles méthodes testées pour l'élimination des inhibiteurs. Pour cela, la phénoloxydase laccase est utilisée. Cette enzyme oxyde les composés phénoliques dérivés de la lignine [54].

2.9 Hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique

Le prétraitement augmente la surface et le volume des pores de la biomasse, de sorte que la cellulose est plus accessible pour une hydrolyse plus poussée. En fonction du procédé de prétraitement utilisé, la lignine et / ou les hémicelluloses sont éliminées et la cristallinité de la cellulose est perturbée. La cellulose est hydrolysée à l'aide d'une enzyme pour produire les sucres nécessaires à la fermentation. En raison du coût élevé des enzymes, l'accent a été mis sur l'amélioration des cellulases et la réduction des coûts associés à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. L'hydrolyse de la cellulose nécessite la coopération de trois classes d'enzymes cellulolytiques : (1) les cellobiohydrolases, (2) les endo- β -1,4-glucanases et (3) les β -glucosidases [12, 19, 41].

Au cours du procédé, le pH est ajusté et des enzymes sont ajoutées pour initier l'hydrolyse de la cellulose en sucres fermentescibles. L'hydrolyse est généralement effectuée à pH 5 et à 50 °C pendant 24 à 120 heures, suivie de l'addition d'un organisme de fermentation pour commencer la production d'éthanol. Dans de nombreux cas, la fermentation commence bien avant la fin de l'hydrolyse, car il est souvent possible d'augmenter l'étendue et la vitesse de production d'éthanol en combinant les étapes d'hydrolyse et de fermentation [19, 41].

Les problèmes posés par l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose comprennent le coût de l'enzyme, l'inhibition du produit, la perte de l'enzyme due à la liaison à la lignine et la dénaturation ou la dégradation. Pour réduire le coût des enzymes, la charge en en-

zymes doit être minimisée. Une charge enzymatique plus faible, cependant, elle augmente le temps nécessaire à l'hydrolyse complète. En outre, l'utilisation de concentrations élevées en substrat augmente le problème d'inhibition du produit, ce qui entraîne une diminution des performances des enzymes. La lignine, si elle est présente, protège les chaînes de la cellulose et adsorbe les enzymes, ce qui diminue l'efficacité de l'hydrolyse. De plus, l'activité de certaines enzymes peut être perdue à cause de la dégradation ou de la dénaturation. D'autres facteurs sont étroitement liés à la composition du substrat et donc à la méthode de prétraitement utilisée [22]. La production en interne de l'enzyme en utilisant un champignon près du site d'hydrolyse est une option viable. Spécifiquement, on peut utiliser une partie de la biomasse pour faire fonctionner l'unité de production d'enzymes, et une enzyme brute elle-même peut être utilisée dans l'unité d'hydrolyse.

2.9.1 Enzymes cellulolytiques

Une hydrolyse efficace de la cellulose nécessite un certain nombre d'enzymes. Selon le système de classification des enzymes, les enzymes cellulolytiques sont divisées en trois classes ; les exo-1,4- β -d-glucanases ou cellobiohydrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), qui se déplacent de manière progressive le long de la chaîne cellulosique et clivent les unités cellobiose des extrémités ; les endo-1,4- β -d-glucanases (EG) (EC 3.2.1.4), qui hydrolysent les liaisons β -1,4-glucosidiques internes de manière aléatoire dans la chaîne cellulosique ; 1,4- β -d-glucosidases (EC 3.2.1.21), qui hydrolysent le cellobiose en glucose et clivent également les unités de glucose des cellooligosaccharides. Toutes ces enzymes agissent en synergie pour hydrolyser la cellulose en créant de nouveaux sites accessibles les uns pour les autres, en supprimant les obstacles et en soulageant l'inhibition du produit (Fig. 2.5).

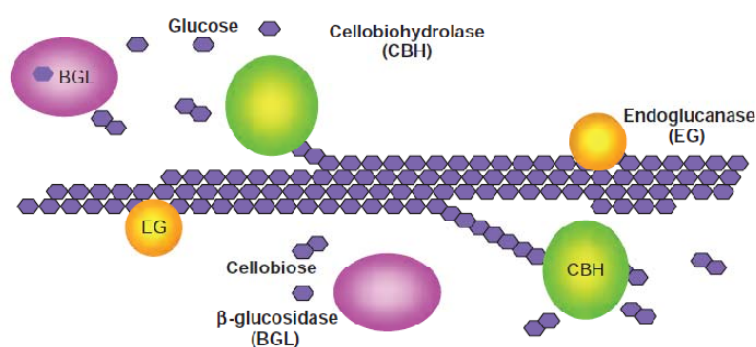


FIGURE 2.5 – Mode d'action des enzymes cellulolytiques [19]

2.9.2 Facteurs affectant l'hydrolyse enzymatique

La concentration et la qualité du substrat, la méthode de prétraitement appliquée, l'activité de la cellulase et les conditions d'hydrolyse telles que la température, le pH et le mélange sont les principaux facteurs de l'hydrolyse enzymatique des matières lignocellulosiques. La température et le pH optimaux sont fonction de la matière première, de

la source d'enzyme et de la durée d'hydrolyse. Les températures et le pH optimaux des différentes cellulases se situent généralement entre 40 et 50 °C et entre 4 et 5. Cependant, le temps de séjour optimal et le pH peuvent s'influencer mutuellement [19, 41].

L'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose est confrontée à un certain nombre d'obstacles qui diminuent la performance enzymatique (Fig. 2.6). La charge enzymatique doit être minimisée afin de réduire les coûts de production et augmente en contre partie le temps nécessaire pour terminer l'hydrolyse. L'utilisation de concentrations élevées de substrat augmente l'effet inhibiteur du produit, ce qui entraîne une baisse des performances des enzymes. La présence de lignine, qui protège les chaînes celluloses et adsorbe les enzymes, est également un obstacle majeur à une hydrolyse efficace. De plus, l'activité de certaines enzymes peut être perdue en raison de la dénaturation ou de la dégradation. D'autres facteurs sont étroitement liés à la composition du substrat et donc à la méthode de prétraitement employée [19, 41].

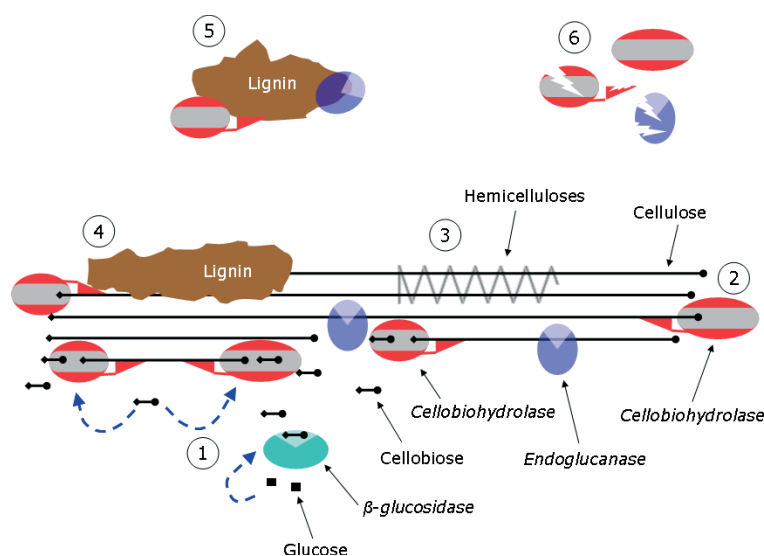


FIGURE 2.6 – Aperçu simpliste des facteurs limitant l'hydrolyse efficace de la cellulose (symbolisé par les lignes droites). 1 : Inhibition des β -glucosidases et cellobiohydrolases par le glucose et le cellobiose, respectivement. 2 : Liaison improductive des cellobiohydrolases sur une chaîne cellulosique. En raison de la processivité des cellobiohydrolases et de leur forte liaison de la chaîne cellulosique dans leur noyau catalytique, des obstacles peuvent faire en sorte que les enzymes s'arrêtent et deviennent liées de manière improductive. 3 et 4 : Les hémicelluloses et la lignine associées ou couvrant les microfils brils empêchent les cellulases d'accéder à la surface de la cellulose. 5 : Les enzymes (cellulases et hémicellulases) peuvent être adsorbées de manière non spécifique sur des particules ou des surfaces de lignine. 6 : Dénaturation ou perte d'activité enzymatique due au cisaillement mécanique, à l'activité protéolytique ou à une faible thermostabilité. [19]

Pour presque toutes les applications, des concentrations élevées de sucre après l'hydrolyse sont préférables pour le processus de fermentation. L'hydrolyse à des concentrations de substrat initiales élevées a été confrontée au problème de l'inhibition du produit,

en particulier du système enzymatique cellulolytique (figure 2.6). Les β -glucosidases des micro-organismes producteurs de cellulase typiques sont dans une certaine mesure inhibées par le glucose (le K_i de la plupart des β -glucosidases est de 1 à 14 mmol de L^{-1} glucose). Il en résulte une accumulation de cellobiose, qui est un puissant inhibiteur des cellobiohydrolases. L'inhibition des cellulases par les sucres dérivés de l'hémicellulose a également été démontrée. L'inhibition compétitive du produit des β -glucosidases peut dans une certaine mesure être surmontée par l'addition d'un excédent d'activité de la β -glucosidase [19].

L'effet inhibiteur du glucose peut être atténué par le procédé de saccharification et de fermentation simultanées (SFS). De cette manière, le glucose est fermenté en éthanol, atténuant ainsi l'inhibition par le glucose. Cependant, les conditions optimales pour les enzymes et les micro-organismes en fermentation ne sont généralement pas les mêmes. Les cellulases ont un optimum autour de 50 °C tandis que les levures et les bactéries ont des optima de croissance autour de 32-37°C, qui correspondent aux conditions sous-optimales pour l'hydrolyse enzymatique. L'inhibition par les produits de fermentation doit également être prise en compte. L'éthanol inhibe les cellulases, bien que moins par rapport au glucose [19].

En outre, l'hydrolyse à des concentrations initiales de substrat supérieures à 10-15 % est techniquement difficile avec une viscosité très élevée; et bien qu'il soit possible d'effectuer la SFS avec des concentrations initiales de substrat allant jusqu'à 40%, il a été montré que les performances enzymatiques diminuaient progressivement à mesure que la concentration de substrat augmentait. Cela a été attribué à l'inhibition des enzymes par les produits finaux et la présence de fortes concentrations de lignine et des limitations de transfert de masse [19, 41].

2.9.3 Stratégie d'hydrolyse et de fermentation

La configuration classique utilisée pour la fermentation des hydrolysats de biomasse implique un processus séquentiel où l'hydrolyse de la cellulose et la fermentation sont effectuées dans différentes unités. Cette configuration est connue sous le nom d'hydrolyse et de fermentation séparées (HFS). Lorsque ce procédé séquentiel est utilisé, la fraction solide du substrat lignocellulosique prétraité subit une hydrolyse (saccharification). Cette fraction contient de la cellulose sous une forme accessible aux acides ou aux enzymes. Une fois l'hydrolyse terminée, l'hydrolysat de cellulose résultant est fermenté et converti en éthanol. *S. cerevisiae* est le micro-organisme le plus utilisé pour la fermentation des hydrolysats de la biomasse lignocellulosique. Cette levure fermente les hexoses contenues dans l'hydrolysat, mais pas les pentoses. L'une des principales caractéristiques de ce procédé est que chaque étape peut être effectuée dans ses conditions de fonctionnement optimales (en particulier la température et le pH). Le schéma général de ce processus est présenté à la figure 2.8 [44, 37, 54].

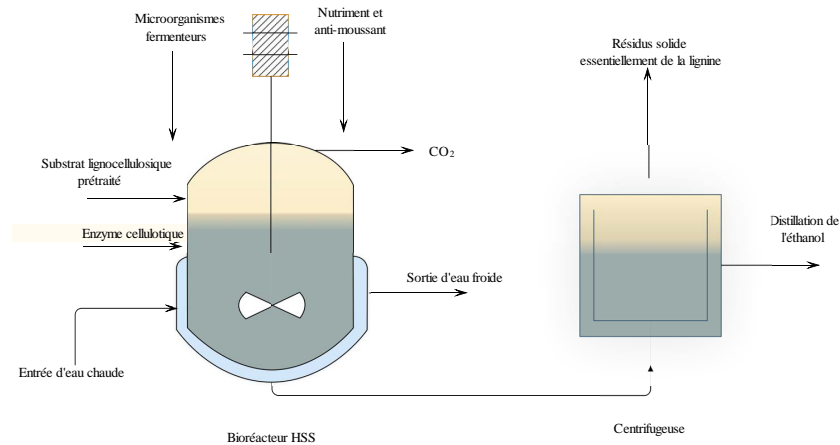


FIGURE 2.7 – Schéma simplifiant le procédé d'Hydrolyse et Saccharification Simultanée (HSS) des Hexoses [37]

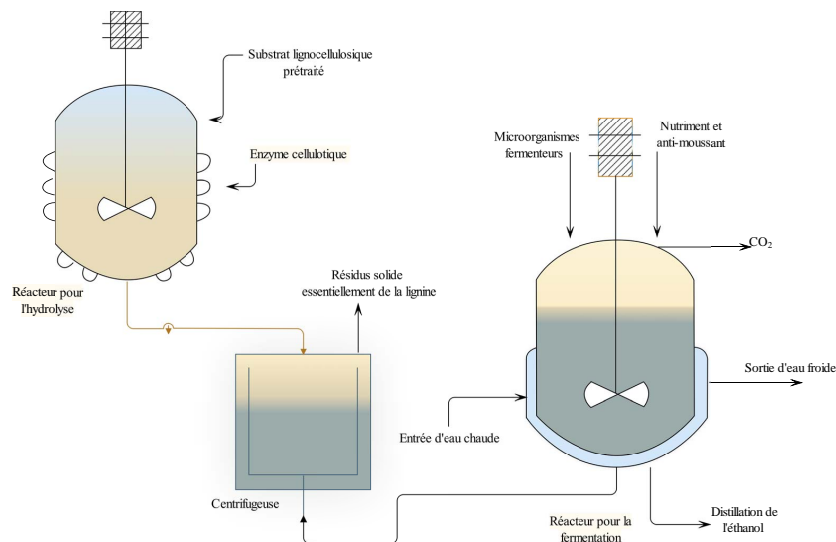


FIGURE 2.8 – Schéma simplifiant le procédé d'Hydrolyse et de Saccharification séparés des Hexoses [37]

La saccharification et la fermentation simultanées (SFS) est une stratégie qui vise à réduire les étapes requises pour produire de l'éthanol à partir de biomasses lignocellulosiques 2.8. Le glucose produit par l'hydrolyse des enzymes est immédiatement consommé par le micro-organisme en fermentation présent dans la culture. Outre la réduction du coût, les effets inhibiteurs de produits tels que le cellobiose et le glucose sur l'activité enzymatique sont minimisés dans ce schéma. Une considération importante dans la SFS, sont les conditions optimales, notamment le pH et la température pour l'hydrolyse enzymatique et la fermentation au plus près. Néanmoins, la différence de températures optimales des enzymes d'hydrolyse et des micro-organismes en fermentation est toujours un inconvénient du SFS [44, 43].

Cependant, le procédé SFS présente certains inconvénients par rapport au procédé

HFS. La température optimale pour l'hydrolyse enzymatique est généralement supérieure à celle de la fermentation avec de la levure. Par conséquent, il faut utiliser certaines conditions de compromis de température et du pH adaptées à l'hydrolyse (saccharification) et à la fermentation. Le recyclage des enzymes et des organismes de fermentation est difficile, ce qui est aggravé par le problème de la séparation de la levure et de la lignine après la fermentation. Par conséquent, on est obligé d'utiliser des charges de levure plus faibles. Le recyclage des enzymes est également difficile dans les processus SFS et HFS car les enzymes se lient au substrat ; Cependant, une désorption partielle peut être obtenue par addition de tensioactifs [44, 43].

Chapitre 3

Fermentation des sucres en éthanol

Introduction

Le présent chapitre a pour objectif dans un premier volet de présenter la molécule d'éthanol, ses propriétés physico-chimiques et les points saillants de ses applications industrielles et ce, depuis sa découverte à son utilisation en tant que carburant. Le second volet se penche sur les procédés de fabrication.

3.1 Présentation de la molécule d'éthanol

L'éthanol désigne une molécule qui est composée de deux atomes de carbone (C), six atomes d'hydrogène (H) et d'un atome d'oxygène (O). Les formules brutes et semi-développées de la molécule d'éthanol sont respectivement le C_2H_6O , le C_2H_5OH et le CH_3-CH_2-OH .

L'éthanol est obtenu à partir d'un processus de fermentation anaérobie des sucres naturels sous l'action des levures, suivi d'une distillation pour la fabrication notamment de boissons alcoolisées tel que le vin ou la bière. C'est à partir du XIX^{ème} siècle que le mot " alcool " a commencé à faire référence uniquement à des composés chimiques ayant des caractéristiques communes, soit des oxydes d'alcanes ayant subi une substitution de l'atome d'hydrogène par un groupement hydroxyle (OH) au niveau d'un atome de carbone.

L'éthanol est un composé incolore, volatil, hygroscopique, miscible à l'eau et à l'alcool. Reconnu pour ses qualités de solvant pour les graisses et les matières plastiques, son odeur est détectable à des concentrations variant entre 10 et 350 ppm. En ce qui concerne ses propriétés chimiques, l'éthanol est un composé qui est chimiquement stable. Il possède toutes les propriétés qui caractérisent les alcools notamment une réaction d'oxydation lorsqu'il est maintenu à l'air libre pour former de l'acide acétique. Par contre, dans des conditions d'oxydation extrême, il se transforme en dioxyde de carbone (CO_2) et en eau (H_2O).

3.2 Origines et applications industrielles de l'éthanol

L'étymologie du mot "alcool" viendrait du mot arabe "al-kuhl" qui désignait à l'origine une poudre très fine de stibine (SbH_3) connue sous l'appellation de sulfure d'antimoine qui est un gaz toxique incolore caractérisé par une odeur identique à celle de l'ammoniac (NH_3). Cette appellation est devenue par la suite un terme générique pour désigner toute substance ou principe volatil. Au Moyen Âge (865 à 925), le philosophe et médecin perse Abu Bakr Muhammad ibn Zakariya al-Razi, réussit à obtenir de l'alcool pur, par distillation du vin pour des fins d'usage médicinal.

Aujourd'hui, les applications industrielles utilisant l'éthanol sont nombreuses. Au-delà du fait qu'il constitue le principe actif de base des boissons alcoolisées, il entre dans la synthèse de produits chimiques tels que les peintures, les vernis, les encres, les matières plastiques, les adhésifs, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques. Réputé pour ses qualités de solvant, il est également utilisé dans l'industrie du nettoyage contre les graisses et les matières plastiques. L'éthanol est également utilisé comme matière première pour la synthèse de solutions d'insecticides. En pharmacologie, il est utilisé pour ses propriétés de désinfectant et d'agent antiseptique.

Depuis les années 70, l'éventail des applications industrielles de l'éthanol s'est étendu à l'industrie des carburants au point de vouloir en faire, dans des pays comme le Brésil, la principale source d'énergie pour les moteurs à combustion. À titre d'information, il est important de souligner que son utilisation en tant que carburant remonte à l'année 1876 lorsque le premier moteur à combustion utilisant de l'éthanol a vu le jour grâce à Nicolaus August Otto. En 1880, Henry Ford équipe ses quadricycles avec des moteurs semblables pour faire de l'éthanol, en 1908, le principal combustible de son modèle "T". C'est ainsi que la première usine de fermentation d'éthanol, à des fins de production de carburant, voit le jour dans l'État du Kansas aux États-Unis. Dans les années 1930, l'éthanol ou encore le gazohol (mélange d'éthanol et d'essence), produit à partir de maïs, est offert dans plus de 2 000 stations réparties dans le Mid West américain. Pour des raisons de coûts de production, les années 40 marquent le retour des carburants, fabriqués à base de pétrole, comme source d'énergie pour les véhicules. La figure 3.1, montre l'évolution de la production mondiale de l'éthanol.

3.3 Défis de la production d'éthanol

En 2001, le maïs utilisé pour l'éthanol ne représentait que 7,5% et 40% en 2011 de la production américaine. En 2012, le maïs pour l'éthanol a chuté pour la première fois au XXIe siècle, en raison de la hausse des prix du maïs et d'une sécheresse qui a réduit les disponibilités de maïs, mais l'utilisation d'éthanol représentait toujours 42% de la récolte de maïs.

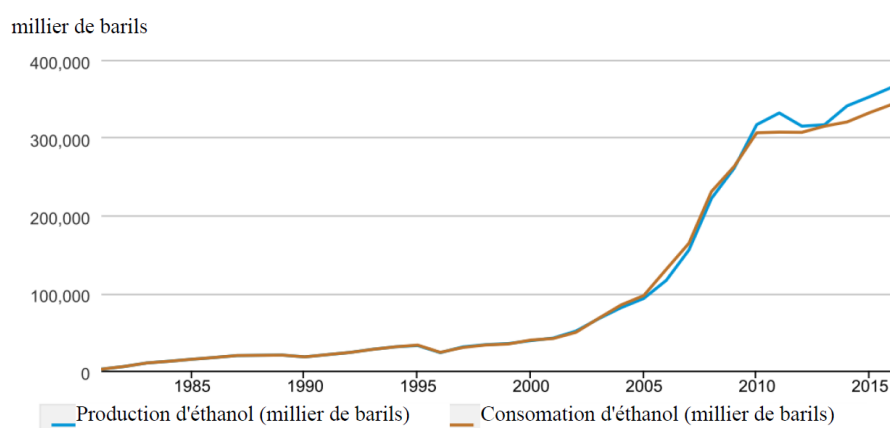


FIGURE 3.1 – Production d'éthanol de 1981 à 2016 (milliers de barils) Agence d'information sur l'énergie (U.S. Energy Information Administration, EIA).

Bien que le maïs soit plus facilement fermenté en éthanol que la biomasse cellulosique, il est également trois fois plus coûteux en énergie que la biomasse par unité de masse. De plus, la quantité théorique d'éthanol produite via un hectare de maïs est bien inférieure à celle issue de la biomasse. Par rapport au grain de maïs, la production d'une culture de biomasse cellulosique vivace, telle que le panic raide, nécessite moins d'énergie, d'engrais, de pesticide et d'herbicide, et s'accompagne d'une érosion moindre et d'une fertilité améliorée du sol.

3.4 La fermentation alcoolique

Au cours de la fermentation alcoolique, les sucres fermentescibles sont convertis en éthanol (alcool éthylique) et en gaz carbonique. La conversion théorique (stoechiométrique) du glucose en éthanol est la suivante (Fig.3.2) :

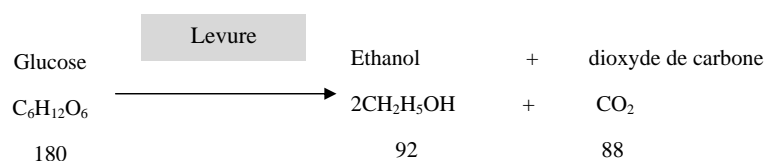


FIGURE 3.2 – Conversion théorique du glucose en éthanol

Le poids moléculaire du glucose et de l'éthanol implique que le rendement théorique en éthanol est de 51% (p / p) de la masse de glucose, ce qui signifie que 1 kg de glucose pourrait théoriquement se convertir en 0,51 kg d'éthanol.

3.5 Levures et autres microbes pour la fermentation

Une grande variété de microorganisme produit de l'éthanol à partir de polysaccharides. Cependant, peu sont réellement compétitifs en termes de rendement en éthanol par

rapport au substrat consommé, de leurs adaptation aux conditions de fermentation, en particulier leurs tolérances aux concentrations élevée en éthanol de mélange réactionnel.

3.5.1 Les bactéries

Les bactéries capables de réaliser la fermentation alcooliques sont peu nombreuses. Les plus utilisées sont *Zymomonas mobilis* et *Candida tropicalis* [61, 44]. En effet, Bai et al., (2008) [44] rapportaient que le rendement en éthanol et la productivité de cette espèce sont supérieurs comparé à *Saccharomyces cerevisiae*, car moins de biomasse est produite et une vitesse métabolique de glucose plus élevé. Cependant, en raison de son spectre de substrat spécifique ainsi que du fait que sa biomasse ne peut être utilisée comme aliment pour animaux, cette espèce ne peut pas remplacer facilement *S. cerevisiae* dans la production d'éthanol.

3.5.2 Les levures

Les micro-organismes les mieux adaptés à la production d'éthanol à partir de sucres fermentescibles sont les levures du genre *Saccharomyces*. D'autres espèces de levures sont aussi utilisées telle que *Pachysolen tannophilus* [61], *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces marxianus* et *Candida*. *Saccharomyces cerevisiae* est le microbe commun le plus utilisé pour la production de l'éthanol. L'activité de la levure est très élevée à haute température et conduit à une production élevée d'éthanol en moins de temps de fermentation.

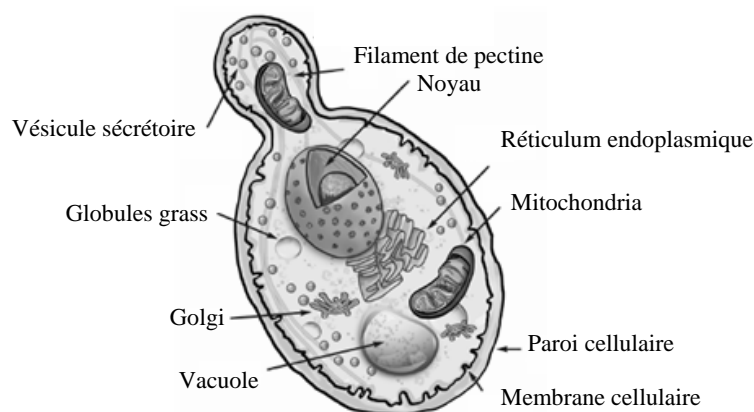


FIGURE 3.3 – Principales caractéristiques d'une cellule typique de *Saccharomyces cerevisiae*. [26]

La levure *S. cerevisiae*, est un micro-organisme unicellulaire qui est généralement de forme ellipsoïde, ovale ou sphérique et son morphologie peut varier selon les conditions d'environnement ou leur état physiologique. La taille d'une levure peut varier entre 1 et 5 μm en largeur et 1 à 9 μm en longueur (Fig.3.3). Lorsqu'elles se trouvent dans des conditions favorables (milieu de culture, température, pH, aération, etc.) elles peuvent se diviser activement par bourgeonnement (Fig.3.4). Toutes les levures sont des champignons unicellulaires présentant des caractéristiques de structure similaires à celles des cellules eucaryotes supérieures. C'est-à-dire qu'elles comprennent une paroi cellulaire, un

noyau, des mitochondries, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des vacuoles, des vésicules de sécrétion ainsi qu'un réseau complexe de membranes extracellulaires et intracellulaires [26].

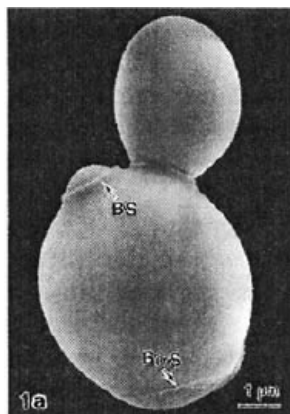


FIGURE 3.4 – Micrographie (x10000), montrant des tissus cicatriciels à la surface des cellules de *S. cerevisiae*, cicatrice de bourgeon et cicatrice de naissance [26]

Les cellules de *S. cerevisiae* possèdent généralement une a_w minimum d'environ 0,65. L'eau est absolument essentielle à la fermentation et un milieu contenant beaucoup de sucre peut imposer un stress osmotique aux cellules et nuire à la physiologie cellulaire. Les cellules de levure peuvent répondre au manque d'eau en surproduisant du glycérol ou d'autres osmolytes tels que le tréhalose, qui protègent les membranes de levure de la dessiccation. De tels composés peuvent efficacement remplacer l'eau cellulaire, restaurer le volume cellulaire et permettre au métabolisme de la levure de se poursuivre. Cependant, la surproduction de glycérol peut réduire le rendement en éthanol [26].

Les levures sont des micro-champignons chimio-organo-trophiques qui obtiennent leur carbone et leur énergie en métabolisant des substrats organiques. Elles peuvent utiliser une variété de substrats. Les sources de carbone les plus courantes sont le glucose, le maltose, le saccharose, le lactose et le fructose [26].

En ce qui concerne les exigences de température et du pH pour les fermentations alcooliques, les levures prospèrent dans des environnements chauds et acides, la plupart des souches de *S. cerevisiae* se développant bien entre 20 et 35 °C et un pH de 3,5 à 6,5. Les souches de levure de brassage de l'espèce *S. pastorianus*, qui sont adaptées à la fermentation à des températures plus froides (8 - 15 °C), font exception à ces caractéristiques. Les levures en fermentation acidifient leur environnement de croissance en combinant la sécrétion de protons, la sécrétion directe d'acides organiques (par exemple, le succinate et l'acétate), et l'élimination du dioxyde de carbone [26].

Pour leur besoins en oxygène, bien que *S. cerevisiae* soit parfois appelée anaérobie facultative, cette levure ne peut en réalité croître dans des conditions strictement anaéro-

bies. En effet, l'oxygène est absolument nécessaire en tant que facteur de croissance pour la biosynthèse des acides gras membranaires (par exemple, l'acide oléique) et des stérols (par exemple, l'ergostérol). *S. cerevisiae* est auxotrophe pour l'acide oléique et l'ergostérol dans des conditions anaérobies. Par conséquent, pour des fermentations alcooliques efficaces, on peut soit apporter de l'oxygène au début de la fermentation, soit ajouter des acides gras et des facteurs de croissance du stérol au milieu [26].

La croissance des levures implique le transport et l'assimilation des nutriments, suivis de leur intégration dans de nombreux composants cellulaires afin que les cellules augmentent leur biomasse et se divisent éventuellement. L'objectif principal d'une cellule de levure est de se reproduire plutôt que de produire de l'alcool. Néanmoins, pendant la fermentation, la production d'alcool et la croissance des levures sont inextricablement liées. L'éthanol est produit lorsque les cellules s'efforcent de maintenir leur équilibre rédox et de produire suffisamment d'ATP pour une croissance continue. En fait, l'éthanol ne peut être produit efficacement sans une croissance significative des cellules de levure [26].

3.6 Fermentation des sucres en éthanol

L'étape de fermentation est centrale dans le procédé global de production d'éthanol, car elle représente la transformation réelle des matières premières conditionnées et prétraitées en produit principal, l'alcool éthylique, à l'aide de bioagents tels que la levure ou d'autres micro-organismes producteurs d'éthanol. La fermentation éthanolique est l'un des processus biologiques les plus étudiés. Néanmoins, la nécessité d'augmenter l'efficacité de la production d'éthanol, y compris l'utilisation de matières premières alternatives, a conduit au développement de nouvelles méthodes de fermentation avec de meilleurs indicateurs techno-économiques et environnementaux. Traditionnellement, le micro-organisme le plus utilisé pour la fermentation éthanolique est la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ceci est valable pour pratiquement tous les principaux types de matières premières utilisées pour la production d'éthanol : les milieux à base de saccharose, les matières amylacées et même les matières lignocellulosiques [28].

3.6.1 Évolution des paramètres liés à la fermentation

Dans un réacteur fermé, le suivi de la fermentation est nécessaire. La température peut être mesurée à l'aide d'un thermomètre situé à l'intérieur du récipient. D'autres mesures sont le plus souvent effectuées sur des échantillons retirés de réacteur.

3.6.1.1 Évolution de la densité

Le progrès de la fermentation peut être mesurer par l'évolution de la densité qui correspond au rapport de la densité du liquide à une température spécifiée (souvent 20 °C) et de la densité de l'eau à la température de sa densité maximale 4 °C. La gravité spécifique est sans dimension [60].

3.6.1.2 Évolution du CO₂

La formation de dioxyde de carbone pendant la fermentation est stoechiométrique avec formation d'éthanol et utilisation de sucre. Par conséquent, l'évolution du dioxyde de carbone peut être utilisé pour surveiller la progression de la fermentation. Des auteurs ont étudié les modèles d'évolution du dioxyde de carbone dans un fermenteur appelé aussi propagateur de laboratoire (1,5 litre). À l'échelle du laboratoire, les auteurs ont démontré des coefficients de corrélation de 0,9944 entre l'évolution de CO₂ et la production d'éthanol et 0,99 entre le l'évolution de CO₂ et l'utilisation des glucides [60]. D'autres auteurs ont également notés une forte corrélation entre la formation de CO₂ et le déclin de la densité. En outre, cette dernière est corrélée avec la formation d'éthanol, l'étendue de la croissance des levures, la baisse du pH [60].

3.6.1.3 Évolution du pH

La fermentation s'accompagne d'une baisse du pH. Ce changement est une conséquence du métabolisme des levures, impliquant l'excrétion de plusieurs acides organiques et l'ex-trusion de protons en réponse à l'assimilation des sucres. Par conséquent, l'évolution du pH peut être utilisée pour surveiller la progression de la fermentation et les changements du pH les plus spectaculaires se produisent au début de la fermentation [60].

3.6.1.4 Évolution de la température

La glycolyse est un processus exothermique, et donc la génération de la chaleur pendant la fermentation peut être utilisé pour suivre l'évolution de la fermentation. Elle est déterminée en mesurant périodiquement l'augmentation de la température. D'autre part, les mesures effectuées tout au long de la fermentation montrent une bonne corrélation avec d'atténuation de la densité, la croissance des levures et la teneur en sucres fermentescible. Cependant, la mesure de la température suppose que le moût est parfaitement mélangé [60].

3.6.1.5 Assimilation de O₂

L'oxygène ajouté au début de la fermentation est utilisé par la levure pour synthétiser des lipides, principalement des stérols et des acides gras insaturés, qui sont essentiels au bon fonctionnement de la membrane et ainsi, *S. cerevisiue* ne peut croître dans des conditions strictement anaérobies que lorsqu'il existe un apport exogène de stérols et d'acides gras insaturés. La quantité de stérol synthétisée par les cellules de levure individuelles est régie par la disponibilité de l'oxygène. La quantité de stérol synthétisée par cellule de levure contrôle l'ampleur de la croissance des levures [60].

3.6.2 Impact de l'éthanol, de la température et du pH sur la croissance de la levure

La levure, pour ne citer que quelques facteurs, est sensible aux changements du pH, de température, d'oxygène, d'éthanol, de CO₂. La levure stressée peut perdre sa capacité à se répliquer, devenant ainsi incapable de se multiplier ou de fermenter. Les conditions de stress sont établies lorsque il y a une augmentation de la température et de la concentration en éthanol, L'effet inhibiteur de l'éthanol sur la croissance des levures est dû au resserrement de la membrane cellulaire. Cependant, des études ont montré que la présence d'un taux plus élevé d'acides gras insaturés augmente la fluidité de la membrane cellulaire pour augmenter la tolérance à l'éthanol [10].

D'autre part, des auteurs suggéreraient que la levure biosynthétise les acides gras insaturés. Cela ne pourrait se produire qu'en présence d'oxygène ; par conséquent, la levure peut capter l'oxygène de l'environnement et produire sélectivement des acides gras insaturés. Cette augmentation d'acides gras insaturés a été observée pour des fortes concentrations d'éthanol [10]. De plus, l'oxygène joue un rôle essentiel dans le bouturage de la levure, améliore la vitalité et accélère la fermentation [12].

Lorsque les conditions de stress augmentaient, le pH de la suspension de levure augmentait en conséquence. Cette augmentation du pH indique une absorption d'ions hydrogène pour assurer un apport membranaire d'absorption des éléments nutritifs essentiels par la cellule de levure afin de permettre une survie continue dans des conditions difficiles. L'augmentation du pH peut donc être utilisée comme indicateur du niveau de stress auquel la levure est exposée. Plus le niveau de stress est élevé, plus le pH augmente. De plus, la conséquence de cette augmentation du pH de la suspension peut être observée dans la viscosité de la suspension. Des travaux avaient montré qu'une augmentation du pH entraînait une augmentation de la viscosité de la suspension [10].

3.7 Bio-réacteur ; critère de conception

3.7.1 Fermentation en batch

Pendant la fermentation discontinue ou en batch, une série de procédures opérationnelles sont répétées périodiquement pour assurer la croissance et le développement des micro-organismes. Ces procédures peuvent inclure le lavage et la désinfection du fermenteur, le remplissage du fermenteur avec le milieu de culture et la stérilisation de ce milieu, l'inoculation des cellules microbiennes, la fermentation et le déchargement du contenu du bioréacteur à la fin du processus de culture. La fermentation éthanolique discontinue la plus simple comprend une étape initiale de propagation des levures dans un bioréacteur aéré où les cellules microbiennes sont multipliées afin d'atteindre la concentration appropriée pour qu'elles soient inoculées dans un fermenteur plus grand. Dans ce fermenteur, les conditions nécessaires à la culture anaérobie des levures sont assurées, favorisant ainsi

la production d'éthanol. Le principal inconvénient de ce procédé réside dans les coûts d'exploitation et de charge nécessaires à chaque lot de fermentation pour assurer la propagation de la levure jusqu'à ce qu'elle atteigne une concentration suffisamment élevée pour permettre les taux de croissance cellulaire et de production d'éthanol appropriés. De plus, les levures ne sont pas réutilisées, ce qui indique qu'il ne faut pas utiliser tout le potentiel de la biomasse cellulaire formée au cours du processus [28].

3.7.2 Fermentation semi-continue

La fermentation semi-continue est l'un des régimes de culture les plus utilisés lorsque les concentrations élevées de substrat inhibent le processus métabolique spécifiques comme ceux liés à la vitesse de croissance cellulaire. Pour cette raison, les micro-organismes se développent plus rapidement à de faibles concentrations de substrat. Ce type de régime de culture avec le recyclage des cellules est la technologie la plus utilisée au Brésil pour la production de bioéthanol en raison de la possibilité d'atteindre des productivités volumétriques plus élevées [28].

3.7.3 Fermentation en continue

La fermentation en continue consiste en la culture de cellules dans un bioréacteur auquel le milieu frais est ajouté en permanence et duquel un flux d'effluent de bouillon de culture est définitivement éliminé, comme le montre la figure 3.5.

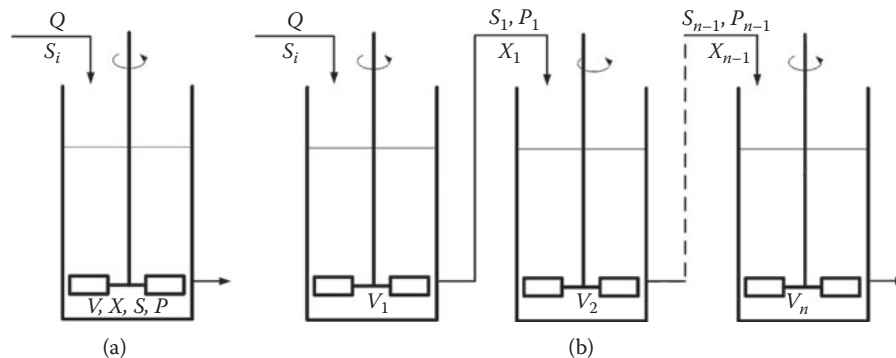


FIGURE 3.5 – Schéma de principe de la fermentation en continue : (a) culture continue en une étape utilisant un CSTR, (b) culture continue en plusieurs étapes utilisant plusieurs CSTR. Q = débit du flux d'alimentation ; S, X, P = concentrations de substrat, de biomasse cellulaire et de produit, respectivement ; V = volume de bouillon de culture dans une cuve de fermentation. Sous-indices : i , flux d'alimentation (influent) ; $1, 2, \dots, n-1, n$, étapes du schéma en cascade [28]

Les micro-organismes sont reproduits dans le bioréacteur à une vitesse de croissance qui compense le retrait des cellules, l'effluent atteignant l'état stationnaire correspondant. Pour garantir l'homogénéité du système et réduire les gradients de concentration dans le bouillon de culture, des réacteurs à cuve agitée en continu (CSTR) sont utilisés. De cette façon, une production constante de moût fermenté peut être obtenue sans qu'il soit nécessaire d'arrêter le fonctionnement du bioréacteur afin d'effectuer les procédures

périodiques typiques des processus par lots, telles que le remplissage et le déchargement. Cela permet une augmentation remarquable de la productivité volumétrique par rapport aux processus discontinus ou semi-continus [28].

Deuxième partie

Matériels & Méthodes Analytiques

Chapitre 4

Matériels et méthodes analytiques

4.1 Matériel végétal

Le matériel végétale utilisé comme biomasse dans la présente étude est le grignon d'olive (pulpe et noyaux d'olives). Il a été collecté auprès d'une huilerie traditionnelle (système discontinu par presse), située dans la localité de Kadiria, Wilaya de Bouira, durant le mois de février de l'année 2019.

4.2 Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés selon la méthode d'analyse standard NREL/TP-510-42620 [68]. Le schéma général de l'analyse compositionnelle des échantillons de grignon d'olive est montré sur la figure 4.1.

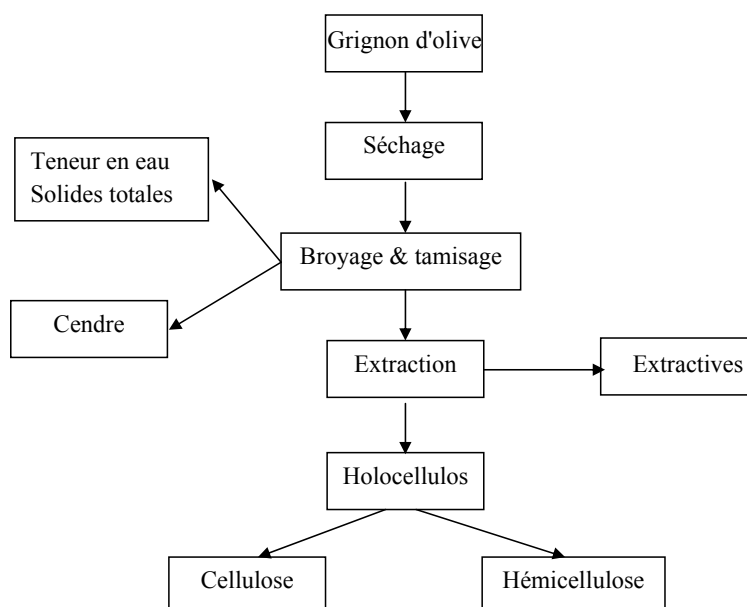


FIGURE 4.1 – Schéma de l'analyse compositionnelle des échantillons de grignon d'olive

4.2.1 Séchage à l'air

Une fois récupérés, les grignon d'olives ont été étalés et séchés naturellement au soleil, pendant quatre semaines. Cette procédure a été conduite afin d'obtenir des échantillons dont la teneur en humidité, inférieure à 10%. Une teneur en humidité plus élevée dans les échantillons de biomasse modifiera la concentration efficace en acide ou en base dans les étapes d'hydrolyse. L'abaissement de la concentration d'acide ou de base peut entraîner un faible biais dans la teneur en glucides en raison de l'hydrolyse incomplète des sucres polymères en sucres monomères [68].

4.2.2 Broyage et réduction de taille

Après ceci, pour augmenter sa surface spécifique et donc sa réactivité au cours de l'hydrolyse, les grignon d'olives ont été broyés à l'aide d'un broyeur de blé, puis par mortier et pilon jusqu'à atteindre une granulométrie plus au moins fine. Afin d'éviter des granulés de tailles inégales et de composition hétérogène, les grignons ont été tamisés à travers un tamis dont l'ouverture de maille est de 1 mm. L'objectif de cette opération est d'obtenir un échantillon avec une granulométrie la plus homogène possible et de déterminer la distribution de la taille des particules. Enfin, le grignon d'olives en poudre a été placé dans un seau bien scellés et stockée à température ambiante jusqu'à son utilisation.

4.2.3 Analyse de la distribution de la taille des particules

L'analyse granulométrique consiste à déterminer la distribution dimensionnelle des grains constituant le grignon dont les dimensions sont comprises entre 0.125 et 1 mm. La distribution de la taille des particules de grignon d'olive est donnée dans la figure 4.2. Le test a révélé que les fractions 0.25 et 0.5 mm sont les plus présentes dans l'échantillon et seulement 9.87 % du poids total des solides correspondaient à des solides de diamètre 1 mm. La fraction de l'échantillon de taille entre 0.25 et 0.5 mm a été utilisée dans les essais d'hydrolyse et de fermentation.

Cette gamme de tailles de particules a été choisie afin d'optimiser la teneur en glucides dans l'échantillon après hydrolyse. En effet, une déviation vers une taille de particules plus petite peut entraîner un faible biais dans la teneur en glucides, en raison d'une dégradation excessive des glucides. En revanche, une déviation vers une plus grande taille de particules peut également entraîner un faible biais dans la teneur en glucides, en raison de l'hydrolyse incomplète des sucres polymères en sucres monomères [68].

4.3 Analyses chimiques

Une masse prédéterminée de l'échantillon a été utilisée pour déterminer la teneur en eau, la teneur en solides totaux et la teneur en cendres. Ensuite, une partie de l'échantillon, a été soumise à une extraction avec un solvant organique afin d'éliminer les substances extractives (matières grasses et protéines) et de déterminer leur teneur conformément aux

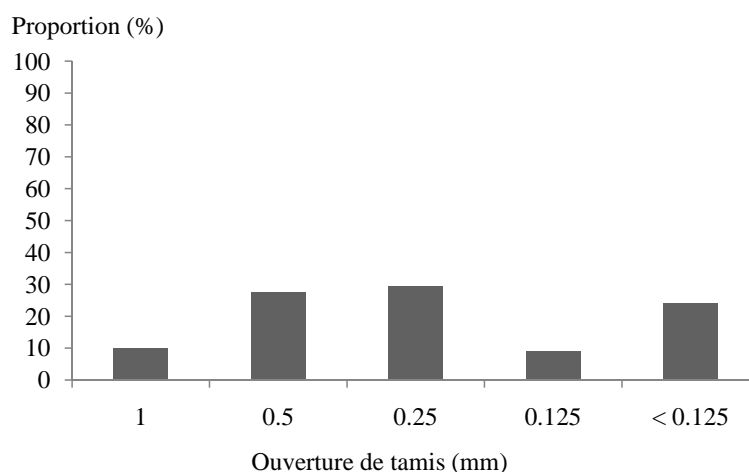


FIGURE 4.2 – Distribution des tailles des particules

méthodes d'analyses standards. Après extraction, les échantillons ont été récupérés et utilisés pour déterminer la teneur en lignine, en cellulose, en hémicelluloses et en sucres réducteurs. Les analyses chimiques des échantillons ont été réalisées, en triples, par les méthodes d'analyses "LAP de NREL" et autres méthodes d'analyses. Les résultats pour les différents paramètres chimiques sont exprimés par rapport à la matière sèche (MS).

4.3.1 Détermination du pH

Le potentiel hydrogène de grignon d'olive en suspension a été déterminé à l'aide d'un pH mètre (HANNA) selon la méthode décrite par AFNOR (1986). Les valeurs du pH ont été déterminées en dispersant une prise d'essai de grignons d'olive dans un volume d'eau distillée. Une fois filtré, la mesure a été réalisée en trois répétitions.

4.3.2 Détermination de la teneur en eau et des solides totaux (NREL/TP-510-42621)

La teneur en eau et en solides totaux a été déterminée par dessiccation de 2 g de grignon d'olive, dans une étuve isotherme à une température de 105 °C, jusqu'à l'obtention d'une masse constante de l'échantillon [74]. La teneur en solide totaux (%) et la teneur en eau (%), a été calculé comme suit (Equ.4.1, Equ.4.2) :

$$Totale\ des\ solides\ (\%) = \frac{Masse_{creuset+Echantillon\ sec} - Masse_{creuset}}{Masse_{Echantillon}} * 100 \quad (4.1)$$

$$Teneur\ en\ eau\ (\%) = 100 - \left[\frac{Masse_{creuset+Echantillon\ sec} - Masse_{creuset}}{Masse_{Echantillon}} * 100 \right] \quad (4.2)$$

4.3.3 Détermination de la teneur en cendres (NREL/TP-510-42622)

La teneur en cendre a été déterminée en utilisant la méthode analytique LAP [67]. Elle est exprimée en pourcentage de résidu restant après incinération d'un échantillon sec 600

°C pendant 24 ± 6 heures. La teneur en cendre est calculé sur la base de l'échantillon séché à l'air ((Equ.4.3))

$$Teneur\ en\ cendre\ (\%) = \frac{Masse_{creuset+cendre} - Masse_{creuset}}{PS} * 100 \quad (4.3)$$

4.3.4 Teneur en matières grasses résiduelle

La teneur en matière grasse résiduelle a été déterminée à l'aide de la méthode de Soxhlet, avec l'hexane comme solvant d'extraction [71]. La teneur en lipides résiduels est calculé ainsi (Equ.4.4) :

$$Teneur\ en\ lipides\ (\%) = \frac{masse\ de\ lipides\ extraits\ (g)}{poids\ de\ l'échantillon\ (g)} * 100 \quad (4.4)$$

Après extraction des matières grasses résiduelles, les échantillon ont été lavés par l'eau distillée, afin d'éliminer le solvant résiduel. ensuite, ils ont été séchés dans une étuve à 70 °C pendant 24 heures.

4.3.5 Teneur en protéine

La teneur en protéine a été déterminée par la méthode de Bradford. Cette méthode utilise le réactif colorant de "bleu de Coomassie brillant" et repose sur l'interaction entre le colorant et les acides aminés des chaînes latérales des protéines à pH acide. Cette interaction provoque le déplacement de l'équilibre du colorant vers la forme anionique, une coloration bleue est obtenue, qui absorbe fortement à 595 nm [7, 81]. Un échantillon est ajouté au réactif, après une courte incubation, la couleur bleue résultante est mesurée à 595 nm par un spectrophotomètre UV-Vis par rapport à l'eau distillée. La concentration en protéine a été déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage (Fig.4.3).

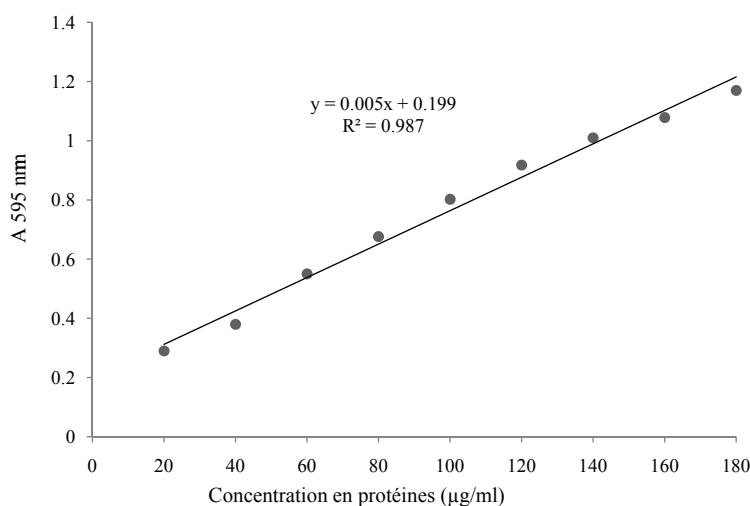


FIGURE 4.3 – Courbe d'étalonnage reliant la concentration en protéine à l'augmentation d'absorbance à 595 nm

4.3.6 Détermination de la teneur en lignine soluble et insoluble (NREL/TP-510-42618)

La lignine constitue une partie importante des échantillons de biomasse. Ce constituant doit être mesuré dans le cadre d'une analyse complète de la biomasse. Les teneurs en lignine soluble et insoluble ont été déterminées selon la méthode LAP [75]. Cette méthode utilise une hydrolyse acide en deux étapes pour fractionner la biomasse en formes plus faciles à quantifier. La lignine se fractionne en matière insoluble dans l'acide et en matière soluble dans l'acide. La lignine insoluble dans l'acide - résidu restant sur un creuset filtrant à porosité moyenne après une hydrolyse en deux étapes, avec correction pour les cendres insolubles dans l'acide et les protéines insolubles dans l'acide, qui doivent être prises en compte lors de l'analyse gravimétrique. La lignine soluble dans l'acide est mesurée par spectroscopie UV-Vis. La teneur en résidus insolubles (en pourcentage) dans l'acide (RIA) et la lignine insoluble dans l'acide (LIA), sont calculées ainsi (Equ.4.5 et Equ.4.6) :

$$RIA (\%) = \frac{Masse_{creuset+RIA} - Masse_{creuset}}{PS_{échantillon}} * 100 \quad (4.5)$$

$$LIA (\%) = \frac{(Masse_{crst+RIA} - Masse_{crst}) - (Masse_{creuset+cendre} - Masse_{crst}) - Masse_{prot}}{PS_{échantillon}} * 100 \quad (4.6)$$

Où : $Masse_{prot}$: est la masse en protéine dans l'échantillon et $Masse_{crst}$ est la masse de creuset.

La teneur en lignine soluble (LSA) est calculée ainsi (Equ.4.7)

$$LSA (\%) = \frac{UV_{abs} * Volume_{filtrat} * Dillution}{\varepsilon * Masse_{échantillon} * Longueur_{du\ trajet}} * 100 \quad (4.7)$$

Où : UV_{abs} : absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde appropriée ;

ε : coefficient d'extinction pondéral ($g^{-1}.L.cm^{-1}$) ;

$Longueur_{du\ trajet}$: longueur de trajet de la cellule UV-Vis en cm

$Masse_{échantillon}$; en mg

La quantité totale de lignine (Equ.4.8) :

$$Lignine (\%) = LIA (\%) + LSA (\%) \quad (4.8)$$

4.3.7 Détermination de la teneur en hémicelluloses et en cellulose

La teneur en hémicelluloses et en cellulose ont été déterminée selon la méthode de Goering and Van Soest (1975) [39] et Van Soest and Wine (1967) [70], à partir du résidu insoluble au détergent neutre (NDF), du résidu insoluble au détergent acide (ADF) et du résidu insoluble au détergent acide et au H_2SO_4 à 72 % (ADL). Le reflux d'un échantillon avec une solution détergente acide élimine les substances solubles dans l'eau et autres que le composant fibreux. La fraction insoluble dans le réactif détergent acide (ADF) est pesé après filtration et séché à 100 °C. Cette fraction est traité avec une solution H_2SO_4 à 72% puis filtrée à travers un papier filtre Wattman pré-pesé, séché et incinéré. La perte de

poids donne le détergent acide lignine (ADL). La teneur en cendre et en hémicelluloses est déminée comme suit :

$$NDF = \text{hémicellulose} + \text{cellulose} + \text{lignine} + \text{cendre} \quad (4.9)$$

$$ADF = \text{Cellulose} + \text{Lignine} + \text{cendre} \quad (4.10)$$

$$\text{Hemicellulose} = NDF - ADF \quad (4.11)$$

$$\text{Cellulose} = ADF - \text{Résidu après extraction avec } H_2SO_4 \text{ 72\%} \quad (4.12)$$

$$\text{Lignine} = \text{Résidu après extraction avec } H_2SO_4 \text{ 72\%} - \text{cendres} \quad (4.13)$$

4.3.8 Détermination de la teneur en sucre réducteur et non-réducteur

La teneur en sucres réducteur et non réducteur a été déterminée par la méthode " the phenol-sulfuric acid assay " [63, 71, 80]. La détermination des sucres avec cette méthode est basée sur l'absorbance à 490 nm d'un composé aromatique coloré formé entre le phénol et le carbohydrate. Cette méthode est précise à $\pm 2\%$. La teneur en sucre (g) a été déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage (Fig.4.4). La concentration en sucre peut être rapportée en mol/g à l'aide de la relation 4.14, et ou en pourcentage, à l'aide de la relation 4.15

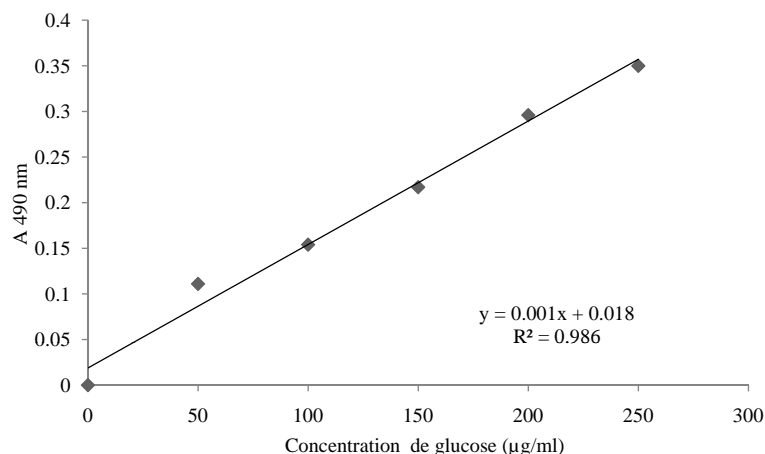


FIGURE 4.4 – Courbe d'étalonnage reliant la concentration en glucose à l'augmentation de l'absorbance à 490 nm.

$$\text{Concentration (mol/g)} = \frac{x(g)}{M(g/mol) * m(g)} \quad (4.14)$$

$$\text{pourcentage de sucre(\% en poids)} = \frac{x(g)}{m(g)} * 100 \quad (4.15)$$

Où; x est la masse en (g) du sucre déduit de la courbe d'étalonnage, M(g/mol) représente la masse du monosaccharide (glucose) dans l'échantillon, et m est la masse (g) de l'échantillon.

4.4 Mesure de l'activité enzymatique

4.4.1 L'enzyme : la Filtrase NLC L

L'enzyme utilisée dans cette étude est une enzyme de brassage, utilisée généralement pour réduire la viscosité et améliorer la filtration du moût de la bière. Elle nous a été offerte gracieusement par la SARL Tango, Zone industrielle Rouiba, Algérie. Elle est produite et commercialisée par DSM Food specialties, France, sous le nom de la Filtrase NLC L. Elle s'agit d'une préparation enzymatique contenant des endo-1,3(4)- β -glucanases (EC 3.2.1.6), cellulases (EC 3.2.1.4) et endo-1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8), dérivée de *Talaromyces emersonii* [15].

4.4.2 Détermination de la teneur en protéine de l'enzyme

La teneur en protéine de l'enzyme a été déterminée par la méthode de Bradford, dont le principe est donné dans la section 4.3.5.

4.4.3 Détermination de l'activité enzymatique de la Filtrase NLC L

4.4.3.1 Détermination de l'activité de la carboxyméthyl-cellulase (CMCase) (endoglucanase)

L'activité totale de la préparation enzymatique peut être mesurée en utilisant des celluloses cristallines telles que la fibre de coton, le papier filtre ou le carboxyméthylcellulose (CMC) comme substrat. L'activité carboxyméthyl-cellulase de la Filtrase a été déterminée selon la méthode rapportée par Ghose (1987) [25] et Wood and Bhat, (1998) [80], avec le CMC comme substrat dans une solution tampon d'acide citrique 0.05 M, pH 4.8 [80]. Plusieurs dilutions ont été faites de l'enzyme de telle sorte qu'une dilution libre, à partir du substrat plus de 0,5 mg de glucose. Les échantillons ont été incubés pendant 60 min à 50 °C. A la fin de l'hydrolyse, un volume de la solution d'acide dinitrosalicylique (DNS) a été ajouté, suivie d'une ébullition pendant 5 min. Après refroidissement, un volume d'eau distillée a été ajouté. L'absorbance est mesurée à 540 nm, et traduite en μg de glucose produits pendant la réaction enzymatique, en utilisant une courbe d'étalonnage. L'activité CMCase a été calculée à l'aide de la relation 4.16. Une unité de CMCase a été définie comme la quantité d'enzyme qui a libéré 1 μmole de glucose par minute.

$$\text{Unités d'activité / ml} = \frac{0.185}{\text{concentration enzymatique requise pour libérer } 0,5 \text{ mg de glucose}} \quad (4.16)$$

4.4.3.2 Détermination de l'activité "papier filtre" (FPase)

L'activité de FPase a été déterminée selon la méthode décrite par Ghose (1987) [25] et Wood and Bhat, (1998) [80]. La méthode est similaire à la méthode de la CMCase, mais le substrat utilisé était une bande de papier filtre Whatman (1x6 cm) trempée dans 1,0 ml d'une solution tampon d'acide citrique 0.05 M, pH 4.8 à 50 °C, pendant 60 min. La

réaction a été arrêtée en ajoutant 1,0 ml de la solution d'acide dinitrosalicylique (DNS). Le mélange a été bouilli pendant 5 minutes puis refroidi et son absorbance a été mesurée à 540 nm. Une unité de FPase a été définie comme la quantité d'enzyme qui a libéré 1 μmol de glucose par minute. L'activité FPase de la la filtrase a été calculée à l'aide de la relation 4.17

$$\text{Unités d'activité / ml} = \frac{0.37}{\text{concentration enzymatique requise pour libérer 2 mg de glucose}} \quad (4.17)$$

4.5 Pré-traitement de l'échantillon

Après extraction des matières grasses résiduelles, le grignon d'olive a été soumis à un pré-traitement chimique; prétraitement à l'acide dilué. Le résidus solide obtenu a été prétraité avec l'acide concentré et avec une base.

4.5.1 Pré-traitement par l'acide dilué

La procédure consiste à traiter un échantillon avec l'acide sulfurique (2%) à 121 °C, à une pression de 1 bar dans un autoclave pendant 15 min, à un rapport 1 :10 (m / v). Après hydrolyse, le résidu solide a été récupéré et soumis une seconde fois à l'hydrolyse acide dans les mêmes conditions. Cette opération a été reconduite quatre fois. L'ensemble de filtrat a été stocké à température de réfrigération pour une utilisation ultérieure. Le résidus solide a été lavé à l'eau distillée ensuite séchées à 70 °C pendant une nuit et stocké à température ambiante pour une utilisation ultérieure.

4.5.2 Pré-traitement par l'acide concentré

Une fraction de résidu solide issu de l'hydrolyse à l'acide dilué, a été placée dans une solution d'acide sulfurique (60%) dans un rapport 1 :10 (m/v), sous agitation magnétique à température ambiante pendant 2 heures. Le filtrat a été récupéré par filtration sous vide et stocké à température de réfrigération pour une utilisation ultérieure.

4.5.3 Pré-traitement par une base

La deuxième fraction de résidu solide issu de l'hydrolyse à l'acide dilué, a été placé dans une solution de soude (6%) dans un rapport 1 :10 (m/v), sous agitation magnétique à température ambiante pendant 2 heures. Le filtrat a été récupéré par filtration sous vide et stocké à température de réfrigération pour une utilisation ultérieure.

4.6 Détoxification

4.6.1 Résidu liquide issu de prétraitement à l'acide dilué

Cette procédure a été réalisée par l'ajout de l'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$ jusqu'à saturation. Après ceci, le filtrat ayant un pH de 4.6, a été récupéré par filtration sous-vide et stocké à température de réfrigération pour une utilisation ultérieure.

4.6.2 Résidus liquides issus de prétraitement à l'acide concentrés et à la base

Dans ce cas, la Détoxification a été réalisée en combinant les deux résidus, puis l'ajoute d'une base (NaOH) jusqu'à neutralisation. Après filtration, les filtrats obtenus ont été stockés à température de réfrigération pour une utilisation ultérieure.

4.7 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

La méthode d'analyse par FTIR est largement utilisé pour étudier la cellulose, l'hémicellulose et la lignine [40, 14, 8]. En plus de la détermination de la composition, la FTIR a été utilisée pour étudier la structure cristalline de la biomasse mais aussi pour évaluer l'efficacité d'un prétraitement et pour prédire la digestibilité de la biomasse ainsi que le rendement en sucre après hydrolyse enzymatique [11]. Le tableau 4.1, montre les bandes d'absorbance FTIR de la cellulose, l'hémicellulose et la lignine [83, 18, 27].

Les spectres FTIR ont été obtenus à l'aide un spectromètre infrarouge à transformée Fourier, FT/IR-4200, JASCO. Cette analyse vise à visualiser les bandes caractéristiques des hémicelluloses, des celluloses et des lignine de grignon d'olive avant et après traitement à l'acide et à la base.

4.8 Hydrolyse enzymatique

Ce protocole décrit l'hydrolyse enzymatique de grignon d'olive pré-traité en utilisant la Filtrase NLC L, à fin de déterminer l'étendue de la digestibilité et l'efficacité de l'enzyme. La procédure expérimentale est basée sur la méthode d'analyse de NREL (LAP-009) intitulé "Saccharification enzymatique de la biomasse lignocellulosique" [52] avec quelques modifications. L'hydrolyse enzymatique a été réalisée à différente concentration en substrat (5, 40 et 80%). Les différentes concentrations ont été préparées par addition d'un volume respectif d'eau distillée pour obtenir ces concentrations. L'hydrolyse a été réalisée dans une solution tampon d'acide citrique, pH 4.8 et à température 45 °C sous agitation magnétique à 150 rpm. Au cours de l'hydrolyse, des échantillons d'hydrolysats ont été recueillis et les sucres ont été analysés.

TABLE 4.1 – Bandes d'absorbance FTIR dans la biomasse [27, 14, 2]

Numéro d'onde (cm ⁻¹)	Affectation / groupe fonctionnel	Polymère
875	Liaison glycosidique	Hémicellulose
930	Liaison glycosidique	Cellulose, hémicellulose
990	C-O vibration de valence	Cellulose
1035	C-O, C=C, and C-C-O élongation	Cellulose, hémicellulose, lignine
1160	C-O-C étirement asymétrique	Cellulose, hémicellulose
1200	O-H fléchissement	cellulose, hémicellulose
1215	C-C + C-O étendue	Lignine
1270	Vibration de l'anneau aromatique	lignine
1280	C-H fléchissement	cellulose
1310	CH ₂ remuer	Cellulose, hémicellulose
1327	C-O du cycle syringyle	Lignine
1335	Vibration C-H, flexion dans le plan O-H	Cellulose, hémicellulose, lignine
1380	C-H fléchissement	Cellulose, hémicellulose, lignine
1425	C-H déformation	Lignine
1440	O-H fléchissement	Cellulose, hémicellulose, lignine
1465	C-H déformation	Lignine
1500	Vibration de l'anneau aromatique	Lignine
1595	Anneau aromatique vibration + C-O étirement	Lignine
1682	C-O étirement	Lignine
1730	Cétone / aldéhyde C-O étirement	Hémicellulose
1750	Ester libre	Hémicellulose
2840, 2937	C-H étirement	Lignine
3421	O-H étirement	Lignine

4.9 Saccharification et fermentation simultanées (SFS)

Dans cette expérience, la cellulose de l'échantillon a été hydrolysée en sucres simples, principalement le glucose par l'action de la filtrase, et la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) a été utilisée pour le fermenter en éthanol. La procédure adoptée est basée sur la méthode de Dowe et McMillan (2001) (National Renewable Energy Laboratory (NREL) [50])

4.9.1 Préparation de l'inoculum

Une fermentation aérobie du glucose a été utilisée pour produire une masse cellulaire de levure viable avant de commencer la SFS. Les levures ont été pré-cultivées pendant 72 h à 30 °C sous agitation à 150 rpm. La préculture a été réalisée dans un flacon de 500 mL contenant 250 mL de milieu constitué d'extrait de levure de peptone et de glucose à 10%, de (NH₄)₂SO₄ (3 g L⁻¹), MgSO₄·7 H₂O (2 g L⁻¹), KH₂PO₄ (2 g L⁻¹). Lorsque le niveau de glucose est tombé en dessous de 2 g L⁻¹, les cellules ont été récoltées par décantation. Le surnageant a été décanté et les cellules ont été utilisées comme semences pour l'expérience SFS.

4.9.2 Saccharification et fermentation simultanées (SFS) : le fermenteur

Les expériences de fermentation ont été effectuées dans une enceinte en verre à double parois de 1 litre. L'enceinte reposait sur une plaque d'agitation. La configuration expérimentale de réacteur est illustrée à la figure 4.5. Des sondes de température et du pH ont été insérées pour fournir des mesures en temps réel. La température a été contrôlée par recirculation de l'eau à 30 °C à travers la double parois de l'enceinte. Le pH est contrôlé à l'aide d'une sonde d'un pH mètre. Le pH a été fixé à 4,8 et laissé évoluer au fur et à mesure de la fermentation sans le contrôler. Une agitation de 100 rpm a été fournie à l'aide d'une plaque d'agitation pour toutes les expériences. Les échantillons ont été prélevés à des moments prédéterminés à l'aide de seringues stériles.

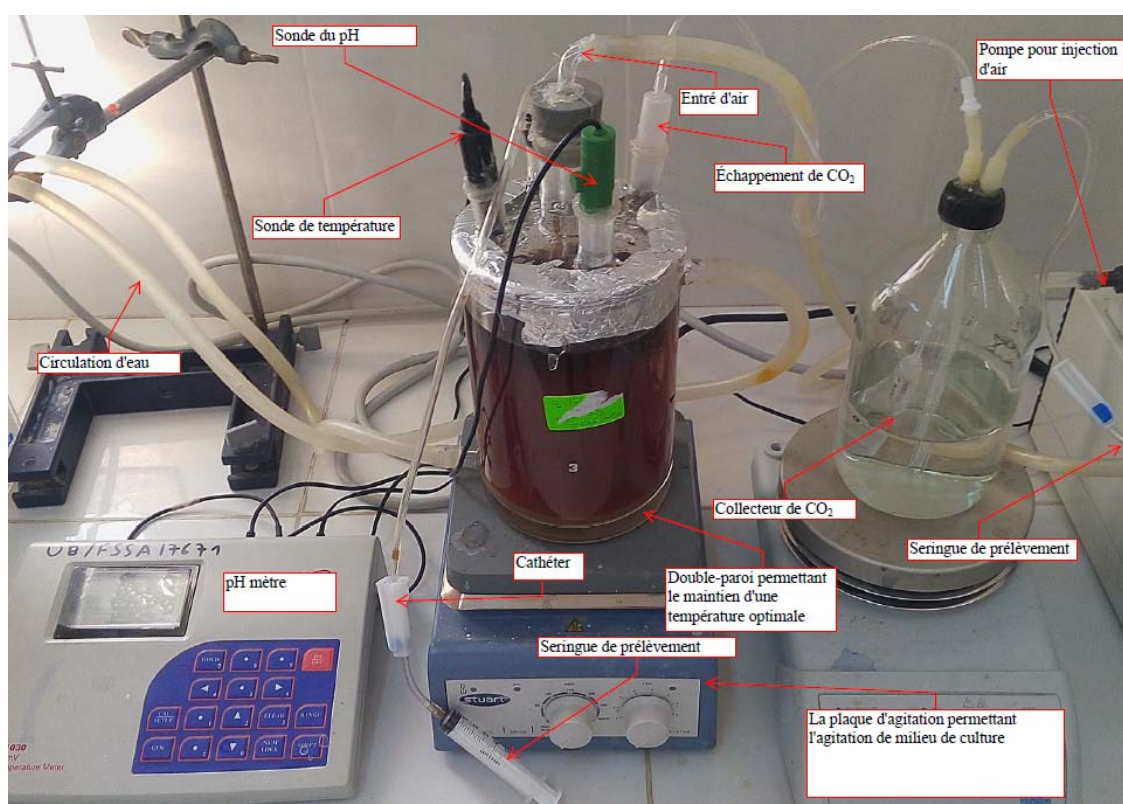


FIGURE 4.5 – Configuration expérimentale de fermenteur

4.9.3 Saccharification et fermentation simultanées (SFS) : le protocole

L'enceinte a été rincée à l'eau distillée, puis stérilisé thermiquement pour empêcher la croissance des organismes pendant la saccharification. 600 ml d'échantillon issus de prétraitement de grignon d'olive (hydrolysats) ont été transférés dans le réacteur et stérilisé à 90 °C pendant 30 minutes. Après refroidissement l'inoculum a été ajouté au milieu. La fermentation se déroule ensuite sans addition supplémentaire de milieu. Le pH du milieu a été ajusté à 4.8 à l'aide de la solution d'acide citrique. La température du SSF a été réglée à 30 °C. Bien que *S. cerevisiae* puisse se développer dans des conditions anaérobies,

il nécessite une petite quantité d'oxygène pour la synthèse des acides gras et des stérols. Cet oxygène est fourni en injectant de l'air dans le réacteur au début de la fermentation à l'aide d'une pompe. Une seringue stérile a été utilisée pour distribuer l'enzymes dans le réacteur. Le CO₂ résultant de l'assimilation de glucose a été recueilli dans un flacon de 500 ml remplis à moitié avec de l'eau distillée. Le pH de cette dernière a été suivie au cours de la fermentation.

4.9.4 Suivre de la fermentation

Le suivi de la fermentation a été réalisé, en prélevant périodiquement des échantillons pour analyser les sucres réducteurs, vérifier la viabilité des cellules et mesurer la densité. La progression de la fermentation a été surveillée en parallèle en mesurant la formation de CO₂ et l'évolution de la température.

4.9.4.1 Détermination de la viabilité des cellules

La mesure de la viabilité (le pourcentage de cellules vivantes au sein d'une population) des levures est un paramètre clé pour le suivi de la qualité de la fermentations. Le test le plus largement utilisé pour mesurer la viabilité consiste à colorer les cellules avec du bleu de méthylène et à les visualiser au microscope [78, 72].

La solution de bleu de méthylène préparée, consistait en 0,01% de bleu de méthylène et 2% de citrate de sodium dihydraté dans de l'eau distillée. Des suspensions de levure (1 ml) diluées et des volumes égaux de bleu de méthylène ont été mélangés ensuite et incubées pendant 15 min à température ambiante, puis placées sur une lame de verre sous une lamelle. L'analyse a été effectuée par microscopie optique à l'aide d'un microscope OPTICA Axiom 2000 (100 objectifs). Les cellules bleues moyennes à foncées, ont été enregistrées comme mortes, tandis que les cellules bleu pâle et non colorées étaient comptées comme vivantes (Fig.4.6).

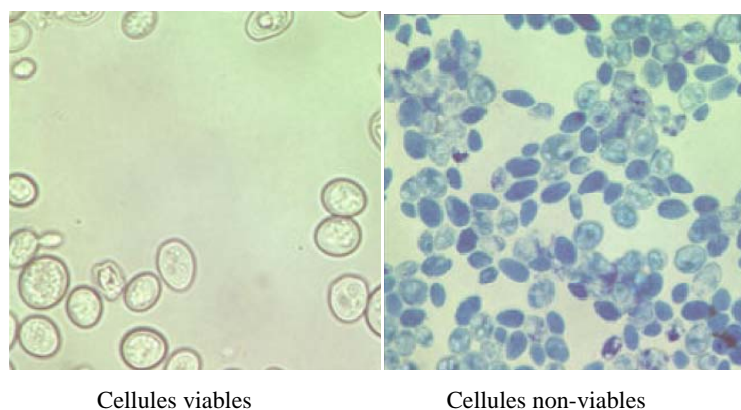


FIGURE 4.6 – Test de viabilité cellulaire utilisant la coloration au bleu de méthylène [72]

La viabilité a été réalisée en triple. Les comptes de viabilité moyenne ont été représentés selon les méthodes décrites précédemment. Les équations 4.18, 4.19 et 4.20, ont été utilisées

pour calculer le nombre de cellules viables, le nombre total de cellules et le pourcentage de viabilité des cellules, respectivement.

$$\text{Nombre de cellules viables} = \text{NB. de cellules} * \text{facteur de dilution} \quad (4.18)$$

$$\text{Total des cellules (ml}^{-1}\text{)} = \text{Nombre moyen. de cellules} * \text{Dilution} * \text{volume d'origine} \quad (4.19)$$

$$\text{Pourcentage de viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules viables}}{\text{Nombre total de cellules}} * 100 \quad (4.20)$$

4.9.4.2 Mesure de la densité

La densité de fluides de saccharification et de fermentation a été mesurée en utilisant environ 2 ml d'échantillon, à l'aide d'un densimètre électronique KEM KYOTO ELECTRONICS DA-130N. L'étalonnage a été effectué avec de l'air et de l'eau distillée préalablement à chaque mesure.

4.9.5 Évaluation de rendement en éthanol

A la fin de la fermentation, un dispositif de distillation a été utilisé pour distiller le contenu de fermenteur. La distillation a été réalisée à 78 °C pour recueillir le distillat. La teneur en éthanol a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode décrite par Caputi et al. (1968) [9] et Seo et al., (2009) [35]. Les concentrations d'éthanol ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, en mesurant l'absorbance à 584 nm d'une solution de dichromate de potassium. Une courbe d'étalonnage a été utilisée pour déterminer la concentration d'éthanol (Fig. 4.7).

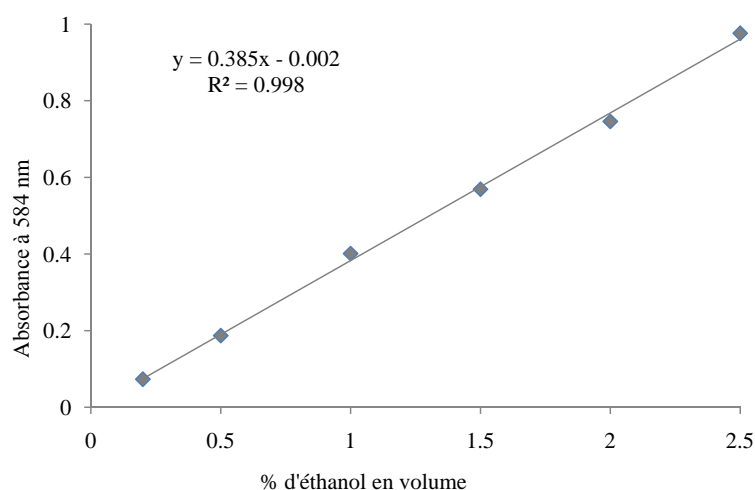


FIGURE 4.7 – Courbe d'étalonnage reliant l'absorbance des solutions de dichromate de potassium à 584 nm en fonction de la concentration éthanol ayant réagi.

Le rendement en éthanol est exprimé par l'équation 4.21 pour démontrer l'efficacité du

SFS.

$$\text{Rendement en éthanol (\%)} = \frac{\text{Ethanol produit (g)}}{\text{Ethanol théorique (g)}} * 100 \quad (4.21)$$

La quantité d'éthanol théorique produit (g) a été obtenue à partir du poids moléculaire du glucose (180,2 g / mol) et d'éthanol (46,1 g / mol), ce qui a été expliqué dans la section 3.4. Ainsi, l'éthanol théorique produit est de 51,2% (p / p)) de glucose.

Troisième partie

Résultats & Discussion

Chapitre 5

Résultats et discussion

5.1 Composition chimique du grignon d'olive

La composition chimique moyenne du grignon d'olive (exprimée en % de la masse sèche) est détaillée dans le tableau 5.1. Toutes les analyses ont été effectuées en triplication.

TABLE 5.1 – Composition chimique de grignon d'olive exprimée en pourcentage de poids sec

Composant	(en % de poids sec)
pH	5.55 ± 0.084
Teneur en eau	6.27 ± 0.34
Total des solides	93.7 ± 0.34
Cendre	3.73 ± 0.082
Matière grasse	14.19 ± 0.67
Teneur en protéine	3.19 ± 0.04
Fibre de détergent neutre (NDF)	72.42 ± 0.01
Fibre de détergent acide (ADF)	57.81 ± 0.02
Cellulose	29.84 ± 0.03
Hémicelluloses	14.61 ± 1.83
Lignine	
• Résidus insolubles dans l'acide (RIA)	21.20 ± 0.06
• Lignine insoluble dans l'acide (LIA)	21.14 ± 0.03
• Lignine soluble dans l'acide (LSA)	3.02 ± 0.48
Sucres réducteur (Comme glucose)	2.72 ± 0.03
<i>Lignine = LIA + LSA</i>	

L'échantillon de grignon d'olive a une faible teneur en eau qui est inférieur à 10 %. Cette valeur a été déterminée sur un échantillon préalablement séché au soleil. La valeur obtenue implique que l'échantillon peut être stocké à température ambiante sans qu'il soit sujet pour la prolifération des moisissure, ce qui facilite son stockage, avec un minimum d'énergie nécessaire à cet opération. La teneur en cendres est de 3.73 %. Cette valeur est proche des autres valeurs rapportée par Miranda et al., (2019)[21] et Fernandes et al. (2016)[16]. La valeur de la teneur en matière grasse qui correspond aux huiles résiduelle est particulièrement élevée. Ceci est du au fait que le grignon d'olive utilisé dans cette

étude est obtenu de procédé d'extraction de l'huile par presse (traditionnel), caractérisé par des pertes élevée en huile par rapport aux nouveaux procédés. Cependant, dans l'optique de valorisation, cette matière grasse peut être utilisée, à titre d'exemple pour la production de biodiesel . La teneur en protéine est faible, qui est proche à celle rapportée par Fernández-Bolaños et al., (1999) [2], ce qui implique que le grignon d'olive a un faible potentiel d'être utilisé dans l'alimentation des animaux.

Les composants structuraux du grignon d'olive (tableau 5.1) comprennent 24,16% de lignine, 14.61% de d'hémicelluloses et 29.84% de cellulose, avec une teneur relativement faible en sucres réducteur (2.72%). L'échantillon est ainsi de nature lignocellulosique typique et globalement, les valeurs obtenues corroborent les valeurs publiées pour la composition chimique du grignon d'olive [2, 4, 16], avec une légère différence. Ces différences peuvent s'expliquer par la variabilité biologique des olives qui est en fonction de la localisation géographique et les conditions climatiques et pédologiques ainsi que par les différences dans le procédé d'extraction de l'huile d'olive.

5.2 Analyse des bandes spectrales FTIR

La figure 5.1 montre les spectres infrarouges de grignon d'olive brute (—), grignon d'olive traité à l'acide (—) et grignon d'olive traité à la soude (—). Les bandes caractéristiques de la cellulose, hémicellulose et lignine sont donnés dans la section 4.7. Les trois spectres sont presque similaires en ce qui concerne la présence et l'ampleur des régions spectrales. Les différences sont les suivantes : un pic à 873 cm^{-1} n'était présent que dans le grignon traité à la soude et représente la région de liaison glycosidique ; deux pics à 2346 cm^{-1} et à 2825 cm^{-1} était présent dans le grignon d'olive brut. Des pics couvrant la région de $1030\text{ à }1720\text{ cm}^{-1}$ était présent dans les trois grignon d'olive, à l'exception du pics à 1470 cm^{-1} . Des pics dans la région 2800 cm^{-1} à 2900 cm^{-1} se chevauchent, qui corresponde à celles de la lignine. La bande caractéristique pour la cellulose est attendue à 3270 cm^{-1} pour la cellulose, selon la littérature. Deux bandes se trouvent à des fréquences légèrement plus élevée dans les spectres, à 3367 cm^{-1} et à 3396 cm^{-1} comme le montre la figure 5.1, qui présente la région de vibration et d'étirement OH. Pratiquement tous les pics peuvent être attribués à des liaisons et / ou groupes fonctionnels trouvés dans les polymères lignocellulosiques (tableau 4.1).

5.3 Résultats de l'activité CMCCase et FPase

Comme il a été mentionné dans la section 4.4 pour déterminer l'activité CMCCase et FPase, le carboxyméthylcellulose et le papier filtre Whatman ont été utilisés comme substrats. Les résultats ont montrés que la Filtrase NLC L est capables de décomposer la carboxyméthylcellulose et le papier filtre Whatman. L'hydrolyse enzymatique a produit des sucres à extrémités réductrices qui ont réagi avec l'acide dinitrosalicylique montrant une absorbance à 540 nm . La teneur en protéine de la préparation enzymatique est de 83

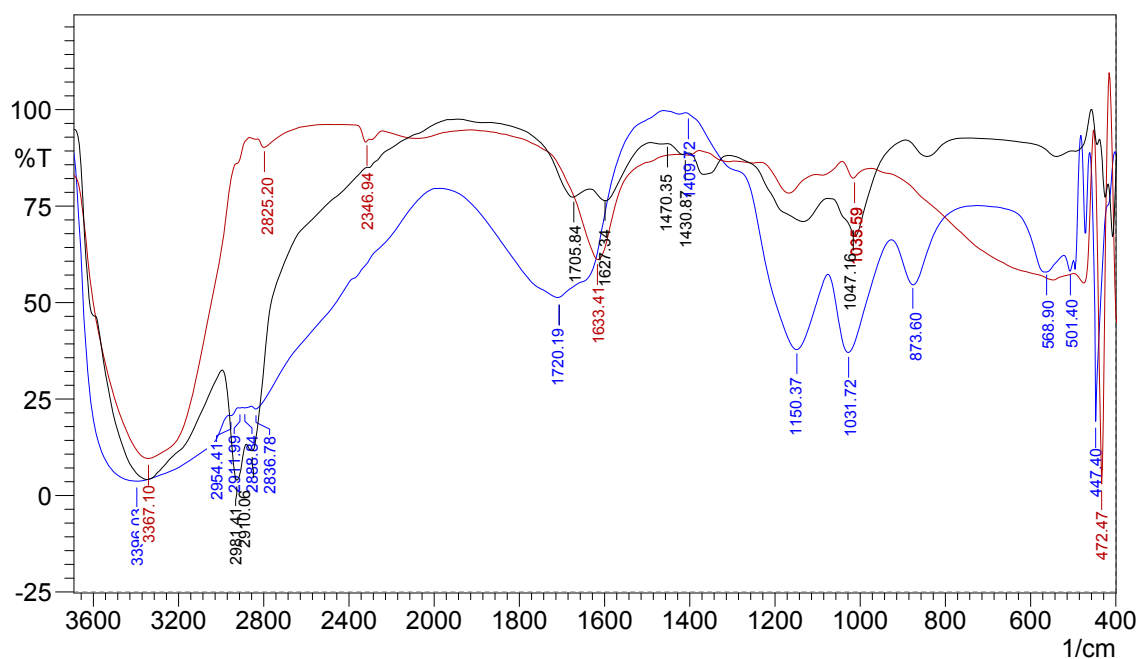


FIGURE 5.1 – Spectres infrarouges de grignon d'olive brut (rouge), traité à l'acide (noir) et traité à la soude (bleu)

g.l^{-1} , avec une activité enzymatique de 0,25 U/mg de protéine pour la CMCCase et 0,17 U/mg de protéine pour la FPase.

5.4 Hydrolyse enzymatique

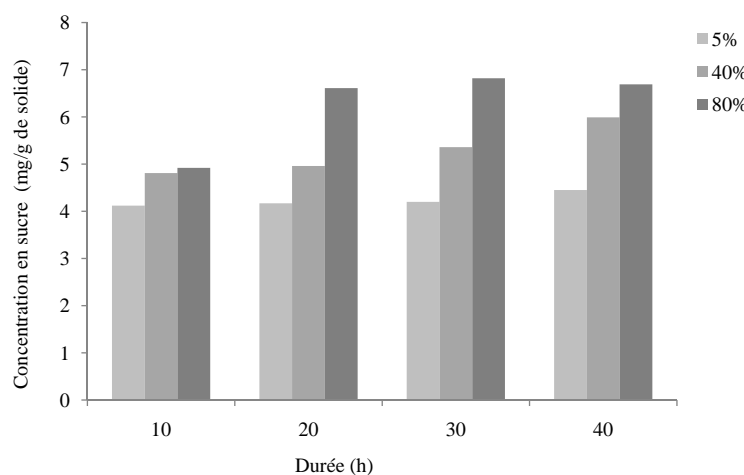


FIGURE 5.2 – Hydrolyse enzymatique de résidus solide prétraité à l'acide dilué

La possibilité d'appliquer l'hydrolyse enzymatique pour la libération des sucres contenus dans les grignons d'olive prétraités a été évaluée. Les résidus solide prétraités à l'acide dilué, à l'acide concentré et à la base, puis lavés et séchés, ont été hydrolysés par voie

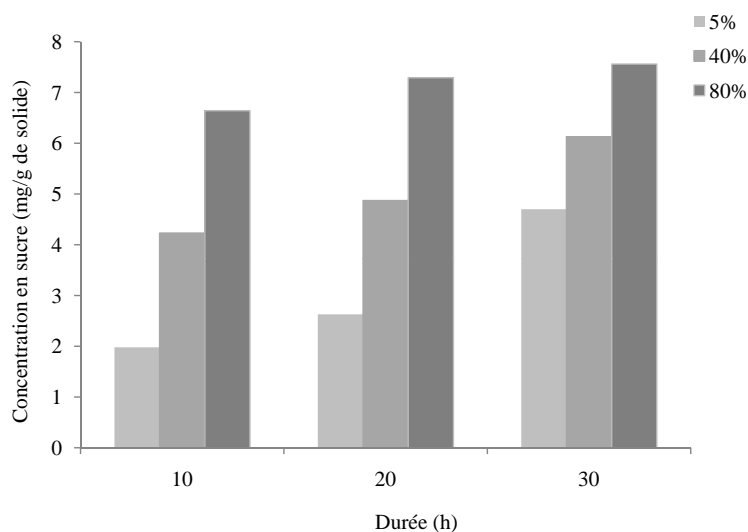


FIGURE 5.3 – Hydrolyse enzymatique de résidus solide prétraité à la base

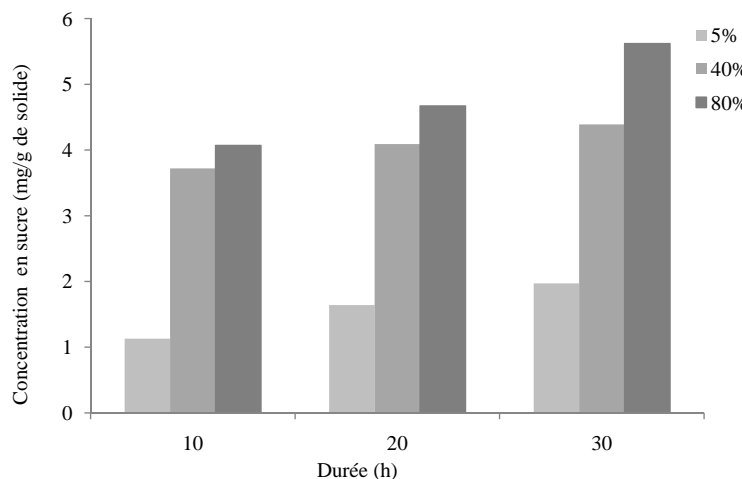


FIGURE 5.4 – Hydrolyse enzymatique de résidus solide prétraité à l'acide concentré

enzymatique. Les expériences ont été effectuées dans des Erlenmeyers de 100 ml, avec différentes masses des résidus en suspension dans 100 ml d'une solution tampon d'acide citrique 0,05 M (pH 4,8). Les expériences ont été réalisées à 45 °C pendant 30 h sur un agitateur magnétique à 150 rpm.

Comme le montre les figures 5.2, 5.3 et 5.4, après 30 heures d'hydrolyse, la concentration en sucre la plus élevée, a été obtenue à la concentration en substrat la plus élevée (80%). Une meilleure efficacité d'hydrolyse enzymatique a été obtenue avec le résidu solide prétraité à la base. La quantité de sucre libérée était de 7.56 mg.g^{-1} de solide, par rapport à 6.82 et 5.62 mg.g^{-1} , pour les résidus solide prétraités à l'acide dilué et à l'acide concentré, respectivement, également après 30 heures d'hydrolyse. Une faible augmentation de la libération de glucose a été observée lorsque le temps d'hydrolyse a été prolongé à 40 heures, indiquant qu'un temps d'hydrolyse de 30 heures était suffisant afin de récupérer

les sucres potentiels dans le grignon d'olive prétraités.

D'autre part, il ressort de ces résultats que la libération de sucre pendant l'hydrolyse enzymatique pour toutes les concentrations en substrats testées est caractérisé par une libération initiale très rapide et la majeure partie du sucre a été libérée après 10 h, suivie d'une libération lente. Les résultats indiquent clairement qu'à de grande concentration en substrat et en concentration constante en enzyme, la concentration en sucre libérée est significative. On s'attend à ce que les grandes concentrations en substrat se traduisent par une production d'éthanol économiquement réalisable, car le coût des enzymes a traditionnellement été considéré comme un obstacle majeur au développement des technologies du bioéthanol.

Enfin, les résultats de cet essai donne une indication de la digestibilité enzymatique à haute concentration en substrat, ceci est probablement du à la réduction de la taille, qui a pu augmentée l'accessibilité des enzymes vers la cellulose. Cependant, la production relativement faible de sucre provenant de l'hydrolyse enzymatique pourrait s'expliquer en partie, de la teneur élevée en lignine de grignon d'olive, qui rend l'endocarpe de l'olivier résistant aux attaques enzymatiques. D'autre part, puisque les solides ont été séchés avant d'être utilisés dans l'hydrolyse enzymatique, le séchage aurai pu provoquer une contraction des pores et ainsi une réduction de la surface interne.

5.5 Viabilité des cellules

Le nombre de cellule viable a été déterminée avec la méthode de bleu de méthylène, sur un échantillon prélevé de récipient après 48 heures de fermentation, en comptant les cellules bleues moyennes à foncées, enregistrées comme mortes (Image 5.5 et 5.6). Un pourcentage de viabilité des cellules 92 % a été enregistré.

5.6 Essai de Saccharification et de fermentation

A/ Fermentation de moût issu de prétraitement à l'acide dilué

L'évolution des différents paramètre de la fermentation de moût issu de prétraitement à l'acide dilué de grignon d'olive est donnée dans le tableau 5.2. Les températures internes du récipient fermentatif était de 30.3 °C à la première heure de fermentation pour atteindre 32.5 °C à la 48^{ème} heures de fermentation.

Les changements dans la concentration en ions hydrogène (pH) dans le milieu et dans le collecteur de CO₂ pendant la fermentation sont rapportés aussi dans le tableau 5.2. Le pH a légèrement baissé dans le milieu, mais cette diminution est significative dans le milieu collecteur de CO₂, ceci est probablement en raison de la production de CO₂ résultant de la consommation de sucres par la fermentation.

FIGURE 5.5 – Image microscopique de *Saccharomyces cerevisiae*, sans dilutionTABLE 5.2 – Évolution de la température interne, du pH de milieu, de la concentration en glucose, la densité et le pH milieu collecteur de CO₂ pendant la fermentation de moût issu de prétraitement à l'acide dilué

Période de fermentation (heures)	pH du milieu	Température interne	Glucose (g.l ⁻¹)	Densité (g.cm ³)	pH de collecteur de CO ₂
1	4.73	30.3	14.3	1.015	8.00
18	4.34	34	14.1	1.016	7.09
20	4.26	34.4	13.4	1.014	6.91
22	4.19	35.5	11.6	1.014	6.43
24	4.13	34.5	10.3	1.013	5.21
42	3.77	32.5	8.7	1.012	5.39
44	3.87	32.5	7.3	1.011	5.23
48	3.94	32.5	6.4	1.010	5.09

Un litre de milieu de fermentation au début du procédé (0 heure) contenait environ 14.5 g de glucose. Au cours de premier jour de la fermentation, les niveaux de glucose restent presque proche de leur niveau initiales. Cette phase a été suivie d'une baisse de la concentration en glucose dans le milieu, accompagnée d'une baisse de la densité. Ceci est du probablement à la croissance des levures qui s'est accompagnée d'une diminution de la teneur en sucre et de leur conversion en éthanol, activité principale des levures lors de la fermentation alcoolique.

La teneur élevée en glucose dans le premier heures de fermentation ; au cours de cette période, l'enzyme et la levure qui produit des enzymes hydrolytiques, décomposent les composants cellulaires et les glucides complexes, produisant de simples molécules de glucose. Dans la seconde phase, le glucose a été utilisé, dont la concentration a diminuée

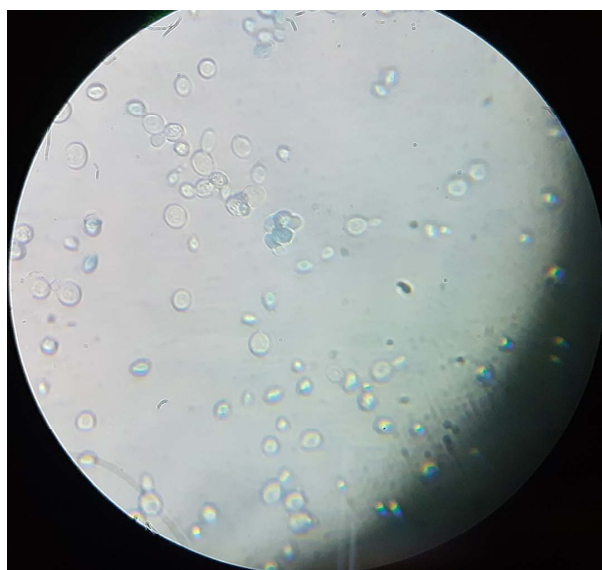


FIGURE 5.6 – Image microscopique de *Saccharomyces cerevisiae*, dilution x 5

et de l'éthanol produit. Au deuxième jours, une teneur significatif en glucose reste non convertis. Ceci est dû à l'inhibition de la croissance des levures qui pourrait être attribuée soit à la toxicité des produits de fermentation, y compris l'éthanol.

B/ Fermentation de moût issu de prétraitement à la soude

L'évolution des différents paramètre de la fermentation de moût issu de prétraitement à la soude de grignon d'olive est donnée dans le tableau 5.3. Le milieu présente une teneur initial en glucose supérieur à celle obtenue avec la digestion et à l'hydrolyse à l'acide faible. Au cour de la fermentation nous remarquons la même évolution des différents paramètres, mais la teneur en glucose comme pour le premier test, reste élevée, indiquant la poursuite de l'activité cellulolytique. La concentration élevée de glucose libre dans le milieu indique l'absence d'activité fermentative du glucose. A l'issue de ces deux expériences (A et B), des concentrations d'éthanol de 3.55 et 4.37 g.l⁻¹, respectivement, ont été obtenues.

Dans le tableau 5.4, les rendements en éthanol (%) et le rendement théorique (%) sont donnés. Comme on peut l'observer, les rendements obtenu sont proches des rendement théorique.

La teneur en éthanol obtenu après fermentation de moût issu de prétraitement à l'acide concentré est de 2.67 g.l⁻¹. Cette valeur est faible par rapport celle obtenue avec les moûts issus des prétraitements à l'acide dilué et à la soude. l'extrait issu de la fermentation de moût issu de prétraitement à la soude a été purifier à l'aide de rotavapeur. La concentration en éthanol mesuré est de 91.6 g.l⁻¹.

TABLE 5.3 – Évolution de la température interne, du pH de milieu, de la concentration en glucose, la densité et le pH milieu collecteur de CO₂ pendant la fermentation de moût issu de prétraitement à la soude

Période de fermentation (heures)	pH du milieu	Température interne	Glucose (g.l ⁻¹)	Densité (g.cm ³)	pH de collecteur de CO ₂
1	5.15	33.3	18.3	1.0185	7.01
18	5.06	33.5	17.8	1.0166	6.25
20	4.99	33.4	15.6	1.0165	5.05
22	4.82	33.4	14.2	1.0166	5.03
24	4.66	33.4	11.7	1.0163	5.01
42	4.14	33.4	10.3	1.0153	4.8
44	4.08	33.4	9.1	1.0148	4.7
48	3.92	33.4	8.8	1.0143	4.16

TABLE 5.4 – Rendement de fermentation des moût issu des prétraitements à l'acide dilué et à la base

Condition de prétraitement	Rendement en éthanol (%)	Rendement théorique (%)
Acide dilué	46.83	55.26
Base	45.02	52.2

Le rendement théorique a été calculé en supposant que tout le glucose potentiel dans le milieu au départ est disponible pour la fermentation et 0,51 % du rendement de fermentation du glucose

Les rendements obtenus dans les expériences SFS étaient dans la gamme de ceux obtenus à partir d'autres matériaux lignocellulosiques [4, 46], ou le procédé donne près de 67% comme rendement théorique en éthanol en utilisant de la pulpe d'olive non traitée comme substrat. Des rendements plus élevés en (80%) ont été obtenus dans les expériences avec de la pulpe d'olive prétraitée à l'eau chaude. L'augmentation des rendements est due à l'hydrolyse enzymatique et à une efficacité de fermentation plus élevée. Ainsi, le prétraitement a deux effets : augmenter l'accessibilité cellulosique de grignon d'olive aux attaques enzymatiques et éliminer les composés phénoliques qui sont considérés comme des inhibiteurs de fermentation.



Conclusions & perspectives

Conclusions

La composition de grignon d'olives, qui est un mélange de peau, de pulpe et de noyaux d'olives, a indiquée que la cellulose est un composant prédominant. La teneur en cellulose est d'environ 30 %. Compte tenu de la composition en sucre dans le grignon d'olive et du rendement en sucre dans les extraits, on peut conclure que le grignon d'olive peut être une matière première appropriée pour la production d'éthanol. La fermentation des extraits solides prétraités, utilisant l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, a augmenté encore les rendements de la fermentation.

Le prétraitement alcalin a permis une augmentation de l'accessibilité enzymatique par rapport au prétraitement acide. Le procédé de fermentation de moût issu de prétraitement à la soude, a montré un rendement relativement similaire par rapport au moût issu de prétraitement à l'acide dilué, produisant, respectivement 4.2 et 3.7 g.l⁻¹ d'éthanol. Bien que l'efficacité globale de conversion de grignon d'olive en éthanol est évidente, elle est plutôt faible, ce qui indique clairement que d'autres études pour améliorer le procédé, sont nécessaires et ainsi augmenter la production d'éthanol.

Bibliographie

- [1] Laxman R.S. ; Lachke A.H. *Handbook of Plant-Based Biofuels.*, chapter Bioethanol from lignocellulosic biomass. Part 1 : Pretreatment of the substrates, pages 121–139. CRC Press, 2008.
- [2] J. Fernández-Bolaños ; B. Felizón ; A. Heredia ; R. Guillén ; A.Jiménez. Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and of the cellulose residue from steam-exploded olive stones. *Bioresource Technology*, 68(2) :121–132, 1999.
- [3] M. Ahiduzzaman ; A. K. M. Aminul Islam ; Zahira Yaakob ; Jaharah A. Ghani ; Nurina Anuar. *Biomass and Bioenergy*, chapter Agricultural Residues from Crop Harvesting and Processing : A Renewable Source of Bio-Energy, pages 323–337. Springer, 2014.
- [4] Ignacio Ballesteros ; Jose Miguel Oliva ; Felicia Saez ; Mercedes Ballesteros. Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91 :91–93,, 2001.
- [5] Haagensen F. ; Skiadas I.V. ; Gavala H.N. ; Ahring B.K. Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. *Biomass Bioenergy*, 33 :1643 – 1651, 2009.
- [6] Haagensen F. ; Skiadas I.V. ; Gavala H.N. ; Ahring B.K. Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. *Biomass Bioenergy*, (33) :1643–1651, 2009.
- [7] Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 :248 – 254, 1976.
- [8] D.K. Shen ; S. Gu ; A.V. Bridgwater. Study on the pyrolytic behaviour of xylan-based hemicellulose using tg-ftir and py-gc-ftir. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 87 :199–206, 2010.
- [9] Arthur Caputi ; JR. Masao Ueda ; Thomas Brown. Spectrophotometric determination of ethanol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 19(3) :160–165, 1968.

- [10] A. Lentini ; P. Rogers ; V. Higgins ; I. Dawes ; M. Chandler ; G. Stanley ; P. Chambers. *Brewing Yeast Fermentation Performance.*, chapter The Impact of Ethanol Stress on Yeast Physiology, pages 25–38. Blackwell Science, 2003.
- [11] Lisa E. Gollapalli ; Bruce E. Dale ; and Douglas M. Rivers. Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (afex)-treated rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100 :23–35, 2002.
- [12] Ayhan Demirbas. Ethanol from cellulosic biomass resources. *International Journal of Green Energy*, 1(1) :79–87, 2004.
- [13] Ram B. Gupta ; Ayhan Demirbas. *Gasoline Diesel and Ethanol Biofuels from Grasses and Plants*. Cambridge University Press, 2010.
- [14] Feng Xu ; Jianming Yu ; Tesfaye Tesso ; Floyd Dowell and Donghai Wang. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques : A mini-review. *Applied Energy*, 104 :801–809, 2013.
- [15] DSM Food Specialties, 15 Rue des Comtesses PO Box 239 59472 Seclin Cédex France. *GSC CODEX MESSAGE CCFA45/2013/29*.
- [16] Maria C. Fernandes ; Ivone Torrado ; Florbela Carvalheiro ; Vânia Dores ; Vera Guerra ; Pedro M. L. Lourenço ; Luís C. Duarte. Bioethanol production from extracted olivepomace : dilute acid hydrolysis. *Bioethanol*, 2 :103–111, 2016.
- [17] Alba-Mendoza J. ; Ruiz-Gomez A. ; Hidalgo-Casado F. *Edible fats and oils processing : basic principles and modern practices*, chapter Technological evolution of the different processes for olive oil extraction, pages 341–347. Champaign, Illinois, USA : Am. Oil Chem. Soc., 1990.
- [18] O. Faix. *Methods in Lignin Chemistry*, chapter Fourier Transform Infrared Spectroscopy, pages 83–109. Springer, 1992.
- [19] Jørgensen Henning ; Kristensen Jan Bach ; Felby Claus Felby. Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars : Challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1 :119–134, 2007.
- [20] Isabel Miranda ; Rita Simões ; Barbara Medeiros ; Kesavan Madhavan Nampoothiri ; Rajeev K. Sukumaran ; Devi Rajan ; Helena Pereira ; Suzana Ferreira-Dias. Valorization of lignocellulosic residues from the olive oil industry by production of lignin, glucose and functional sugars. *Bioresource Technology*, 292 :121936, 2019.
- [21] Isabel Miranda ; Rita Simões ; Barbara Medeiros ; Kesavan Madhavan Nampoothiri ; Rajeev K. Sukumaran ; Devi Rajan ; Helena Pereira ; Suzana Ferreira-Dias. Valorization of lignocellulosic residues from the olive oil industry by production of lignin, glucose and functional sugars. *Bioresource Technology*, 292 :doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121936, 2019.

- [22] Galbe M. ; Sassner P. ; Wingren A. ; Zacchi G. Process engineering economics of bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 108 :303–327, 2007.
- [23] Safa Souilem ; Abdelilah El-Abbassi ; Hajar Kiai ; Abdellatif Hafidi ; Sami Sayadi ; Charis M. Galanakis. *Olive Mill Waste : Recent Advances for Sustainable Management*, chapter Olive oil production sector : environmental effects and sustainability challenges, pages 1–28. Academic Press, 2017.
- [24] Franklin Che ; Ioannis Sarantopoulos ; Theocharis Tsoutsos ; Vasileios Gekas. Exploring a promising feedstock for biodiesel production in mediterranean countries : A study on free fatty acid esterification of olive pomace oil. *Biomass & Bioenergy*, 36 :427–431, 2012.
- [25] T.K. Ghose. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2) :257–268, 1987.
- [26] Walker G.M. *Yeast Physiology & Biotechnology*. John Wiley & Sons : Chichester, UK ; New York, NY, USA,, 1998.
- [27] Deborah L. Sills ; James M. Gossett. Using ftir to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(2) :353–362, 2012.
- [28] C. A. Cardona ; O. J. Sánchez ; L. F. Gutiérrez. *Process Synthesis For fuel Ethanol Production*. CRC Press, 2010.
- [29] Michael Niaounakis ; Constantinos P. Halvadakis. *Olive Processing Waste Management : Literature Review and Patent Survey*. Elsevier, 2006.
- [30] B. Felizon ; J. Fernandez-Bolanos ; A. Heredia and R. Guillén. Steam explosion pretreatment of olive cake. *J. Am. Oil Chem. Soc. (JAOCS)*, 77(1) :15–22, 2000.
- [31] Adel Awad ; Hana Salman ; Yung-Tse Hung. *Handbook of Industrial and Hazardous Wastes Treatment*, chapter Olive Oil Waste Treatment, pages 778–881. Marcel Dekker, Inc., 2004.
- [32] Adel Awad ; Hana Salman ; Yung-Tse Hung. *Waste Treatment in the Food Processing Industry*, chapter Olive Oil Waste Treatment, pages 119–192. Taylor & Francis Group, LLC, 2006.
- [33] Alburquerque J.A. ; Gonzalez J. ; Garcia D. ; Cegarra J. Agrochemical characterization of "alperujo" a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91 :195 – 200, 2004.
- [34] Merino S.T. ; Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 108 :95–120, 2007.

- [35] Hyun-Beom Seo ; Hyun-Joo Kim ; Oh-Kyu Lee ; Ji-Hye Ha ; Hyeon-Yong Lee ; Kyung-Hwan Jung. Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36 :285–292, 2009.
- [36] Klinke H. B. ; Thomsen A. B. ; Ahring B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66 :10– 26, 2004.
- [37] Mohammad J. Taherzadeh ; Keikhosro Karimi. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials : A review. *BioResources*, 2(4) :707–738, 2007.
- [38] Ioannis Arvanitoyannis ; Aikaterini Kassaveti. *Olive Oil Waste Management : Treatment Methods and Potential Uses of Treated Waste*. Academic Press, 2008.
- [39] Rajan Katoch. *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Springer, 2011.
- [40] Barbara Hinterstoisser ; Margaretha Åkerholm and Lennart Salmén. Load distribution in native cellulose. *Biomacromolecules*, 4 :1232–1237, 2003.
- [41] Buddhi P. Lamsal ; Prachand Shrestha ; Samir Kumar Khanal. *Bioenergy and biofuel from biowastes and biomass*, chapter Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass, pages 201–224. American Society of Civil Engineers, 2010.
- [42] Devin Takara ; Prachand Shrestha ; Samir Kumar Khanal. *Bioenergy and biofuel from biowastes and biomass*, chapter Lignocellulosic Biomass Pretreatment, pages 172–200. American Society of Civil Engineers, 2010.
- [43] Kim Olofsson ; Magnus Bertilsson ; Gunnar Lidén. A short review on ssf - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels*, 1(7) :1–14, 2008.
- [44] Bai F.W. ; Anderson W.A. ; Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26 :89–105, 2008.
- [45] Brozzoli V. ; Bartoccib S. ; Terramoccia S. ; Conto G. ; Federici F. ; D’Annibale A. ; Petruccioli M. Stoned olive pomace fermentation with pleurotus species and its evaluation as a possible animal feed. *Enzyme and Microbial Technology*, 46 :223 – 228, 2010.
- [46] Ignacio Ballesteros ; José Miguel Oliva ; Maria José Negro ; Paloma Manzanares and Mercedes Ballesteros. Ethanol production from olive oil extraction residue pretreated with hot water. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100 :717–732, 2002.
- [47] Manuel Cuevas ; Sebastián Sánchez ; Vicente Bravo Rodríguez ; Juan Francisco García Martín. Fermentation of enzymatic hydrolysates from olive stones by *Pachysolen tannophilus*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(3) :461–467, 2009.

- [48] Sheldon J.B. Duff; William D. Murray. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol : A review. *Bioresource Technology*, 55(1) :1–33, 1996.
- [49] Chandra R. P. ; Bura R. ; Mabee W. E. ; Berlin A. ; Pan X. ; Saddler J. N. Substrate pretreatment : The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108 :67–93, 2007.
- [50] Dowe N. and McMillan J. Ssf experimental protocols- lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. Technical Report pp 1-16, Laboratory Analytical Procedure (LAP) National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2001.
- [51] Massadeh M.I. ; Modallal N. Ethanol production from olive mill wastewater (omw) pretreated with *Pleurotus sajor-caju*. *Energy Fuels*, 150(22) :150–154, 2008.
- [52] Selig N. ; Weiss N. and Ji Y. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Technical Report pp 1-5, Laboratory Analytical Procedure (LAP) National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2008.
- [53] S. Dermeche ; M. Nadour and C. Larroche ; F. Moulti-Mati ; P. Michaud. Olive mill wastes : Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48 :1532–1552, 2013.
- [54] P. Persson ; J. Andersson ; L. Gorton ; S. Larsson ; N.-O. Nilvebrant and L.J. Jonsson. Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 :5318 – 5325, 2002.
- [55] Kumar P. ; Barrett D. M. ; Delwiche M. J. ; Stroeve P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48(8) :3713–3729, 2009.
- [56] Vossen P. Olive oil : history, production, and characteristics of the world’s classic oils. *HortScience*, 42 :1093 – 1100, 2007.
- [57] E. Palmqvist and B. Hahn-Hagerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. i : Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74 :17 – 24, 2000.
- [58] E. Palmqvist and B. Hahn-Hagerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. ii : Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74 :25 – 33, 2000.
- [59] Carol L. Williams ; Anju Dahiya ; Pam Porter. *Bioenergy : Biomass to Biofuels*, chapter Introduction to Bioenergy, pages 5 – 36. Elsevier Inc., 2015.
- [60] Chris Boulton & David Quain. *Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Science Ltd, 2001.
- [61] Smith T.C. ; Kindred D.R. ; Brosnan J.M. ; Weightman R.M. ; Shepherd M. ; Sylvester-Sylvester-Bradley R. Wheat as a feedstock for alcohol production. *Home-Grown Cereals Authority (HGCA)*, 61 :49, 2006.

- [62] Marcus Foston ; Art J. Ragauskas. Changes in lignocellulosic supramolecular and ultrastructure during dilute acid pretreatment of populus and switchgrass. *Biomass and Bioenergy*, 34(12) :1885–1895, 2010.
- [63] Michel Dubois ; K. A. Gilles ; J. K. Hamilton ; P. A. Rebers and Fred Smith. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 1956.
- [64] Tanveer Bilal Pirzadah ; Bisma Malik ; Manoj Kumar ; Reiaz Ul Rehman. *Biomass and Bioenergy*, chapter Lignocellulosic Biomass : As Future Alternative for Bioethanol Production, pages 145–163. Springer, 2014.
- [65] Seema Devi ; Anil Dhaka ; Joginder Singh. Acid and alkaline hydrolysis technologies for bioethanol production : an overview. *International Journal of Advanced Technology in Engineering and Sciences*, 4(6) :94–106, 2016.
- [66] Reeta Rani Singhania. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, chapter Cellulolytic Enzymes, pages 370–381. Springer, 2009.
- [67] A. Sluiter ; B. Hames ; R. Ruiz ; C. Scarlata ; J. Sluiter and D. Templeton. Determination of ash in biomass. Technical report, National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, 2005.
- [68] B. Hames ; R. Ruiz ; C. Scarlata ; A. Sluiter ; J. Sluiter and D. Templeton. Preparation of samples for compositional analysis. Technical report, National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, 2008.
- [69] Bruce Coulman ; Ajay Dalai ; Emily Heaton ; Camilo Perez Lee ; Mark Lefsrud ; David Levin ; Peggy G. Lemaux ; David Neale ; Sharon P. Shoemaker ; Jaswinder Singh ; Donald L. Smith and Joann K. Whalen. Developments in crops and management systems to improve lignocellulosic feedstock production. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 7 :582–601, 2013.
- [70] P.J. Van Soest and R.H. Wine. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. iv. determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the A.O.A.C.*, 50(1) :50–55, 1967.
- [71] Ronald E. Wrolstad ; Terry E. Acree ; Eric A. Decker ; Michael H. Penner ; David S. Reid ; Steven J. Schwartz ; Charles F. Shoemaker ; Denise Smith ; Peter Sporns. *Handbook of Food Analytical Chemistry : Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates*. A JOHN WILEY & SONS, INC., 2000.
- [72] Graham G. Stewart. *Brewing and Distilling Yeasts*. Springer, 2017.
- [73] Zhu L. ; O’Dwyer J. P. ; Chang V. S. ; Granda C. B. ; Holtzapple M. T. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*, 99(9) :3817 – 3828, 2008.

- [74] A. Sluiter ; B. Hames ; D. Hyman ; C. Payne ; R. Ruiz ; C. Scarlata ; J. Sluiter ; D. Templeton and J. Wolfe. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. Technical report, National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, 2008.
- [75] A. Sluiter ; B. Hames ; R. Ruiz ; C. Scarlata ; J. Sluiter ; D. Templeton and D. Crocker. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical report, National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, 2008.
- [76] Erick J. Vandamme. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, chapter Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products, pages 3–12. Springer, 2009.
- [77] N. Kosaric ; F. Vardar-Sukan. *The Biotechnology of Ethanol : Classical and Future Applications*, chapter Potential Source of Energy and Chemical Products, pages 85–218. WILEY-VCH, 2001.
- [78] A. Boyd ; T. Gunasekera ; P. Attfield ; K. Simic ; S. Vincent and D. Veal. *Brewing Yeast Fermentation Performance*, chapter Comparison of the Methylene Blue Assay with a New Flow-cytometric Method for Determining Yeast Viability in a Brewery, pages 174 –179. Blackwell Science Ltd, 2003.
- [79] R. Jason Quinlan ; Matt D. Sweeney ; Leila Lo Leggio ; Harm Otten ; Jens-Christian N. Poulsen ; Katja Salomon Johansen ; Kristian B. R. M. Krogh ; Christian Isak Jørgensen ; Morten Tovborg ; Annika Anthonsen ; Theodora Tryfona ; Clive P. Walter ; Paul Dupree ; Feng Xu ; Gideon J. Daviese ; Paul H. Waltone. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37) :15079 – 15084, 2011.
- [80] Thomas M. Wood and K. Mahalingeshwara Bhat. *Methods in Enzymology : Cellulose and Hemicellulose*, chapter Methods for Measuring Cellulase Activities, pages 87–112. Academic Press, 1998.
- [81] Ronald E. Wrolstad, Terry E. Acree, Eric A. Decker, Michael H. Penner, David S. Reid, Steven J. Schwartz, Charles F. Shoemaker, Denise Smith, and Peter Sporns. *Handbook of Food analytical Chemistry : Water, proteins, enzymes, Lipids, and carbohydrates*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. USA, 2005.
- [82] Yang Dai Ding ; Wyman. Review : Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4) :421–450, 2011.
- [83] Xiaoli Li ; Yuzhen Wei ; Jie Xu ; Ning Xu and Yong He. Quantitative visualization of lignocellulose components in transverse sections of moso bamboo based on FTIR macro and micro spectroscopy coupled with chemometrics. *Biotechnol Biofuels*, 11(263) :1–16, 2018.