
Soumis le : 17 Décembre 2012

Forme révisée acceptée le : 25 Avril 2013

Email de l'auteur correspondant :

eloutassinouredine@gmail.com

Hydrolyse physico-chimique et biologique de la biomasse lignocellulosique pour la production de bio-éthanol de deuxième génération

Nouredine Eloutassi^a, Bouchra Louaste^b, Latifa Boudine^b, Adnane Remmal^c

^a Centre régional des métiers de l'éducation et de la formation (CRMEF), Fès, Maroc.

^b Laboratoire de Biotechnologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc.

^c Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc.

Résumé

Les différentes exploitations industrielles des végétaux entraînent souvent la formation de quantités considérables de déchets lignocellulosiques, nommés déchets de biomasse. Le but de ce travail est la valorisation de cette biomasse en produisant du bioéthanol de deuxième génération, il s'agit d'une valorisation optimale de type "bioraffinerie" pour la production des sucres simples fermentescibles à haute valeur ajoutée. Dans le premier procédé qui est l'hydrolyse chimique, la biomasse a été dépolymérisée par un traitement à la vapeur. Ensuite, un traitement par l'acide sulfurique a été effectué pour la saccharification et la libération des sucres simples. Après, et dans le but de réduire les composés phénoliques, le substrat issu a été décanté et filtré puis traité par le dihydroxyde de calcium. Parallèlement, dans un second procédé (hydrolyse enzymatique), la biomasse a été prétraitée par la steam explosion pour rendre tous ces composés accessibles à l'hydrolyse enzymatique. La préparation des enzymes a été obtenue à partir du surnageant du milieu de culture de la souche *Trichoderma reesei*. En plus, les techniques et les variables d'hydrolyse chimique et biologique (la température, la pression, le temps, la concentration et les conditions de détoxification et de production d'enzyme) ont été optimisés. En conclusion, ce travail a permis de mettre au point un procédé biotechnologique pour valoriser la biomasse solide, afin de diminuer les coûts et d'ajouter une valeur socio-économique à ces déchets.

Mots clés: déchets lignocellulosique, traitements physicochimique et biologique, mono et polysaccharide

Abstract

Different industrial operations of plants cause frequently the formation of considerable amounts waste lignocellulosic named biomass wastes. The aim of this study is the valorization of this biomass by producing second-generation bioethanol, this is an optimal valorisation type "biorefinery" for the production of fermentable simple sugars with high added value. In the first process which is the chemical hydrolysis, the biomass was depolymerized by a steam treatment. Then, treatment with sulfuric acid was carried out to saccharification and release of simple sugars. In order to reduce phenolic compounds, the substrate was decanted and filtered and then treated with calcium dihydroxide. Meanwhile, in a second process which is the enzymatic hydrolysis the biomass was pretreated by steam explosion to make all these compounds accessible to enzymatic hydrolysis. The preparation of enzyme was obtained from the supernatant of culture medium of strain *Trichoderma reesei*. In addition, techniques and variable chemical and biological hydrolysis (temperature, pressure, time, concentration and conditions of detoxification and enzyme production) have been optimized. In conclusion, this work has helped to develop a biotechnological process to value the solid biomass in the order decrease costs and add socio-economic value to this waste.

Keywords: lignocellulosic waste, physicochemical and biological treatments, mono and polysaccharide

1. Introduction

Généralement, l'industrie agroalimentaire et de transformation des plantes génèrent des quantités

importantes de déchets lignocellulosiques qui sont mal exploitées. Aussi, l'augmentation du prix de pétrole et l'aggravation des émissions de gaz à effet de serre justifient la recherche de matières premières et de technologies alternatives capables de réduire la dépendance en ces combustibles fossiles et de protéger l'environnement [1, 2].

Le bioéthanol est déjà utilisé pour substituer une fraction du volume d'essence dans nombreux pays [3, 4, 5].

La biomasse lignocellulosique est une des principales ressources renouvelables présentes sur terre [5, 6, 7]. Elle est composée essentiellement de trois polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Les teneurs de différents constituants sont variables d'une espèce végétale à l'autre [8]. En effet la biomasse lignocellulosique des plantes contient des sucres polymérisés en cellulose et hémicellulose qui peut fournir du bioéthanol après plusieurs étapes de prétraitement et d'hydrolyse physique, chimique et biologique dites bioraffinerie. Le bioraffinage peut être défini comme un processus durable de transformation de la biomasse en produits biobasés (alimentation, produits chimiques, matériaux) et en bioénergie (biocarburants, électricité, chaleur). Le concept de bioraffinerie est analogue à celui du raffinage de pétrole (figure 1 a et b) qui produit différents carburants et produits chimiques [1, 2, 9, 10].

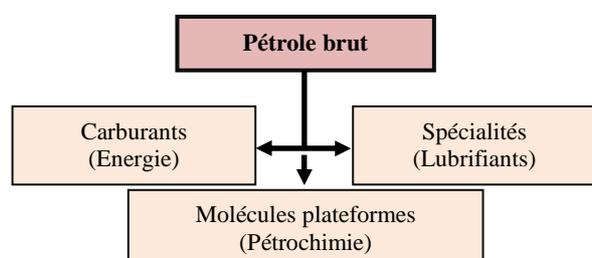


Figure 1 a

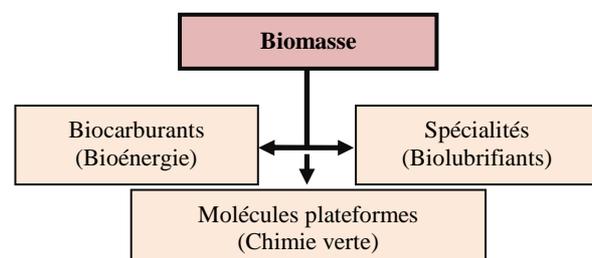


Figure 1 b

Figure 1 : Raffinage du pétrole en carburants (Figure 1a) et de la biomasse en biocarburants (Figure 1b), et en molécules plateformes et spécialités.

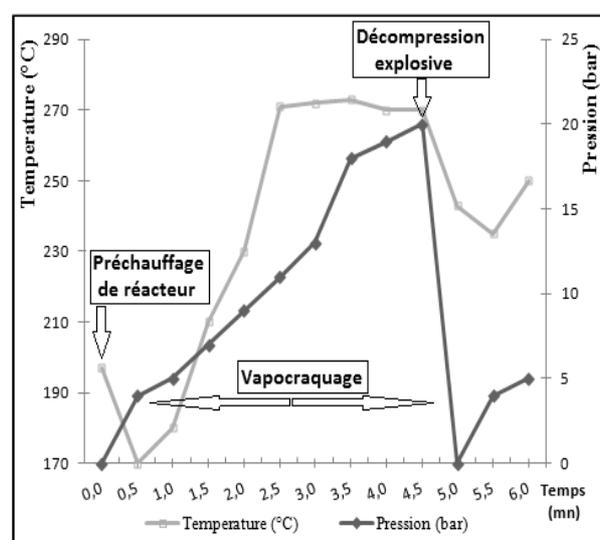
Dans le cadre de notre travail, les déchets issus de l'industrie de transformation des plantes ont été traités pour la production de sucres monomères. L'étude est divisée en deux grandes phases. La première est une étude détaillée de l'hydrolyse chimique de la matière lignocellulosique. Tandis que la deuxième phase, est un traitement biologique par des enzymes. Les deux phases ont été accompagnées par un prétraitement à la vapeur dite aussi la technique du steam explosion.

2. Matériel et méthodes

2.1. Prétraitement à la vapeur / Steam explosion

Le prétraitement à la vapeur ou appelé encore steam explosion est une technique très prometteuse pour la biomasse lignocellulosique avant bioconversion. C'est un procédé thermo-mécano-chimique qui déstructure la matière lignocellulosique et l'hydrolyse partiellement. Il est composé de deux phases distinctes ; le vapocraquage et la décompression explosive. Dans ces conditions, 1 kg de déchets de l'industrie de distillation de romarin [11] a été lavé avec de l'eau pure pour enlever les impuretés et déposé dans un erlenmeyer contenant 3 litres d'eau distillée. Le substrat est prétraité à la vapeur dans un autoclave (20 minutes à 270 C°) le temps de la dépressurisation était de 1 à 2 secondes chaque 5 minutes. Nous avons résumé cette technique dans la figure 2.

Figure 2 : Principe du prétraitement à la vapeur / steam explosion



2.2. Hydrolyse acide

Le substrat issu du prétraitement à la vapeur (steam explosion) est traité ensuite par l'acide sulfurique dans un extracteur à reflux. La concentration de l'acide sulfurique et le temps de traitement ont été optimisés par la méthode de planification des expériences [12]. Les conditions optimales utilisées pour rompre les liaisons osidiques et produire des monomères sont 0,5% d'acide sulfurique pendant 50 minutes.

2.3. Elimination des inhibiteurs de la fermentation

La précipitation des composés phénoliques résultants de différents hydrolyses sont, postérieurement, des inhibiteurs de la fermentation alcoolique, est réalisée par

l'augmentation du pH de l'hydrolysats à 9 avec le dihydroxyde de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) [3, 8, 13].

2.4. Hydrolyse enzymatique

Dans le processus biologique, l'hydrolyse est catalysée par des enzymes appelées génériquement cellulases (composés d'endo- et d'exo-glucanases et de β -glucosidases). Ainsi, comme dans les processus acides, un prétraitement est nécessaire pour exposer la cellulose à l'attaque des enzymes. La préparation des enzymes a été obtenue à partir du surnageant du milieu de culture de la souche *Trichoderma reesei* cultivée sur la cellulose comme source de carbone et d'énergie [14]. Dans ce contexte, 20 ml du concentré ont été ajoutés à 100g de préparation précédente. Le temps, le pH et la température de la culture ont été optimisés. Nous avons utilisé *Trichoderma reesei* dans l'hydrolyse enzymatique, car elle a été l'espèce la plus étudiée pour la production de cellulases à des concentrations importantes et elle a fait l'objet d'utilisation industrielle. De plus, outre des cellulases, *T. reesei* produit des hémicellulases qui participent au processus d'hydrolyse des parois végétales [6, 13, 14, 15].

2.5. Analyses

La teneur en sucres réducteurs est déterminée par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS). La méthode phénol-acide sulfurique est utilisée pour évaluer la proportion de chaque sucre monomère issu de l'hydrolyse [16, 17].

Les trois fractions de la biomasse lignocellulosique; la cellulose, l'hémicellulose et la lignine ont été recherchées [18, 19].

Les composés phénoliques ont été analysés par la méthode Folin-Ciocalteu modifiée [3, 20].

3. Résultats et discussions

Cette étude consiste à une bioraffinerie de la biomasse pour produire de la bioéthanol de deuxième génération.

La figure 3 résume les différentes étapes de ce travail, elle comporte le prétraitement à la vapeur (steam explosion) suivi par l'hydrolyse acide et l'hydrolyse enzymatique qui ont été terminés par l'élimination des composés phénoliques et des acides organiques résultants.

3.1. Constituants du résidu lignocellulosique

Dans ce travail, la biomasse lignocellulosique utilisée est un résidu de l'industrie de distillation du romarin ainsi que d'autres ingrédients non distillés. La teneur de leurs trois composées principales est montrée dans le tableau 1.

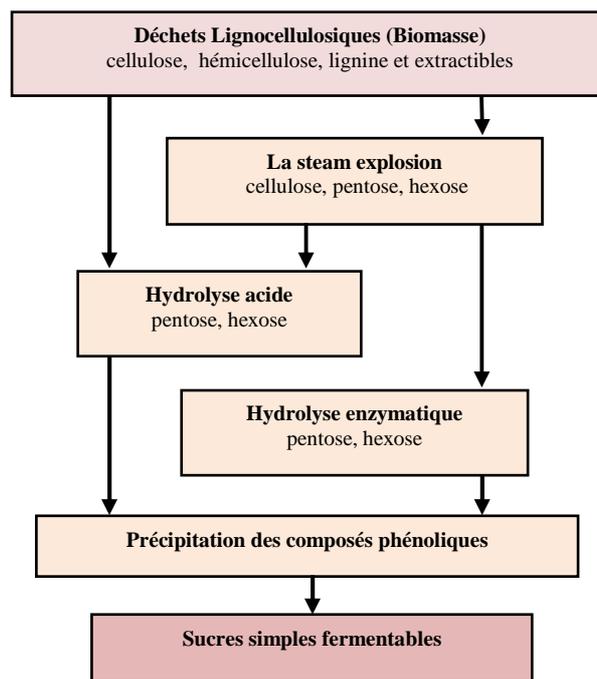


Figure 3: Processus de traitement physico-chimique et biologique de la Biomasse

Tableau 1 :

les principaux constituants du résidu lignocellulosique du romarin distillé et de parties non distillés

Composition	Teneur (g/ kg de matière sèche)
Cellulose	476
Hémicelluloses	331
Lignine et extractibles	170

Nous avons trouvé que la cellulose est la composante principale de nos déchets lignocellulosique. Elle est de l'ordre de 48 % de la matière sèche totale non traitée. L'hydrolyse de la cellulose conduit à la production de cellobiose et de sucres monomères fermentescibles (le glucose) [18, 19, 21, 22]. Cependant, les hémicelluloses représentent environ 33% de la matière non traitée. Après traitement, cette fraction est constituée de D-pentoses (essentiellement la xylose et le glucose) [14, 18, 19]. Mais pour la lignine, dans notre travail, il est de l'ordre de 17%.

3.2. Traitement de la matière lignocellulosique

Prétraitement à la vapeur: Le prétraitement a été optimisé à 270 °C pendant 20 minutes. Les résultats ont été exposés dans la figure 4 qui montre la déstructuration de la matière lignocellulosique. On remarque une variation considérable de la libération des composés phénoliques en fonction du temps de prétraitement, tandis que la concentration des sucres (sucres totaux) dans le milieu reste constante. Le prétraitement à la vapeur brise les liaisons hydrogène qui

relient les molécules de cellulose et d'hémicellulose et autorise un fractionnement efficace des composants constitutifs [12, 13, 23] ce qui les rend plus disponibles pour l'hydrolyse acide et l'hydrolyse enzymatique après l'élimination des composés phénoliques.

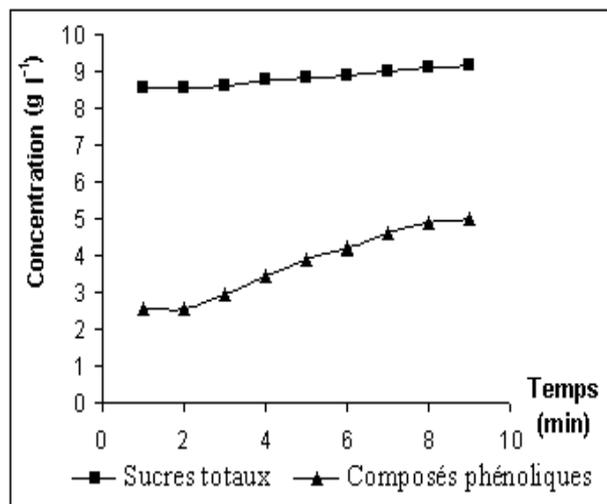


Figure 4 : Libération des composés phénoliques et sucres totaux pendant le prétraitement

Dans la littérature, le prétraitement de la biomasse est absolument indispensable pour l'étape biologique car les enzymes sont très peu actives sur la biomasse à l'état brut [6, 7, 15, 23]. En même temps, pour qu'un prétraitement soit efficace et augmente la valeur des différents composants de la biomasse, il est important d'établir des conditions limitant la formation de produits de dégradation qui peuvent inhiber l'étape de fermentation [23, 24, 25].

- *Hydrolyse acide* : Plusieurs concentrations d'acide sulfurique ont été testées sur le substrat prétraité à la vapeur. Le dosage des sucres [16] nous a permis de déterminer les conditions optimales d'hydrolyse acide de la cellulose et de l'hémicellulose en sucre simple qui sont de 0.5 % d'acide sulfurique à 100°C (Tableau 2).

Tableau 2:

Libération des sucres totaux et des composés phénoliques après 50 min de l'hydrolyse acide

Acide sulfurique (%)	Sucres totaux (g.l ⁻¹)	Composés phénoliques totaux (g.l ⁻¹)
0.1	10.85	14.25
0.5	22.5	14.25
1	22.5	14.25
2	22.5	14.25
5	22.5	14.25
10	22.5	14.25
20	22.5	14.25

L'application seule de l'hydrolyse acide amène à la dépolymérisation des hémicelluloses et l'obtention des résidus de pentoses. Selon la sévérité des conditions employées, une partie des résidus pentoses peut subir une réaction de déshydratation qui conduit à la formation de furfural. La manière exacte de mettre en œuvre cette hydrolyse acide est très variable, mais il a été souvent combiné avec une explosion à la vapeur, ce qui conduit à la désintégration de la matière et l'obtention des résidus xylose sous la forme de sucres monomères [6, 7, 12, 13].

- *Précipitation des composés phénoliques totaux*

Le prétraitement et l'hydrolyse acide provoquent la libération de composés phénoliques qui inhibent postérieurement la fermentation alcoolique. Dans le but d'améliorer le rendement en éthanol, à partir du substrat de l'hydrolyse, le Ca (OH)₂ a été utilisé [6, 22].pour sa capacité à précipiter les composés phénoliques (Tableau 3).

Tableau 3:

Evolution des sucres et des composés phénoliques en fonction des étapes de traitements de la biomasse lignocellulosique

A	Etapes de préparation de la matière lignocellulosique			
	B	C	D	E
Glucose	6.05	6.55	9.6	9.5
Xylose	2.02	2.25	7.33	7.2
Mannose	0.015	0.02	2.37	2.37
Galactose	0.225	0.25	1.2	1.2
Cellulose et Hémicellulose	8.8	9.2	0	0
Composés phénoliques totaux	2.5	5.1	14.25	5

A : Constituants de la biomasse (g.l⁻¹). B : Concentration du départ. C : Traitement à la vapeur. D : Hydrolyse acide. E : Réduction des composés phénoliques

Dans le tableau 3 on a montré la réduction de concentration des composés phénoliques qui est passée de 14.25 g/l à 5 g/l et qui se traduit par une nette amélioration, d'environ 40% du rendement, de la fermentation alcoolique. Ce dernier résultat sera traité séparément dans une autre étude.

- *Traitement enzymatique* : Essentiellement, la biodégradation de la matière lignocellulosique est réalisée par des bactéries (*Ruminococcus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermonospora*, *Streptomyces*...) et des champignons (*Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Penicillium*, *Trichoderma*...).

Dans un premier temps, il est nécessaire de récupérer les enzymes produites par ce champignon dans le milieu de culture et, éventuellement, de les conditionner avant leur mise en œuvre en hydrolyse. Les conditions optimales sont

une température de 45-50 °C et un pH de 4,8 pendant un temps de culture et d'action optimisé à 40h (figure 5).

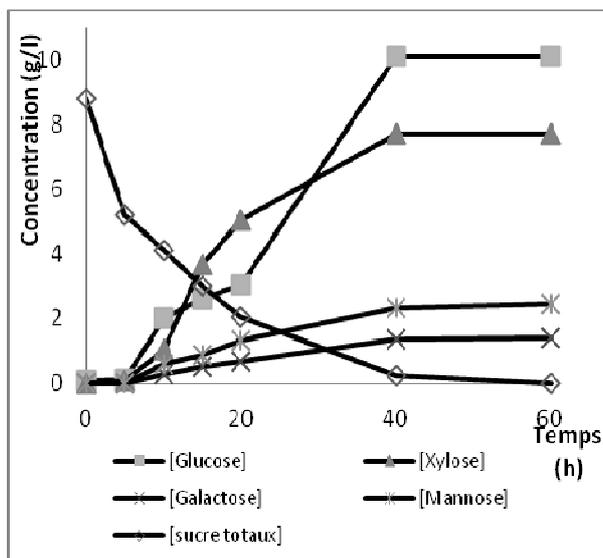


Figure 5 : hydrolyse enzymatique de la biomasse et formation des sucres simples monomères

Ce principe est fondamental, car les sucres complexes sont brisés en sucres simples par l'action synergique des enzymes qui peut être définie par une bonne coordination dans l'hydrolyse. Les trois types d'enzymes impliquées dans le processus sont les cellulases endo 1,4 β -glucanases et exo 1,4 β -glucanases, qui hydrolysent les celluloses en cellobiose, et les β -glucosidases qui hydrolysent les cellobioses en glucose [6, 13].

Ainsi, la figure 5 présente déjà des rendements élevés des sucres simples (75%-85%) par l'hydrolyse enzymatique en plus, une grande amélioration est encore attendue (85%-95%) si ce procédé est lié à la phase de steam explosion de la biomasse. Aussi, les conditions sont relativement douces dans lesquelles elle est effectuée afin d'éviter de dénaturer les molécules initiales et de diminuer le coût du procédé. Et finalement, l'hydrolyse enzymatique génère peu de composés phénoliques et d'effluents à traiter et n'engendre pas de problèmes de corrosion [13, 14].

4. Conclusion

Le présent article vise à présenter les effets de l'application d'une série de traitements de la matière lignocellulosique pour la production de bioéthanol de seconde génération. Il reprend les différents principes de multiples techniques utilisées et ses effets sur les fractions constitutives de la biomasse dans un contexte de bioraffinerie.

Les résultats obtenus dans ce travail permettent d'envisager des recherches plus approfondies pour la mise au point d'un procédé de valorisation de milliers de tonnes de matière lignocellulosique produite par les industries agroalimentaires et de transformations des plantes.

Ce procédé a le mérite d'être valorisant par la production des substances simples qui peuvent être considérées comme une très bonne forme d'énergie renouvelable, propre et ne génère pas de gaz carbonique (CO₂) supplémentaire dans l'atmosphère.

Ce genre de procédé peut aussi améliorer les revenus des unités industrielles des pays producteurs de déchets végétaux et permettre le développement d'activités industrielles propres qui créeraient des opportunités d'emploi et offriraient une meilleure compétitivité sur le marché international.

5. Références bibliographiques

- [1] A. Margeot, F. Monot, *Organisation mondiale de la propriété intellectuelle*, WO (2009) 098365 A2.
- [2] P. Laurent, J. Roiz, J.L. Wertz, A. Richel, M. Paquot, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 15 (2011) 597-610.
- [3] L. Jönsson, E. Palmqvist, N. Nilvebrant, B. Hahn-Hägerdal, *Appl. Microbiol. Biotechnol* 49 (1998) 691-697.
- [4] J. Ogier, D. Ballerini, J. Leygue, L. Rigal, *Oil & Gas Science and Technology* 54 (1999) 1 67-94.
- [5] D. Ganesh, S. Saratale, *African Journal of Biotechnology* 11 (2012) 1002-1013.
- [6] H. Boussarsar, Thèse PhD, Reims, France (2008).
- [7] M. J. Donohue, *Technologie - Innovation* 15 (2008) 172-177.
- [8] I. Didderen, J. Destain, P. Thonart, *Forêt Wallonnen* 104 (2010) 39-45.
- [9] A. Khelfa, Thèse PhD, Metz, France (2009).
- [10] R. Zeitoun, Thèse PhD, Toulouse (2011).
- [11] N. Eloutassi, Doctorat national, Fès, Maroc (2004).
- [12] R. Carlson, A. Nordahl, *Topics in current chemistry* 166 (1993) 1-64.
- [13] R. Kumar, S. Singh, V. Singh, *J Ind Microbiol Biotechnol* 35 (2008) 377-391.
- [14] M. Warzywoda, D. Ballerini, F. Monot, *Fascicule de brevet europeen* 44 (2011) 5.
- [15] C. Wyman, *Tren Biotechnol*, 25 (2007) 153-157.
- [16] M. Dubois, A. Gilles, J. Hamilton P. Rebers, *Anal. Chem* 28 (1956) 350-356.
- [17] X. Xionggang, W. Xinlin, W. Yuanfeng, C. Qinjie, *Arch. Biol. Sci* 62 (2010) 2 669-676.
- [18] B. Godin, F. Ghysel, R. Agneessens, T. Schmit, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 14 (2010) 549-560.
- [19] B. Godin, R. Agneessens, S. Gofflot, S. Lamaudière, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 15, (2011) 1 165-182.
- [20] D. Box, *Water Res* 17 1983 511-516.
- [21] N. A. Campbell, De Boeck Université. 3^{ème} édition, (1995) 68-70.
- [22] Y. Lee, P. Iyer, R. Torget, *Biotechnology* 65 (1999) 94-11.
- [23] N. Jacquet, C. Vanderghem, C. Blecker, M. Paquot, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14 (2010) 2 561-566.
- [24] M. Bos, J. Zeevalking, A. Voragen, *Bio Technol* 98 (2007) 20-34.
- [25] Y. Zheng, P. Zhongli, Z. Ruihong, *Int J Agric & Biol Eng* 2 (2009) 3 51-68.