

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES



Faculté de Technologie

Thèse de Doctorat

Présentée par :

Mr DIDAOUI Amine

En vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT - LMD** en :

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie des Polymères

**Synthèse et caractérisation d'un biocarburant à base
d'une biomasse lignocellulosique**

Devant le jury composé de :

Mme.	GHEMMIT Naima	Professeur	UMBB	Présidente
Mme.	AKSIL Tounsia	MCA	UMBB	Directrice
Mme.	BOUDIEB Naima	MCB	UMBB	Co- Directrice
Mme.	TERRACHET Souhila	Professeur	UMBB	Examinatrice
Mme.	SABBA Nassila	Professeur	USTHB	Examinatrice
Mme.	BOUKRAA Fatima	Professeur	USTHB	Examinatrice
Mr.	ALIOUCHE Djamel	Professeur	UMBB	Invité

Année Universitaire 2023/2024

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier, le bon dieu de m'avoir donné le courage et la persévérance pour accomplir cette thèse.

Ce travail symbolise à la fois la fin de mon cursus universitaire à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes, mais également le début d'une future carrière. Il marque la conclusion d'une période de transformation personnelle riche en événements et en rencontres, une véritable période de construction intérieure intense.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Recherche Traitement et Mise en Forme des Polymères Fibreux (LTMFP), à la faculté de technologie, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes sous la direction de Madame AKSIL Tounsia et Madame BOUDIEB Naima.

J'exprime ma profonde gratitude à **Madame AKSIL Tounsia** Maître de Conférence A à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes et **Madame BOUBIEB Naima**, Maître de Conférence B à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, pour avoir dirigé ce travail avec dévouement. Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements pour leur bienveillance constante à mon égard, leur écoute, les précieux conseils, leur disponibilité, ainsi que pour avoir partagé avec moi leurs connaissances et leur qualité professionnelle et humaine.

Je remercie ensuite l'ensemble des membres du jury :

Madame GHEMMIT Naima, Professeur à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes, pour avoir accepté d'être présidente de jury de cette thèse et pour m'avoir fourni une multitude de pistes de recherche pour les prochaines années ; **Madame TERRACHET Souhila**, Professeur à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes, pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse ; **Madame SABBA Nassila**, Professeur à Université des Sciences et de la Technologie Houari-Boumediene, pour avoir accepté mon invitation à participer à ce jury et examiner ce travail ; et enfin **Madame BOUKRAA Fatima** , Professeur à Université des Sciences et de la Technologie Houari-Boumediene, pour m'avoir fait l'honneur d'être examinatrice pour cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à **Monsieur ALIOUCHE Djamel**, Professeur à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes pour son intérêt constant et son suivi attentif de mon travail. Je souhaite le remercier chaleureusement

Remerciements

pour son soutien inestimable, sa confiance et sa générosité en partageant ses vastes connaissances scientifiques ainsi que ses conseils éclairés, qui ont facilité mes recherches.

Un grand merci également à Monsieur **AMRANE Abdelatif** dont l'aide précieuse, les corrections, les conseils et la contribution à nos publications scientifiques ont été d'une valeur inestimable, Je suis reconnaissant pour nos collaborations fructueuses. Je voudrais également exprimer ma gratitude envers **Monsieur GHERBI Younes, Madame OUKALI Zahia, Madame CHENAH May** pour leur soutien tout au long de mes années de doctorat, et pour avoir partagé leur expertise en microbiologies.

Sans oublier les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à l'ensemble des chercheurs, les doctorants, les laborantins de laboratoires : Traitement et Mise en Forme des Polymères Fibreux, Technologies Douces, Valorisation, Physico-Chimie des Matériaux Biologiques et Biodiversité, Unité de Recherche Matériaux, Procédés et Environnement, Conservation et Valorisation des Ressources Biologiques, Technologie Alimentaire, laboratoire de Contrôle de Produits Finis raffinerie d'Alger.

J'exprime également ma profonde gratitude au personnel qui m'a aidé, sans oublier mes amis et à ma famille qui m'ont soutenue pendant cette période.

Dédicace

Ça y est, le moment est arrivé... cet instant à la fois tant espéré et tant redouté ces derniers mois, cet instant qui marque la fin d'un cycle mais aussi le début d'un autre, la dernière pierre de l'édifice avant de partir vers d'autres horizons. Hé oui, voici l'heure des dédicaces, les dernières pages à écrire pour boucler ce manuscrit !

A mes chers parents qui ont consacré leur vie pour bâtir la mienne, jamais je ne saurais m'exprimer quant aux sacrifices et aux efforts qu'ils ont consentis à mon éducation et à mes études et pour moi-même pour les sacrifices .

(Mon temps- mon argent- mes congés- exposition au stress)

Mon père, ma mère c'est grâce à vous et c'est pour vous....

Me voilà Docteur !!

À ma femme

À mon frère

À ma sœur

À ma belle sœur

Sans oublié Nélia, Mohamed-amir, Ilyes, et Adem

En fin, à tous mes amis, vous avez été présents à chaque étape de ce voyage, vos encouragements, vos conseils, merci la faite de partagé cette aventure avec moi.

Amine DIDAOU

Résumé

Cette étude porte sur la faisabilité de valoriser une biomasse lignocellulosique en produisant et en caractérisant un biocarburant de 2^{ème} génération à partir du sarment de la vigne plus précisément de la variété cardinale qui est considérée comme un « déchet de bois ». L'analyse physico-chimique de ce déchet de sarment de la vigne a montré qu'elle contient environ 67 % (g/g) de l'holocellulose sous forme de cellulose et d'hémicellulose, qui est une source potentielle des sucres réducteurs. En premier lieu, ce travail se concentre principalement sur la caractérisation de la biomasse lignocellulosique, ainsi que la production d'hydrolysats riches en sucre réducteur fermentés par une levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*) à partir du glucose d'hydrolysats détoxifiés au cours d'une fermentation aérobie, distillés, purifiés. L'étape de prétraitement choisie dans ce travail repose sur deux techniques : le traitement mécanique suivi d'une thermo-hydrolyse, et le traitement mécanique suivi par une hydrolyse chimique sous un acide dilué. Une optimisation des conditions de production de l'hydrolysats a été réalisée en utilisant la technique des plans d'expérience (plan de Plackett-Burman et plan de Box Behnken) pour atteindre une teneur maximale en glucose. Les déchets de sarments ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge à réflexion totale atténuée et à transformée de Fourier (ATR-FTIR), diffraction des rayons X (DRX), analyse thermique simultanée (ATS), fluorescence des rayons X (FRX) et microscopie électronique à balayage (MEB). Le résultat optimal était de 2,53% en sucres équivalant à un rendement massique de 50,64%. La composition chimique était la suivante : 43,38 % de cellulose, 23,58 % d'hémicellulose, 21,22 % de lignine, 2,53 % de cendres, 5,82 % de protéines brutes, 11,7 % d'humidité et des matières extractibles (0,81 % de matières grasses, 0,56 % de sucres totaux, 2,3 % de matières extractibles (Hexane-éthanol)). En fait, un plan composite central rotatif a été utilisé pour obtenir le maximum de sucres réducteurs utilisés dans la fermentation du bioéthanol comme source de carbone. Le total des sucres réducteurs a été estimé par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS).

Mots clés : biocarburant, valorisation, biomasse lignocellulosique, plan d'expérience, fermentation alcoolique.

Abstract

This study examines the viability of utilising lignocellulosic biomass to produce and characterise a 2nd-generation biofuel based on the oath of the vine of cardinal "wood waste" varieties. This sawdust from lignocellulosic biomass waste is a mixture rich in polysaccharide fractions, representing local species. Physico-chemical analysis of this vineyard waste showed that it contains around 67% (g/g) of holocellulose. Firstly, this work focuses in particular on the lignocellulosic biomass characterisation and the production of a hydrolysate rich in reducing sugars fermented by a baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), from the glucose hydrolysate detoxified during aerobic fermentation, distilled, purified. The pre-treatment stage chosen in this work is based on two techniques: mechanical treatment followed by thermo-hydrolysis, and the other technique is mechanical treatment followed by chemical hydrolysis under dilute acid.

Firstly, the conditions for producing the hydrolysate rich in reducing sugars were optimised using experimental design (Plackett-Burman and Box Behnken) to achieve maximum glucose content. A bioethanol production model was built from these data in order to predict the behaviour of the strain during optimal cultivation, leading to high alcohol productivity. The vine shoot waste was characterised by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), X-ray diffraction (XRD), simultaneous thermal analysis (STA), X-ray fluorescence (XRF) and scanning electron microscopy (SEM). The optimum result was 2.53% sugars, equivalent to a mass yield of 50.64%. The chemical composition was as follows: 43.38% cellulose, 23.58% hemicellulose, 21.22% lignin, 2.53% ash, 5.82% crude protein, 11.7% moisture and extractives (0.81% fat, 0.56% total sugars, 2.3% extractives (Hexane-ethanol)). A rotating central composite plane was used to obtain the maximum amount of reducing sugars used in bioethanol fermentation as a carbon source. Total reducing sugars were estimated using the dinitrosalicylic acid (DNS) method.

Key words: biofuel, valorisation, lignocellulosic biomass, experimental design, alcoholic fermentation

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو إمكانية تثمين الكتلة الحيوية اللينوسيلولوزيك من خلال إنتاج ودراسة خصائص الوقود الحيوي من الجيل الثاني المستخلص من سيقان نبتة العنب والتي تصنف كبقايا الخشب. التحاليل الفيزيوكيميائية أثبتت أن هذه البقايا تحتوي على 67% (غرام / غرام) من الهولوسيليلوز والتي تعتبر مصدر أساسي من السكريات المرجعة على شكل سيليلوز وإيمي سيليلوز. اولا هذا العمل يتركز على دراسة خصائص الكتلة الحيوية وإنتاج مستخلص غني بالسكريات المرجعة المخمرة بواسطة خميرة الخبز (*Saccharomyces cerevisiae*) من خلال سكر الجلوكوز المنقى من المواد السامة المؤثرة على التخمر الهوائي. الخطوة الاولى المختارة قبل المعالجة في هذه الدراسة تتركز على تقنيتين هما: اولا المعالجة الميكانيكية متبوعة بمعالجة التحليل الحراري وثانيا المعالجة الميكانيكية متبوعة بالتحلل الكيميائي في وسط حمضي ممي. حصر الشروط الانتاج والتحليل تمت باستعمال تقنية المخططات التجريبية بهدف الحصول على مردود اقصى من سكر الجلوكوز وهذا تم بمتابعة تأثير العوامل المختلفة في إنتاج الوقود الحيوي المستخلص من محلول خالي من السموم وذلك باستعمال خميرة الخبز لتجنب حضور مثبطات عملية التخمر في مختلف المراحل. البقايا المحصل عليها تمت دراسة خصائصها باستعمال التقنيات: (MEB), (FRX), (ATS), (DRX), (ATR-FTIR). النتائج المحصل عليها تثبت وجود نسبة 2.53% من السكريات، أي ما يعادل 50.64% لكل جرام من المادة الجافة. وجاءت التركيبة الكيميائية كما يلي: 43.38% سليلوز، 23.58% إيمي سلولوز، 21.22% لينين، 2.53% رماد، 5.82% بروتين خام، 11.7% رطوبة ومستخلصات (0.81% دهون، 0.56% سكريات كلية، 2.3% مستخلصات (هكسان إيثانول)).

مخطط المركب المركزي دوار تم إستخدامه للحصول على أقصى قدر من السكريات المرجعة المستخدمة في تخمير الإيثانول الحيوي كمصدر للكربون. تم تقدير إجمالي السكريات المرجعة باستخدام طريقة حمض الدينيتروساليسيليك (DNS).

الكلمات المفتاحية: الوقود الحيوي، تثمين الكتلة الحيوية اللينين سلولوزية، التصميم التجريبي، السكريات المختزلة، التخمر الكحولي.

Table des figures

Figure I.1: Conception d'une bioraffinerie, ses produits, matières premières, procédés.....	9
Figure II.1: Composition et structure de la biomasse lignocellulosique.....	23
Figure II.1: Composition et structure de la biomasse lignocellulosique.....	23
Figure II.2: Récalcitrante, traitement et valorisation de la biomasse lignocellulosique.....	24
Figure II.3: Structure parallèle d'unité de cellulose.....	25
Figure II.4: Structure de la cellulose.....	26
Figure II.5: Configuration équatoriale de la squelette d'hémicellulose.....	26
Figure II.6: Configuration de squelette d'hémicellulose cas liaison de β 1-galactane.....	27
Figure II.7: Classification de conception des plans d'expériences.....	35
Figure III.1: Variétés de vigne dans la région viticulture de Boumerdes.....	44
Figure III.2 : Répartition et superficies des champs de vigne dans la wilaya de Boumerdes de l'année 2020.....	45
Figure III. 3 : Biomasse lignocellulosique du sarment de la vigne à l'état poudre après broyage.....	45
Figure III.4 : Cellulase (a) cellulast 1,5 (Novozymes), (b) commercial cellulolytic cocktails SN 50100.....	56
Figure III.5 : Schéma résumant la méthode de production du bioéthanol à partir de la biomasse lignocellulosique du sarment de vigne par la saccharification et la fermentation simultanée.....	69
Figure III.6: Schéma résumant la méthode de production du bioéthanol à partir de la biomasse lignocellulosique du sarment de vigne par la saccharification et fermentation séparée.....	70
Figure III.7: Schéma résumant la méthode de production du bioéthanol à partir l'utilisation d'hydrolysats détoxifiés issue du traitement physicochimique par traitement microonde à l'acide sulfurique et le traitement a reflux par l'acide Trifluoroacétique (TFA)	71
Figure IV.1: Distribution granulométrique des déchets de sarments de tous les échantillons.....	73
Figure IV.2 : Spectres Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier - réflectance totale atténuée des déchets de sarment de la vine issue d'une biomasse lignocellulosique.....	74
Figure IV.3 : Diagrammes de diffraction des rayons X des déchets de sarments de la vigne.....	75
Figure IV.4: Diagrammes de diffraction des rayons X des déchets de sarments de la vigne traité (—) et non traité (—).....	77
Figure IV.5 : Analyse TG-DSC des déchets de sarments de vigne.....	79
Figure IV.6 : Morphologique (MEB) de la biomasse lignocellulosique du sarment de la vigne.....	82
Figure IV.7 : Hydrolyse enzymatique pour l'extraction des sucres réducteurs à partir de la biomasse lignocellulosique.....	98

Figure IV.8 : Photo montrant les colonies des deux levures de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> référenciés (A) ACTIFLORE® ROSÉ et (B) ATCC® 9763 ensemencées sur le milieu YEPDA.....	98
Figure IV.9 : Aspect microscopique à l'état frais de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> lyophilisée (A), l'ATCC® 9763 (B), ACTIFLORE® ROSÉ (C) observée par le microscope photonique (G x 100).....	99
Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	
Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	
Figure 3 : Courbe d'étalonnage de glucose pour dosage des sucres réducteurs.....	
Figure 4 : Courbe d'étalonnage du glucose pour de dosage des sucres totaux.....	
Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'éthanol pour de dosage en bioéthanol.....	
Figure 6 : Montage Soxhlet représentatif d'extraction des matières grasse et des extractibles (Hexane / éthanol)	
Figure 7 : Détoxification d'hydrolysats extraits à l'aide d'une hydrolyse chimique à partir de la biomasse lignocellulosique de sarment de la vigne.....	
Figure 8 : Analyse qualitative de la présence du bioéthanol par dichromate de potassium.....	
Figure 9 : Photos des appareils utilisés dans cette présente étude au cours de l'étape de prétraitement de la biomasse.....	
Figure 10 : Photos de la partie microbiologique des souches de la levure <i>saccharomyces cerevisiae</i>	
Figure 11 : Photos des appareils utilisés dans cette présente étude au cours de caractérisation de la biomasse lignocellulosique.....	

Liste des tableaux

Tableau I.1: Propriétés physico-chimiques de l'essence et de bioéthanol	12
Tableau II.1: Types des plans d'expériences	37
Tableau II.2: Plans de criblage	38
Tableau III.1 : Variables et les niveaux dans la conception statistique pour le criblage affectant le rendement de l'extraction du sucre.....	59
Tableau III.2 : Variables et les niveaux dans la conception statistique pour l'optimisation affectant le rendement de l'extraction du sucre.....	61
Tableau III.3 : Variables et les niveaux dans la conception statistique pour l'optimisation affectant le rendement de l'extraction du sucre.....	62
Tableau IV.1 : Composition de la biomasse lignocellulosique des déchets de sarments de vigne.....	78
Tableau IV.2 : Composition minérale de la surement de la vigne.....	79
Tableau IV.3 : Plan de Plackett-Burman des déchets de sarments et valeurs expérimentales des variables de réponse.....	85
Tableau IV.4 : Analyse de régression (ANOVA) des résultats expérimentaux du plan de Plackett-Burman sur l'extraction de sucre à partir de déchets de sarments de vigne par extraction acide.....	86
Tableau IV.5 : Coefficient estimé, t-value calculée, P- value et erreur standard du plan d'expérience de Plackett-Burman.....	87
Tableau IV.6 : Plan de Box Behnken pour les déchets de sarments de vigne et valeurs expérimentales des variables de réponse.....	88
Tableau IV.7 : Estimations des paramètres pour les effets linéaires, quadratiques et d'interaction de la variable sur le rendement en sucre réducteur	89
Tableau IV.8 : ANOVA des résultats expérimentaux du plan de Box Behnken sur l'extraction de sucre à partir de déchets de sarments de vigne par extraction acide.....	90
Tableau IV.9 : Plan centrale composite design pour les déchets de sarments de vigne et valeurs expérimentales des variables de réponse.....	91
Tableau IV.10 : ANOVA du plan composite central Plan orthogonale, les Résultats expérimentaux sur l'extraction de sucre à partir de déchets de sarments de vigne à l'aide de micro-ondes.....	93
Tableau IV.11 : Estimations des paramètres pour les effets linéaires, d'interaction et quadratiques des variables.....	95
Tableau IV.12 : Résultats de dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des différents d'échantillons de sarment de la vigne.....	97
Tableau IV.13: Résultats d'hydrolyse acide et d'une saccharification d'échantillon de la biomasse lignocellulosique.....	97

Liste des tableaux

Tableau IV.14 : Comportement de la croissance des levures <i>saccharomyces cerevisiae</i> en fonction du pH et de la température.....	100
Tableau IV.15 : Résultats de la fermentation alcoolique des déchets de sarment de la vigne fermenté par la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>ACTIFLORE</i> ® <i>ROSÉ</i>	102
Tableau IV.16 : Résultat de la fermentation alcoolique pour la production d'un biocarburant...	103

Liste des Abréviations

ANOVA	Analyse of variance
ATCC	American type culture collection
BTU	British thermal unit
CCNUCC	Convention cadre des nations unies sur les changements climatiques
DOE	Design of experiment
EAG	Equivalent d'acide gallique
EIA	Environnemental impact assessment
EJ	Exa-joule = 10^{18} Joule
EQ	Équivalent de quercétine
HMF	Hydroxyméthyl-furfural
ICr	Indice de Cristallinité
ISO	International organization for standardization
MS Bloc	Motor Spirit Bloc
NREL	National renewable energy laboratory
QUADRILLION	10^{15}
REDI	Renewable energy directive
RMSE	Root mean square error
RSM	Réponse surface méthodologie
TEP	Tonne équivalent pétrole
TFA	Trifluoroacétique
ThDP	Thiamine pyrophosphate

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Table des figures	
Liste des tableaux	
Liste des Abréviations.....	
Table des matières	
Introduction générale.....	1
Chapitre I : Généralités sur les biocarburants.....	5
I.1. Dérèglement climatique, l'économie d'énergie, la transition énergétique aux énergies renouvelables	6
I.2. Conception des bioraffineries.....	7
I.3. Production de bioéthanol	10
I.4. Biocarburant	13
I.4.1. Biocarburants de première génération (1G)	13
I.4.2. Biocarburants de deuxième génération (2G)	15
I.4.2. Biocarburants de troisième génération (3G).....	16
I.4.3. Biocarburants de quatrième génération (4G).....	17
I.5. Hydrolyse	18
I.6. Fermentation.....	18
I.6.1. Métabolisme fermentaire	19
I.7. Distillation	20
Chapitre II : Biomasse lignocellulosique et plan d'expérience	22
II.1. Biomasse lignocellulosique	22
II.1.1. Cellulose.....	24
II.1.2. Hémicellulose	26
II.1.3. Lignine	28
II.1.4. Extractibles	29
II.2. Techniques d'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique.....	30
II.2.1. Hydro-thermolyse (Hydro-thermolysis).....	30
II.2.2. Explosion des fibres à l'ammoniaque, Procédés AFEX (Ammonia Fiber Expansion)	32

II.2.3. Hydrolyse organosolv	33
II.3. Plans expériences	34
II.3.1. Codifications les niveaux des facteurs	36
II.3.2. Type de plans d'expériences	36
II.3.2.1. Plans de criblages	37
a) . Plans factoriels	38
i). Plan factoriel complet	39
ii) . Plan factoriel fractionné	40
b). Plan de Plackett-Burman	40
II.3.2.2. Plans d'optimisations	41
a). Plan composite centrale	41
b). Plan de Box Behnken	42
II.4. Conclusion	42
Chapitre III : Matériels et Méthodes	43
III.1. Matières premières et échantillonnages	43
III.2. Caractérisation chimique de la biomasse lignocellulosique	46
III.2.1. Détermination du taux d'humidité.....	46
III.2.2. Détermination du taux de cendre.....	47
III.2.3. Détermination du taux des extractibles.....	47
III.2.4. Détermination du taux de l'holocellulose	48
III.2.5. Détermination du taux de l' α -cellulose.....	49
III.2.6. Détermination du taux de β -cellulose (Hémicellulose)	50
III.2.7. Détermination l'indice de lignine	50
III.2.8. Déterminations de la teneur en sucres par la méthode de Gabriel Bertrand	50
III.2.9. Détermination des teneurs en polyphénols totaux de l'hydrolysat.....	50
III.2.10. Détermination des teneurs en protéines brutes.....	50
III.2.11. Détermination de la teneur en flavonoïde d'hydrolysat.....	52
III.3. Caractérisation physique de la biomasse lignocellulosique	52
III.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	52
III.3.2. Analyse thermique simultanée	52
III.3.3. Analyse par spectroscopie de fluorescence de rayons X (FRX)	53
III.3.4. Diffraction des rayons X (DRX)	53
III.3.5. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	53
III.4. Prétraitement de biomasse lignocellulosique.....	54
III.4.1. Prétraitement thermolyse	54

III.4.2. Trempage dans une solution alcaline.....	54
III.4.3. Prétraitement à l'acide dilué.....	54
III.5. Mode d'extraction des sucres réducteurs	54
III.5.1. Extraction sous reflux par l'acide trifluoroacétique (CF ₃ CO ₂ H)	54
III.5.2. Extraction sous micro-onde par l'acide sulfurique.....	55
III.5.3. Extraction par saccharification (hydrolyse enzymatique).....	55
III.5.3.1. Préparation une solution tampon d'acétate de sodium à un pH = 4	55
III.5.3.2. Technique de Saccharification.....	55
III.6. Détoxification d'hydrolysats de déchets de sarments cardinaux.....	57
III.6.1. Détoxification par saturation à l'aide d'hydroxyde de calcium	57
III.6.2. Détoxification par charbon actif et barbotage à l'azote.....	57
III.7. Procédures analytiques des sucres réducteurs	58
III.7.1. Préparation du réactif DNS (3,5-acide dinitrosalicylique)	58
III.7.2. Dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS	58
III.8. Optimisation des sucres réducteurs par la méthode des plans d'expériences.....	58
III.8.1. Plan de Plackett Burman	59
III.8.2. Plan de Box Behnken.....	60
III.8.3. Plan centrale composite	61
III.9. Analyse statistique des plans d'expériences	62
III.9.1. Validation des modèles mathématiques.....	62
III.10. Procédure analytique pour une fermentation alcoolique	63
III.10.1. Préparation des milieux de cultures solides	63
III.10.1.1. Préparation du milieu de culture Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YEPDA)	63
III.10.1.2. Préparation des milieux de culture.....	63
III.10.2. Revivification et vérification de la pureté des levures.....	64
III.10.2.1. Vérification des levures.....	64
III.10.2.2. Vérification de la pureté des levures.....	65
III.10.2.3. Conservation des levures.....	65
III.11. Production du bioéthanol.....	66
III.11.1. Préparation des mouts de fermentation à partir des hydrolysats détoxifiés pour la production du bioéthanol	66
III.11.1.1. Préparation des hydrolysats détoxifiés issus des traitements physico-chimiques	66
III.11.1.2. Préparation de la biomasse destinée à la saccharification enzymatique	67
III.11.2. Procédés de fermentation	67

III.11.2.1. Production du bioéthanol issue de la saccharification et la fermentation simultanée	67
III.11.2.2. Production de bioéthanol issue de la saccharification et fermentation séparée	68
III.11.2.3. Fermentation des hydrolysats détoxifiés issus des traitements physicochimiques	68
III.11.3. Caractérisation de la concentration du bioéthanol.....	72
Chapitre IV : Résultats et Discussion	73
IV.1. Caractérisation structurelle	73
IV.1.1. Analyse de la taille des particules par granulométrie laser.....	73
IV.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier réflectance totale atténuée	74
IV.1.3. Analyse par diffraction des rayons X (DRX)	75
IV.2. Caractérisation chimique	76
IV.2.1. Analyse de la composition de la biomasse	76
IV.2.2. Spectroscopie de fluorescence des rayons X (FRX)	78
IV.3. Caractérisation thermique.....	79
IV.3.1. Analyse thermique simultanée	79
IV.4. Caractérisation morphologique.....	80
IV.4.1. Analyse de microscopie à balayage (MEB).....	80
IV.5. Extraction des sucres.....	83
IV.6. Plans d'expériences.....	84
IV.6.1. Criblage des facteurs significatifs à l'aide du plan de Plackett-Burman	84
IV.6.2. Optimisation à l'aide du plan de Box Behnken	90
IV.6.3. Plan centrale composite design	90
IV.6.3.1. Résultats du rendement en sucres réducteurs des hydrolysats extrait par micro-ondes	90
IV.6.3.2. Teneur des flavonoïdes totaux et des polyphénols totaux des hydrolysats extraits par micro-onde.....	96
IV.7. Saccharification de la biomasse lignocellulosique	97
IV.8. Fermentation alcoolique	98
IV.8.1. Résultats de la vérification de la pureté des souches de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98
IV.8.1.1. Résultat de l'observation macroscopique	98
IV.8.1.2. Résultat de l'observation microscopique des souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99

IV.8.1.3. Résultat de détermination de la température et pH optimum de la croissance des trois levures de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
IV.8.2. Identification qualitative du bioéthanol.....	100
IV.8.2.1. Les résultats de la fermentation alcoolique par levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>ACTIFLORE</i> ® ROSÉ, <i>ATCC</i> ® 9763 et lyophilisée	100
Conclusion générale	104
Défis et perspectives.....	107
Références	108
Annexes	122

Introduction générale

Introduction générale

Les réchauffements climatiques caractérisés par une augmentation des émissions atmosphériques de gaz à effet de serre, sont d'une importance nationale et mondiale pour la survie de la faune et de la flore, et ont pris une acuité croissante ce qui a attiré l'attention des scientifiques du monde entier, ce qui a permis à l'Algérie d'amorcer une dynamique d'énergie verte et de s'engager sur la voie des énergies renouvelables afin d'apporter des solutions durables, universelles et globales aux défis environnementaux et aux problématiques de préservation des ressources énergétiques d'origine fossile, à travers le lancement d'un programme national carriériste, ambitieux et opportuniste pour le développements des énergies renouvelables qui a été adopté par le gouvernement et placé au rang de priorité nationale en février 2016 à l'horizon 2030 par Monsieur le Président de la république, alors que les ressources pétrolières s'épuisent progressivement et que la demande énergétique augmente, la recherche d'alternatives propres et durables aux combustibles fossiles pour répondre aux besoins des populations tout en maintenant le niveau et la qualité de vie de la population [1,2]. L'efficacité énergétique actualisée vise à réaliser des économies d'énergies à l'horizon 2030 en basant sur la norme iso 50001 de l'ordre de 63 millions de tonne équivalent pétrole [2], pour l'ensemble des secteurs (bâtiments, éclairage publique, transport, industries). L'objectif est de lutter contre le dérèglement climatique en réduisant les émissions de CO₂ de 193 millions de tonnes.

Le bioéthanol est un biocarburant qui peut être produit à partir de différentes biomasses lignocellulosiques, notamment les déchets des sarments de la vigne, et la paille de blé, toutes considérées comme des déchets agro-industriels ce que lui a donné la clé pour s'imposer comme le premier biocarburant mondial [3,4]. Les biocarburants sont bénéfiques, même si leur utilisation est limitée [5]. L'optimisation des bioraffineries peut donc clairement réduire la dépendance aux carburants à base de pétrole de manière durable. En ce sens, le bioéthanol pourrait devenir une alternative durable aux combustibles fossiles ce qui a permis aux marchés du bioéthanol de continuer à croître rapidement et facilement ces dernières années. Les principaux pays producteurs de biocarburant dans le monde en 2022 sont les suivants : les États-Unis 58,3 milliards de litres par jour, Brésil 28,09 milliards de litres par jour, Union Européenne (France, Allemagne, Pays-Bas) 5,03 milliards de litres par jour, L'Inde 4,13 milliards de litres par jour, la Chine 3,48 milliards de litres par jour, le Canada 1,74 milliards de litres par jour, Thaïlande 1,44 milliards de litres par jour, Argentine 1,1 milliards de barils

par jour, le reste du monde 3,29 milliards de litres par jour, ces pays sont les leaders mondiaux de la production annuelle de bioéthanol en 2022 [6–8].

La bioénergie est actuellement la plus grande source d'énergie renouvelable disponible car elle fournit de l'énergie de base sous forme de chaleur, d'électricité et de carburant pour le transport. Cependant, elle représente moins de 10 % de la production mondiale d'électricité et moins de 3% du carburant de transport. Une partie de la difficulté à promouvoir l'utilisation de la bioénergie réside dans les chaînes d'approvisionnement complexes qui dépendent de nombreux secteurs de l'économie [9]. Au cours de la dernière décennie, la biomasse lignocellulosique a fait l'objet d'un débat de plus en plus vif en raison de ses divers usages : denrées alimentaires, aliments pour les herbivores, les biocarburants destinés à l'énergie, chauffage ou la climatisation ; ainsi que les produits de bioraffineries remplaçant les produits pétroliers. Selon l'utilisation qui en est faite, les ressources en biomasse dans le monde peuvent être finies ou semi-finies. Les zones forestières et agricoles exploitées commercialement sont des zones où la biomasse peut être utilisée quel que soit son usage, cependant lors de la récolte de la biomasse, il est pré-mondialement de prendre en compte les questions de conservation de la nature, de penser à la future génération et de préserver la terre. L'avenir de l'utilisation de la biomasse a fait l'objet de recherches et de discussions au cours des dernières décennies, et le potentiel mondial de la biomasse pour les secteurs énergétiques révèle une fourchette de 169 à 530 EJ (BTU) [10].

La biomasse lignocellulosique est une matière première prometteuse pour l'avenir des biocarburants renouvelable de deuxième génération. En effet, il représente un substrat abondant, disponible et renouvelable pour la production de bioéthanol qui ne concurrence pas l'alimentation animale ou humaine. La matière lignocellulosique est principalement constituée d'un mélange de polymères linéaires non ramifiés d'hydrates de carbones et de glucose, c'est-à-dire la cellulose on l'appelle aussi alpha cellulose. L'autre composant principal est l'hémicellulose, qui appartient au groupe des polysaccharides hétérogènes, et de la lignine c'est une molécule complexe avec des unités de phénylpropanoïques dans une structure tridimensionnelle. La matière végétale lignocellulosique contient également des protéines et des composés extractibles, mais en faibles quantités (5% à 10 % au max 15 %). L'extrait contient de nombreux composants lipophiles et hydrophiles. Cependant, la structure régulière et complexe de cette biomasse signifie que la conversion de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol nécessite de nombreuses étapes, telles que le prétraitement, hydrolyse enzymatique, acide ou basique, et la fermentation, sans parler du temps et du coût

sous-jacents, en particulier l'hydrolyse enzymatique et la fermentation. La méthodologie de surface de réponse a permis d'optimiser les étapes de production du bioéthanol en vue d'obtenir un processus économique et améliorer son efficacité et stimulé la recherche de technologies plus durables, notamment la production de bioéthanol à partir de la biomasse lignocellulosique. Les ressources de la biomasse, du point de vue de la bioconversion, comprennent principalement des substances de stockage de l'énergie (par exemple l'amidon, la graisse, etc.) ainsi que les principaux composants des parois cellulaires des plantes, tels que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Les protéines, l'amidon et la graisse ont été largement utilisés de manière efficace et ont fait l'objet de nombreuses études rapportées dans la littérature.

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse portent sur la proposition de la méthodologie de la faisabilité d'une bioraffinerie à base des déchets de sarments de la vigne récoltés dans la région de Boumerdes comme une source alternative aux énergies fossiles à caractère lignocellulosique dans le cadre des politiques nationales et mondiales associées à la transition énergétique.

Cette thèse vise à développer un procédé de production d'un biocarburant de deuxième génération à base d'une biomasse lignocellulosique pour le secteur automobiles, secteur agricole (motopompe, générateur électrique) ou comme des molécules à grande valeur ajoutée pour les industries pharmaceutiques, les industries de peintures, les parfumeries et les industries chimiques en générale

Ce manuscrit est structuré en quatre chapitres :

Le chapitre I est une étude bibliographique consacrée dans un premier temps à la mise en contexte de ce travail dans le cadre du dérèglement climatique, l'économie d'énergie, la transition énergétique aux énergies renouvelables dans le mondial, la conception des bioraffineries au sens large avant de se recentrer sur les types et la production des biocarburants ainsi que leurs étapes de production (une partie hydrolyse, une deuxième sur les fermentation alcoolique, et finalement une dernière sur la distillation) ; Dans tous les cas, une analyse des différents paramètres influençant significativement chacune des étapes est détaillée.

Le chapitre II donne un aperçu sur la biomasse lignocellulosique utilisées dans cette étude pour la production du bioéthanol. Les plans de criblages et optimisations expérimentaux

Introduction générale

pour la conduite des expériences d'hydrolyse et de fermentation, ainsi que l'ensemble des techniques de prétraitement de la biomasse utilisés y sont décrites en détails.

Le chapitre III concerne le matériel et les méthodes expérimentales utilisées dans cette étude. Les dispositifs expérimentaux notamment le prétraitement, d'hydrolyse chimique et enzymatique et en fin, la fermentation alcoolique et la production de bioéthanol.

Le chapitre IV est consacré à donnés les interprétations et les résultats de la faisabilité de production du bioéthanol à partir des sarments de la vigne de variété de cardinale.

Enfin, les défis et perspectives ainsi qu'une conclusion générale faisant la synthèse de l'ensemble des résultats, expérimentaux et numériques qui contribue originalement à tous les travaux de recherche.

Chapitre I
Généralités sur les
biocarburants

Chapitre I : Généralités sur les biocarburants

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps contextualiser ce travail dans le cadre du dérèglement climatique, l'économie d'énergie, la transition énergétique aux énergies renouvelables, ensuite nous exposons succinctement l'utilisation des énergies dans le secteur de transport ainsi que dans le secteur énergétique, dans son ensemble, ainsi que le concept des bioraffineries et leurs produits tels que les biocarburants. Pour terminer, nous examinerons les travaux de la littérature sur le prétraitement de la biomasse lignocellulosique en général et les inhibiteurs de la fermentation alcoolique.

Le défi crucial des technologies de production de bioéthanol réside dans le processus de bioconversion fermentaire. Néanmoins, la biomasse lignocellulosique classée comme une biomasse de deuxième génération a été projetée comme une ressource énergétique alternative prometteuse pour la production de bioéthanol en raison de sa teneur élevée en polysaccharides et de sa faible composition en lignine.

La croissance phénoménale de l'industrialisation, de la modernisation des modes de vie et de la population motorisée dans le monde entier a entraîné une augmentation substantielle de la demande d'énergie. Actuellement, les combustibles fossiles satisfont environ 80 % de la demande énergétique mondiale, le pétrole représentant 33 % de l'approvisionnement énergétique total. Parallèlement, compte tenu de la fluctuation des prix du pétrole brut et des préoccupations environnementales croissantes liées à l'utilisation des combustibles fossiles, la demande des biocarburants augmente progressivement dans le monde entier

I.1. Dérèglement climatique, l'économie d'énergie, la transition énergétique aux énergies renouvelables

À l'échelle mondiale, on assiste à une évolution vers l'utilisation de sources d'énergie renouvelables afin d'atténuer les crises environnementales résultant du changement climatique, en pratique, les stratégies d'atténuation visant à réduire les émissions de gaz à effet de serre peuvent consister à mettre en œuvre des nouvelles technologies et des nouvelles sources d'énergies, à adopter des pratiques plus efficaces pour accroître l'efficacité énergétique globale ou à modifier le comportement des consommateurs [11]. Le remplacement des énergies conventionnelles par des énergies renouvelables est un élément essentiel de l'atténuation du changement climatique, et les problèmes mondiaux les plus urgents pour la société [12]. Bien que le changement climatique se produise naturellement, les événements anthropogéniques l'ont accéléré. Par exemple, les températures mondiales ont augmenté deux fois plus rapidement au cours des 50 dernières années qu'au cours des 100 années précédentes [13]. Il a été exigé que la température moyenne mondiale ne dépasse pas 2 °C par rapport à l'ère préindustrielle, et l'objectif c'est de limiter l'augmentation de la température à 1,5 °C a également été fixé par (CCNUCC, 12 décembre 2015 à paris) pour atténuer et répondre aux risques potentiels liés au changement climatique avec effet d'ici 2030 [14]. Malgré les convention et les exigences qui ont faites par les nations unies, on constate une élévation du niveau de la mer et des températures atmosphériques, Il a été prouvé que les effets du réchauffement planétaire sur le changement climatique sont importants et on s'attend à ce qu'ils s'aggravent au cours des prochaines décennies, une augmentation des surfaces recouvertes par les eaux, ainsi qu'à une diminution du pH des océans et des régimes de précipitations, ces incidents cités au-dessus et celle-ci tels que les incendies de forêt, les cyclones, les inondations, les sécheresses, l'élévation du niveau de la mer, le blanchiment des coraux ou les variations de la couverture de glace polaire, n'ont pas de lien direct avec l'énergie [15]. Ils sont tous le résultat de variations de température. Les carburants issus des raffineries pétrolières sont considérés comme l'un des principaux responsables de l'augmentation du dioxyde de carbone (CO₂) dans l'atmosphère terrestre et, comme le dioxyde de carbone est un gaz à effet de serre qui contribue à maintenir la planète au chaud, l'utilisation croissante de ses carburants dans le secteurs de transport est accusée d'être l'une des principales causes de l'augmentation des températures mondiales depuis le début de l'ère industrielle, la question du changement climatique fait l'objet d'un débat permanent [16]. L'émission de gaz à effet de serre est à l'origine du changement climatique.

Ces gaz comprennent le CO₂, le CH₄, le NO et le NO₂, ainsi qu'une petite quantité de vapeur d'eau. L'effet de serre est un effet de réchauffement responsable de l'augmentation de la température moyenne de l'atmosphère [17]. Pour atteindre le niveau souhaité de réduction des émissions, tous les modes de transport devront réduire leurs émissions dans toutes les régions du monde. De nombreux chercheurs ont prouvé que les impacts du changement climatique varient d'un pays à l'autre et ne peuvent pas être quantifiés de la même manière [18]. Le problème le plus sensible conséquent de ce gaz c'est le niveau de la mer qui peut augmenter à mesure que les glaciers fondent, les températures peuvent augmenter à mesure que la planète se réchauffe et les océans peuvent devenir plus acides en raison de l'augmentation de la teneur en dioxyde de carbone dissous. Ces changements peuvent avoir d'importantes répercussions sur la conservation, du niveau de l'organisme humain à celui de l'écosystème. Par exemple, la propagation des espèces envahissantes devrait augmenter avec la disponibilité d'un habitat convenable. Parmi les pratiques d'économie circulaire contribuent à réduire la consommation, c'est la mise en œuvre de la politique zéro déchet et utilisations des énergies renouvelables plus clairement c'est utilisations des bioénergies dans le secteur de transport et industrielles [19]. Le secteur de l'énergie a contribué à lui seul à 73,2 % des 49,4 milliards de tonnes de CO₂ et d'émissions de gaz à effet de serre et cela selon l'EIA, L'émission de dioxyde de carbone (CO₂) dans l'atmosphère contribue à l'aggravation de la catastrophe climatique dans le monde entier [20]. Aujourd'hui, ce problème est devenu l'une des menaces les plus graves pour l'humanité, causant de nombreux problèmes économiques et imposant des changements sociaux [21]. La consommation d'énergie devrait augmenter d'environ 50 % entre 2018 et 2050, en raison de l'accroissement de la population et des activités économiques. Alors que les principales interventions en matière d'énergies renouvelables peuvent être observées dans le bâtiment et l'industrie (deux des principaux contributeurs d'émissions de gaz à effet de serre et la quantité des émissions de CO₂ par le biais de la consommation d'énergie, les transports continuent de dépendre fortement des combustibles fossiles (96,7 %). Avec la projection de l'épuisement de tout le pétrole restant d'ici 2067, l'incorporation de carburants alternatifs devient de plus en plus nécessaire.

I.2. Conception des bioraffineries

Le concept d'une bioraffinerie fait l'objet de nombreuses définitions dans la littérature, qui indiquent que la durabilité, l'intégration des processus et la conversion de toutes les fractions

de la biomasse en produits commerciaux à grande valeur ajoutée sont des éléments clés de son développement [22]. Selon la définition du laboratoire national des énergies renouvelable (NREL), une bioraffinerie est un système intégré qui convertit la biomasse en une variété de produits tels que l'électricité, le carburant, les aliments pour animaux, les produits chimiques [23–25]. Par conséquent, une bioraffinerie tente de maximiser la conversion de l'énergie potentielle des différents flux et déchets de la biomasse en produits et formes d'énergie ayant la plus grande valeur ajoutée. La bioraffinerie produit des carburants, des solvants, des plastiques et des aliments pour les êtres humains. Dans certains pays, ces produits de bio-raffinage sont fabriqués à partir de déchets de biomasse. Les principaux processus de la bioraffinerie sont la fermentation de l'éthanol et la fermentation de l'acide lactique [26]. Pour le bio-raffinage, de nombreuses technologies hybrides ont été développées dans différents domaines, tels que la bio-ingénierie, la chimie des polymères, la science alimentaire et l'agriculture [27]. Le concept de bioraffinerie est analogue à celui d'une raffinerie de pétrole traditionnelle avec le fractionnement de la biomasse en une gamme de produits tels que des composants chimiques, des biomatériaux ou des biocarburants. Le terme "bioraffinerie" ou "bioraffinerie verte" est largement utilisé. Il est parfois difficile d'établir une distinction entre les industries utilisant un bioprocédé et une usine de bio-raffinage en tant que telle [28]. La biomasse lignocellulosique contient trois bio-macromolécules potentielles qui peuvent être converties en une large gamme de produits biotechnologiques utiles, ce qui en fait une source d'énergie riche pour le bio-raffinage. La biomasse destinée aux bioraffineries ou au soutien d'une bioéconomie plus large peut provenir de différentes sources. Actuellement, la biomasse forestière ou ligneuse constitue la plus grande contribution à la production de bioénergie, mais les potentiels d'approvisionnement futurs incluent la production dédiée de biomasse pour l'énergie ou les bioraffineries et une utilisation accrue des résidus agricoles ou forestiers. D'ici 2050, un potentiel technique de résidus agricoles compris entre 10 et 66 EJ a été identifié, ce qui constitue une ressource importante. Les résidus de transformation et les déchets alimentaires constituent également une ressource de biomasse importante, chacun ayant un potentiel compris entre 5 et 50 EJ par an d'ici à 2050. La biomasse des résidus, qu'elle provienne des champs ou de la transformation des produits agricoles, est peu coûteuse par rapport à d'autres ressources de biomasse. Toutefois, en raison de sa faible densité énergétique et de la dispersion géographique de sa production, le transport sur de longues distances est d'un coût prohibitif, ce qui pourrait empêcher la mise en œuvre à grande échelle du concept de

bioraffinerie. Le développement de la densification et de l'uniformisation des caractéristiques des matériaux peut réduire les coûts et les risques dans la chaîne d'approvisionnement [29].

La conversion dans une bioraffinerie de biomasse lignocellulosique peut se faire par voie chimique, thermochimique et biochimique [30]. Il est suggéré que l'efficacité du processus de bio-raffinage basé sur les biomasses lignocellulosiques serait grandement améliorée si la plateforme de culture des micro-organismes oléagineux ou d'autre pouvait intégrer à la fois des micromanipulations pour l'expression des gènes et des stratégies de fermentation avec le système de contrôle et de rétroaction en ligne [31]. La fermentation de l'éthanol par la levure a été étudiée très tôt et son mécanisme de fermentation est clair. Le glucose est converti en pyruvate par la levure dans la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), et le pyruvate est obtenu par la catalyse de la pyruvate décarboxylase pour former de l'acétaldéhyde, qui est transformé en éthanol à l'aide de l'alcool déshydrogénase [32]. L'orientation des bioraffineries s'est modifiée, passant de bioraffineries axées sur l'énergie à des installations polyvalentes coproduisant de l'énergie et des produits chimiques [33]. La conception d'une bioraffinerie, ses matières premières, l'enchaînement de son procédés et ses produits à une grande valeur ajoutée est résumée en figure I.1 [25].

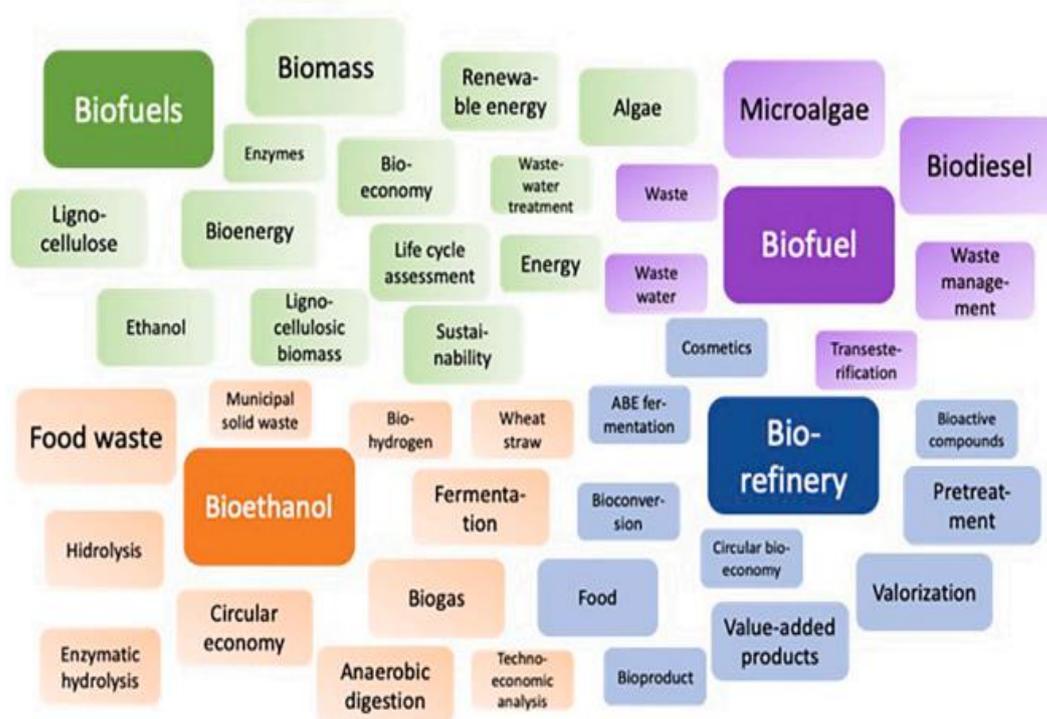


Figure I.1: Conception d'une bioraffinerie, ses produits, matières premières, procédés [25]

I.3. Production de bioéthanol

Le bioéthanol a un potentiel étonnant pour remplacer les carburants conventionnels à base de pétrole et une des alternatives prometteuses, qui est obtenu à partir de différentes matières premières de biomasse. La production de bioéthanol à partir de la biomasse est une technologie bien établie. Son processus de production de bioéthanol varie considérablement en fonction de la matière première utilisée, mais certaines des principales étapes du processus restent les mêmes, même si elles se déroulent dans des conditions de température et de pression différentes, et impliquent parfois différents micro-organismes. Les principales sources de bioéthanol sont les matières premières lignocellulosiques et les microalgues [34]. La production de bioéthanol en tant que carburant à partir de la biomasse lignocellulosique permet non seulement de soulager la demande en combustible fossile, mais aussi de diminuer les émissions de gaz à effet de serre, notamment en rendant l'énergie renouvelable. La conversion très efficace de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol autant que carburant comprend généralement quatre grandes étapes : le prétraitement pour briser la structure lignocellulosique, l'extraction chimique ou biologique pour produire des sucres fermentables, la fermentation à l'aide du *saccharomyce cerevisiae* et une distillation [35]. Le bioéthanol est inflammable, volatil et incolore, comme les autres alcools. Il a une odeur caractéristique. Le bioéthanol a des propriétés psychoactives. D'autres types d'alcool ont également de telles propriétés, mais l'alcool éthylique est nettement moins toxique pour l'homme que le méthanol ou l'isopropanol, souvent appelé par abus alcool de forme chimique $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, peut être produit par synthèse chimique à partir d'hydrocarbures, ou par fermentation à partir d'une biomasse, dans ce dernier cas on le nomme parfois bioéthanol ou agro-éthanol bien qu'il n'existe aucune différence de propriétés entre l'éthanol produit par voie chimique et celui par voie fermentaire des différents sucres, amidons, cellulose, etc. L'éthanol est également appelé alcool éthylique ou alcool de grain [36]. Le bioéthanol peut être utilisé comme matière première polyvalente dans diverses industries, telles que l'industrie pharmaceutique, l'industrie cosmétique, l'industrie chimique (comme composé de départ dans la synthèse de divers produits) et c'est un excellent solvant, antigel et désinfectant. Néanmoins, le bioéthanol est surtout utilisé dans le secteur des transports comme constituant du mélange avec l'essence ou comme octane. Le bioéthanol est mélangé à l'essence dans des proportions de 5, 10 et 85%. Un total de 85 % de bioéthanol en volume ne peut être utilisé que dans des véhicules à carburant flexible, tandis que les mélanges de 5 et 10% en volume peuvent être utilisés sans aucune modification du moteur [37]. Le

bioéthanol a un indice d'octane élevé (106-114) [38]. Une teneur en oxygène plus élevée (34,7%) [39] (Tableau I.1). Un point d'ébullition bas par rapport à l'essence. En outre, sa chaleur de vaporisation est plus élevée (840 kJ/kg) que celle de l'essence (305 kJ/kg), ce qui garantit un meilleur rendement volumétrique du mélange d'éthanol que de l'essence pure et, par conséquent, une puissance relativement élevée [40]. Le bioéthanol est considéré comme respectueux de l'environnement car son indice d'octane élevé empêche le cliquetis du moteur et facilite l'allumage précoce [41].

La production des produits chimiques et des biocarburants à valeur commerciale à l'aide de procédés à base de la biomasse lignocellulosique a le potentiel de réduire les émissions de gaz à effet de serre, d'apporter des avantages aux économies rurales et de promouvoir la sécurité énergétique. En 2020, le marché mondial du bioéthanol a atteint 38 milliards et devrait atteindre 76 milliards de dollars en 2026 [42]. Le tableau I.1 représente les propriétés physico-chimiques de l'essence et le bioéthanol [49].

Tableau I.1 : Propriétés physico-chimiques de l'essence et de bioéthanol [49]

Propriétés	Essence	Bioéthanol
• Formule	C ₄ a C ₁₂	C ₂ H ₅ OH
• Poids moléculaire	100–105	46,07
• Densité à 15 °C (kg/L)	0,69–0,79	0,79
• Densité (densité relative) à 15°C	91	106–110
• Point de congélation (°C)	- 40	- 114
• Point d'ébullition (°C)	27–225	78
• Pression de vapeur à 38 °C (kPa)	48–103	15,9
• Chaleur spécifique (kJ/kg/K)	2,0	2,4
• Viscosité à 20 °C (mPa.s)	0,37–0,44	1,19
• Pouvoir calorifique inférieur (kJ/L)	30–33	21,1
• Point d'éclair (°C)	- 43	13
• Température d'auto-inflammation (°C)	257	423
• Limite inférieure d'inflammabilité (%vol)	1,4	4,3
• Limite supérieure d'inflammabilité (%vol)	7,6	19,0
• Rapport stœchiométrique air-carburant	14,7	9,0
• Indice d'octane de recherche	88–100	108,6
• Indice d'octane moteur	80–90	89,7

I.4. Biocarburant

Aujourd'hui, les biocarburants semblent être la meilleure alternative aux combustibles fossiles. Actuellement, 1,5 % du carburant utilisé dans les transports mondiaux est fourni par les biocarburants, qui sont légers, économiques et respectueux de l'environnement. En outre, la majeure partie du CO₂ libéré lors de la formation des biocarburants est utilisée par la biomasse pour sa croissance, ce qui réduit les émissions de gaz à effet de serre par rapport aux combustibles fossiles. Les biocarburants peuvent être utilisés efficacement pour produire de l'énergie thermique à l'aide de diverses technologies [43]. Le terme biocarburant est dérivé des matières premières, qui sont essentiellement divers types de biomasse, ses matières premières de la biomasse peuvent être soit des matières premières végétales telles que les cultures sucrières/féculières, les cultures oléagineuses et les graisses animales, soit des biomasses lignocellulosiques, y compris les déchets forestiers et les déchets agricoles. Récemment, les algues sont apparues comme une autre biomasse prometteuse capable de produire des biocarburants [44].

I.4.1. Biocarburants de première génération (1G)

Un biocarburant de première génération est un agro-carburant produit à partir de cultures destinées traditionnellement à l'alimentation, plus spécifiquement les organes de réserves des plantes oléifères ou encore à saccharides [45]. Ils sont aussi des biocarburants produits principalement à partir de cultures vivrières, telles que les céréales, la canne à sucre et les tubercules [46]. Ces biocarburants sont caractérisés par une commercialisation à grande échelle et par des technologies assimilées et des procédés de production relativement simples. L'analyse de la littérature que biocarburant de première génération le plus répandu est l'éthanol, dont la production est largement dominée par le Brésil et les Etats-Unis. Il est obtenu par fermentation par des levures de sucres simples issus des plantes (canne à sucre et betterave), ou de l'amidon issu des céréales (maïs et blé) [47,48]. Il peut être mélangé directement à l'essence à des teneurs allant de 5 à 26% ou à des taux encore plus élevés pour les véhicules dits flexibles introduits avec succès au Brésil. Elle indique aussi que le bioéthanol est principalement produit à partir de la canne à sucre au Brésil et du maïs au États-Unis, suivis du blé au Canada, de la betterave sucrière et du sorgho au pays de l'Union Européenne et de riz en Chine. En raison de son meilleur rendement en éthanol, le maïs représente 67 % de l'offre mondiale de bioéthanol [49]. Cependant, en termes de production de biomasse végétale dédiée à la production de biocarburant de première génération, la canne

à sucre reste le plus grand contributeur à la production de bioéthanol et le plus petit consommateur d'eau (irrigations) par rapport au maïs et au blé. Globalement, les États-Unis produisent 40 milliards de litres de bioéthanol à partir de maïs et de blé, tandis que le Brésil produit 25 milliards de litres à partir de canne à sucre, la Chine 3 milliards de litres à partir de maïs, cassave et le riz, le Canada 2 milliards de litres à partir de maïs de blé et l'Inde 1 milliard de litres à partir de canne à sucre et molasse, La France 1 milliard de litres de blé, sucre et betterave sucrière, l'Allemagne 750 millions de litres de blé, sucre et betterave sucrière et l'Australie 500 millions de litres de canne à sucre sont les autres pays produisant une quantité significative de bioéthanol [50]. Ceci s'explique par le fait que l'utilisation de différentes ressources telles que l'eau, la terre et l'équivalent alimentaire sont des facteurs majeurs qui déterminent le type de culture de bioéthanol produit par un pays. Les matières premières 1G ayant été une source majeure de production de bioéthanol, il est vital d'étudier quelques détails sur ces matières premières sucrées et amylacées [51,52]. Malgré les succès enregistrés au niveau mondial dans la commercialisation de la production de bioéthanol 1G la production de bioéthanol est toujours confrontée à certaines contraintes, telles que le débat entre alimentation et carburant (utilisation de terres adaptées à la production alimentaire pour la production de cultures bioénergétiques ; le sucre est également considéré comme un aliment pour l'homme), le coût élevé des matières premières, l'impact élevé sur l'environnement, à l'exception du bioéthanol de canne à sucre, l'impact négatif sur la biodiversité et la concurrence avec les ressources en eau limitées dans certaines régions [53]. Les limitations des biocarburants de première génération ont été identifiées à l'exception de l'éthanol produit à partir de la canne à sucre. Les recherches ont mis l'accent sur la nécessité de trouver de nouvelles ressources énergétiques renouvelables extraites de la biomasse, d'où un nouveau type de produit, en l'occurrence le biocarburant de deuxième génération. Ces contraintes ont stimulé la recherche intensive sur la production de bioéthanol à partir de matières premières alternatives telles que la biomasse lignocellulosique, également connue sous le nom de production de bioéthanol 2G [54]. La production de bioéthanol de deuxième génération génère un sous-produit riche en carbone organique, caractérisé par une plus grande quantité de carbone organique non hydrolysable que la matière première d'origine [55].

I.4.2. Biocarburants de deuxième génération (2G)

Les biomasses de la première génération n'étant pas pratiques, les scientifiques se sont concentrés sur les biocarburants de deuxième génération (2G) qui proviennent de différents éléments non alimentaires tels que la biomasse cellulosique, les parties non comestibles des plantes, la paille, le fumier, l'huile de cuisson usagée, le bois et la sciure de bois. Néanmoins, la production de biocarburants à partir de sources de biomasse (2G) n'est pas rentable sur le plan industriel, car la procédure de production nécessite des innovations coûteuses et modernes [56]. Les biocarburants de deuxième génération sont caractérisés comme des carburants créés à partir d'un large éventail de matières premières, en particulier mais pas limité à la biomasse lignocellulosique non comestible. La biomasse utilisée pour la création de biocarburants de deuxième génération est généralement isolée en trois classes principales : homogène, tel que, le bois blanc; quasi homogène, tel que, les accumulations agricoles et de sous-bois; et non homogènes, y compris les matières premières de faible valeur [57]. Le 14 juin 2008, les négociateurs de la Commission européenne, du Parlement européen et du Conseil européen sont parvenus à un accord sur la proposition des directives révisées sur les énergies renouvelables, qui fixe de nouveaux objectifs pour les énergies renouvelables dans l'union européenne. La proposition de directive stipule qu'au moins 14 % des carburants utilisés dans les transports doivent provenir de sources renouvelables d'ici à 2030, mais que seuls 7 % peuvent provenir de biocarburants (1G). La part des biocarburants (2G) et du biogaz doit être d'au moins 1 % en 2025 et d'au moins 3,5 % en 2030 [58]. Les sous-produits de l'industrie forestière et les résidus de récolte sont considérés comme des matières premières durables pour la production de biocarburants et constituent donc des matières premières viables pour la production de biocarburants (2G) [59]. Les biocarburants 2G diffèrent en termes de propriétés, de coûts de production, de performances environnementales et d'accessibilité. En outre, le même biocarburant peut varier considérablement en termes de performance et de coût en fonction des caractéristiques des processus de production de biocarburants, par exemple la taille de l'usine, les technologies, et le délai d'investissement. Outre la disparité des processus de bio raffinage et des propriétés des carburants, les estimations technico-économiques des coûts de production des biocarburants (2G) tendent à différer considérablement en raison de différences méthodologiques (par exemple, les taux d'intérêt supposés, les hypothèses sur les limites du système, etc) [60].

I.4.2. Biocarburants de troisième génération (3G)

L'adoption industrielle de la technologie des biocarburants à base des algues a toujours été entravée par sa viabilité économique [61]. Les algues sont considérées comme une matière première potentielle pour la production de bioéthanol de troisième génération, car la biomasse peut être convertie directement en énergie. Généralement, l'utilisation de cette matière première pour la production de bioéthanol dépend des facteurs tels que la technologie et l'environnement marin [62]. Les algues font partie d'un vaste groupe d'organismes photosynthétiques. La classification des algues fait encore l'objet de controverses, notamment en ce qui concerne le statut des cyanobactéries [63]. Les algues représentent un vaste groupe d'organismes photosynthétiques composés de différentes espèces. D'un point de vue morphologique, les algues sont classées en microalgues ou "algues marines" (jusqu'à 60 m de long) et en microalgues (d'une taille de 2 à 200 μm). Parmi elles, les microalgues sont plus convaincantes que les plantes terrestres en raison de leur temps de génération court, de leur taux de croissance plus élevé et de leur grande capacité d'acclimatation pour se développer dans des sources d'eau non potable comme les eaux usées, l'eau de mer [64]. La biomasse des microalgues est considérée comme une matière première importante pour la production de biocarburants et d'autres composés bioactifs, une croissance plus rapide, de la production élevée de biomasse et de l'accumulation importante de biomolécules par rapport aux matières premières de première et de deuxième génération [65]. Une source qui peut potentiellement être utilisée comme matière première pour la production de bioéthanol [66]. Les microalgues constituent une source d'énergie alternative viable pour remplacer ou compléter les combustibles fossiles en tenant compte des inconvénients liés aux biocarburants de première et de deuxième génération. Le bioéthanol produit à partir de microalgues n'entre pas en concurrence avec les besoins alimentaires. En outre, la biomasse de troisième génération peut être cultivée dans des environnements aquatiques et a besoin d'une grande quantité de CO_2 . Les cellules de microalgues peuvent être cultivées avec des exigences de croissance simples (nutriments, CO_2 et lumière) tout en présentant des propriétés de croissance rapide et une efficacité élevée de fixation du CO_2 par rapport aux plantes terrestres [67]. Les microalgues *Chlorella* sont l'une des microalgues qui peuvent potentiellement être utilisées comme substrat dans la production d'éthanol en raison de leur teneur élevée en hydrates de carbone. Cependant, les hydrates de carbone contenus dans les microalgues ne peuvent pas être directement fermentés en éthanol et doivent d'abord être hydrolysés en glucose [68].

I.4.3. Biocarburants de quatrièmes générations (4G)

Les matières premières des biocarburants de quatrième génération proviennent de microalgues, macroalgues et des cyanobactéries génétiquement modifiées [69]. Les cyanobactéries sont des procaryotes (dépourvues d'organites membranaires, elles appartiennent au règne des bactéries). Tandis que les microalgues et les macroalgues sont des eucaryotes (contenant un noyau entouré d'une membrane, appartenant au règne des protistes). Ces biocarburants de quatrième génération génétiquement modifiées peuvent être cultivées dans un système fermé ou ouvert, connu par le milieu confiné et non confiné. De préférence d'utilisation des systèmes fermé mieux celle qui sont ouvert, car il permet de protéger le système de culture de l'environnement extérieur donc des conditions plus étroitement contrôlées, et de réduire sa contamination. Cependant, utilisation de système fermé nécessite un coût d'exploitation plus élevé, malgré une meilleure protection mais les dépenses en capital très élevées, ce qui le rend moins rentable. Alors que le système ouvert est exposé aux fuites, à l'interférence des animaux et à la dispersion d'aérosols. Ce qui peut permettre aux microalgues de s'échapper ou d'être lessivées dans l'environnement [70]. L'intérêt de cette modification c'est d'augmenter l'absorption de CO₂ pour la photosynthèse, créant ainsi qu'un puit de carbone artificiel et améliorant la production de biocarburants, de nombreuses souches d'algues tel que Eustigmatophyceae, Chlorophyceae Bacillariophyceae, Blue-green algae, Chlamydomonas reinhardtii sp., Phaeodactylum tricornutum sp., et Thalassiosira pseudonana sp, ont été génétiquement modifiées pour augmenter le taux de croissance et l'adaptabilité à la croissance dans des environnements pauvres en nutriments. Les avantages environnementaux des microalgues génétiquement modifiées sont la séquestration et l'assimilation du CO₂, le traitement des eaux usées et la réduction des gaz à effet de serre. Le biocarburant de quatrième génération s'efforce également d'avoir l'impact environnemental le plus faible par rapport aux autres générations, bien que les études n'en soient encore qu'à ses débuts. Les problèmes environnementaux potentiels comprennent : les changements dans l'environnement naturel, la toxicité, le transfert horizontal de gènes et la compétition avec les espèces indigènes (natif), Ce qui nécessite une évaluation rigoureuse des risques associés et une gestion adéquate des incidences sur l'environnement, Par exemple, les dinoflagellés peuvent produire naturellement des composés toxiques qui sont la principale cause de l'eutrophisation et de la décoloration des surfaces marines. Les cas d'eutrophisation se sont multipliés dans le monde entier depuis 40 ans [71]. Les biocarburants de quatrième génération (4G) ont été jugés compatibles avec les moteurs, les

systèmes de stockage et les installations de transport. Grâce aux progrès de la biologie synthétique et des outils de génie génétique, des avancées considérables ont été réalisées dans la production de biocarburants de quatrième générations, notamment des alcools à haute teneur en carbone, des hydrocarbures à longue chaîne, des biocarburants à base de terpénoïdes, des biocarburants dérivés d'acides gras, à l'aide d'*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* et *Zymomonas mobilis* comme microorganismes comme usines cellulaires microbiennes [72].

I.5. Hydrolyse

Le processus d'hydrolyse sépare la longue chaîne d'hydrates de carbone (polysaccharides) de la cellulose ou de l'amidon par l'ajout d'une molécule d'eau et est généralement catalysé par une enzyme ou un acide. Cette étape est critique dans la production de bioéthanol car la qualité de l'hydrolysate affectera le processus de fermentation ultérieur, qui est interconnecté à la qualité de l'éthanol en tant que produit final. Le processus d'hydrolyse est nécessaire car les micro-organismes (qui sont employés dans le processus ultérieur de fermentation) ne sont capables de digérer que les formes de sucre les plus simples (monosaccharides) dérivées des hydrates de carbone complexes de la biomasse lignocellulosique [73]. L'hydrolyse enzymatique est connue pour ses difficultés économiques dues au coût élevé des enzymes et est considérée comme peu pratique à des fins commerciales. Cependant, par rapport à l'hydrolyse acide, les enzymes fonctionnent dans un environnement doux, ce qui réduit les coûts d'entretien de l'équipement et de leurs maintenances quelques soit curatifs ou préventifs et engendre un temps d'arrêt en plus. En outre, le système d'élimination de l'hydrolyse acide est essentiel et nécessite des coûts supplémentaires à prendre en compte. Un autre problème majeur est la capacité de l'acide à dégrader progressivement les monomères de sucre une fois qu'ils sont formés dans un environnement acide hostile à haute température [74].

I.6. Fermentation

La fermentation est traditionnellement effectuée par *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* et certains microbes génétiquement modifiés. Toutefois, les problèmes posés par ces micro-organismes sont le coût élevé de la conversion de la biomasse en sucres, l'incapacité à fermenter les pentoses et une tolérance moindre à une concentration élevée de sucre. En outre, de nombreux micro-organismes génétiquement modifiés sont très instables par nature.

2. Réaction d'oxydo-réduction catalysée par l'alcool déshydrogénase utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide NAD^+/NADH comme coenzyme. La cellule utilise d'abord le NAD^+ comme accepteur intermédiaire d'électrons qui est réduit en NADH .



Bilan de la dégradation du glucose en éthanol :



Le bilan en NAD^+/NADH étant nul, ces coenzymes n'apparaissent pas dans l'équation globale de la transformation du glucose en éthanol. Le rendement théorique limite (YP/S) de conversion de glucose en éthanol est de 0,511 gramme d'éthanol par gramme de glucose. Ce rendement ne tient pas compte du fait qu'une partie du glucose est transformée en biomasse (moins de 0,1 g/g environ) et en coproduits. Ainsi le rendement réel correspond à 80-90 % du rendement théorique limite, les rendements obtenus expérimentalement sont en général moins élevés de l'ordre de 0,4 g/g [79].

I.7. Distillation

La distillation est la dernière étape de la production de bioéthanol lignocellulosique, visant à séparer et concentrer le bioéthanol du bouillon de fermentation. La solution de bioéthanol résultant du processus de fermentation doit être traitée ultérieurement pour une élimination complète de la teneur en l'eau présente dans l'hydrolysate fermenté, ce qui permet d'obtenir un produit sec avec de bioéthanol de haute qualité, également appelé bioéthanol anhydre. En général, l'élimination de la teneur en eau peut être effectuée par le principe de la distillation, qui est effectuée en utilisant la différence des points d'ébullition des mélanges dans une solution. Lorsque le mélange est chauffé jusqu'à son point d'ébullition, notre cas le bioéthanol, sa température d'ébullition est fixée à 78,2 °C, le bioéthanol contenu dans le mélange est vaporisé et séparé de l'autre composant tel que l'eau. Le bioéthanol anhydre contient au minimum 99,5 % d'éthanol en volume, la teneur en eau ne pouvant strictement pas être supérieure à 0,5 % en volume [80]. La vinasse (the stillage) est le principal déchet de la distillation, qui est composé d'une grande quantité d'eau, de substances solubles (telles que les sucres résiduels et le bioéthanol), de cellulases résiduelles et de levures. De plus, la vinasse a toujours des valeurs élevées de demande chimique en oxygène, et il est indiqué que la digestion anaérobie peut être un moyen efficace d'utiliser la vinasse pour la production

de biométhane c'est un biocarburant, une autre source alternative pour la substitution les carburants à base du pétrole brute.

Le bioéthanol anhydre peut être produit à partir de l'une des techniques suivantes : processus d'adsorption, distillation azéotrope, déshydratation chimique, distillation par diffusion, distillation extractive, distillation sous vide, processus membranaire [81].

Chapitre II

*Biomasse lignocellulosique et
plan d'expérience*

Chapitre II : Biomasse lignocellulosique et plan d'expérience

Dans ce chapitre, nous allons introduire les différents volets des travaux de thèse en débutant par le sarment de la vigne qui est la biomasse lignocellulosique que l'on désire valoriser et qui va servir comme un fil conducteur aux travaux qui ont été menés. La première partie de ce chapitre, sera donc consacrée à la biomasse lignocellulosique et sa composition chimique, ensuite on va entamer les techniques d'optimisations et les différents modèles de plan d'expériences et les extractions des sucres réducteurs.

L'intensification des changements environnementaux, la sécurité énergétique et la demande d'énergie et de produits propres ont attiré l'attention sur la production durable de bioénergie et de bioproduits [82]. La plupart des pays développés considèrent les déchets agricoles et forestiers comme une ressource essentielle pour la production des biocarburants mais malheureusement dans certains pays la biomasse lignocellulosique présente un potentiel largement inexploité [83]. Actuellement, malgré les nombreuses recherches effectuées pour la production de bioénergie, l'une des raisons pour lesquelles les coûts de traitement de la biomasse restent élevés est le coût élevé des enzymes et l'inefficacité des processus de prétraitement et de fermentation. La nécessité d'utilisation des techniques d'optimisations et de développement moderne tel que l'intelligence artificiel et les plans d'expérience serai obligatoires, En outre, la plupart des études ne transforment la biomasse lignocellulosique qu'on un seul produit. Cela signifie que la biomasse n'est pas entièrement utilisée. En fait, par nature, la biomasse est souvent constituée de nombreux composants aux potentiels différents. Par conséquent, des techniques efficaces de fractionnement et de valorisation basées sur le concept de bioraffinerie devraient être développées pour utiliser pleinement les composants de la biomasse. Une technologie de raffinage combinée permettrait de convertir la cellulose, l'hémicellulose et la lignine de la biomasse en produits de grande valeur.

II.1. Biomasse lignocellulosique

L'agriculture et la sylviculture fournissent d'énormes ressources en biomasse lignocellulosique pour produire de la bioénergie et des bioproduits [84]. La biomasse lignocellulosique est considérée comme une matière première durable pour une bioraffinerie destinée à produire des biocarburants et d'autre produits biochimiques. C'est un matériau

approprié pour la production des produits à grandes valeurs ajoutées, car elle est connue pour être une ressource non alimentaire abondante et renouvelable [85]. C'est un polymère complexe composé principalement des polymères glucidiques, la cellulose et hémicellulose et des polymères aromatiques, lignine. La récalcitrance structurelle découle principalement de la composition de la paroi cellulaire (cellulose, hémicellulose et lignine), du degré de lignification et de la cristallinité de la cellulose, qui permettent à la lignocellulose de résister à la déconstruction chimique et biologique [86]. La séparation de la cellulose, de l'hémicellulose et de la lignine constitue une étape importante de l'utilisation à haute valeur ajoutée de la biomasse et du bio-raffinage. Le prétraitement basé sur des solvants verts est une méthode de fractionnement verte pour le bio-raffinage afin de produire des biocarburants et des produits biochimiques [87]. Figure II.1 représente la composition et la structure de la biomasse lignocellulosique [88] et la figure II.2 représente la valorisation de la biomasse lignocellulosique et ses étapes de traitement [89].

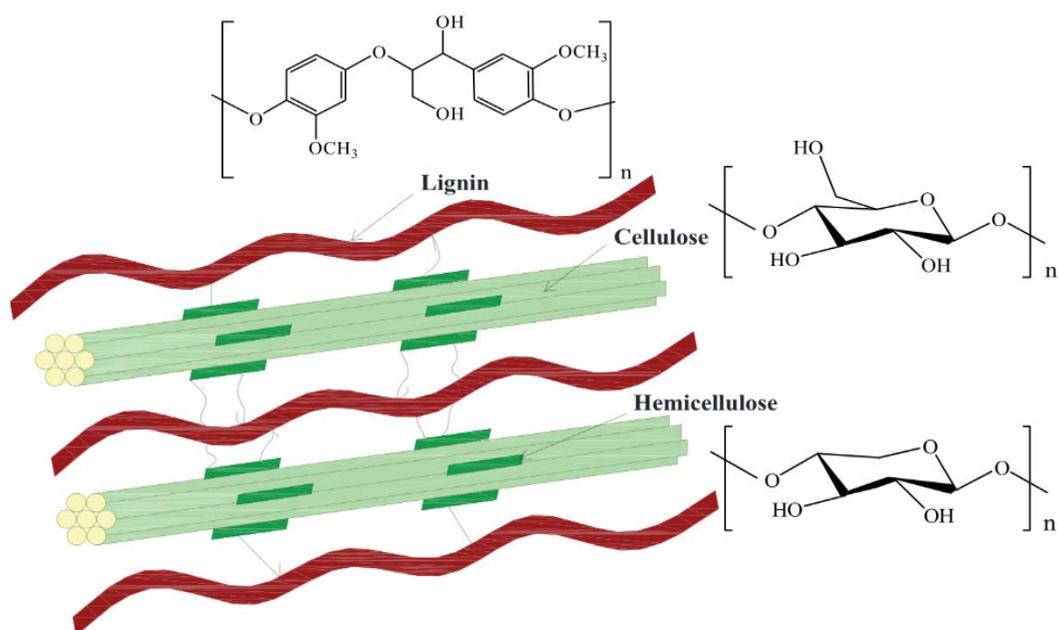


Figure II.1 : Composition et structure de la biomasse lignocellulosique [88]

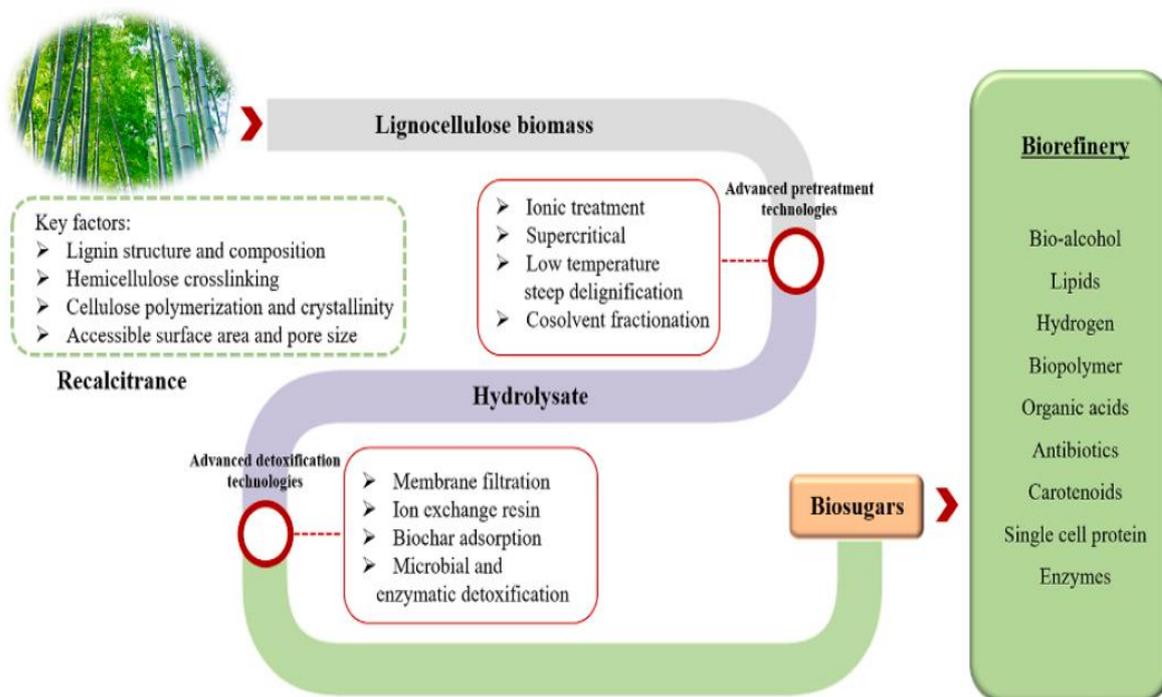


Figure II.2: Récalcitrante, traitement et valorisation de la biomasse lignocellulosique [89]

II.1.1. Cellulose

La cellulose est une substance naturelle la plus répandue, la plus abondante sur terre avec une production annuelle d'environ $1,5 \times 10^{12}$ tonnes, ce qui a suscité l'attention accrue de la part de la communauté scientifique, l'un des produits polymères les plus importants pour ses caractéristiques de durabilité avec des propriétés mécaniques élevées, elle possède une grande cristallinité, un rapport aspect élevé et une résistance élevée; elle est renouvelable, biocompatible, biodégradable, une stabilité chimique et thermique, de faible coût, peu toxique et elle a été utilisée dans une variété d'applications [90,91]. C'est un polysaccharide très stable, et un homopolymère à longue chaîne d'unités D-glucose, dont les molécules sont composées de plus de 10 000 sous-unités de glucose, liées entre elles par des liaisons glycosidiques (β -1-4), Elle est linéaire et contient des portions amorphes et cristallines [92]. Ce qui contribue à la linéarité de la molécule, avec des groupes hydroxyles en position équatoriale. En réalité, la véritable unité monomérique de la cellulose est la cellobiose, qui est un dimère de glucose. Les chaînes de cellulose sont assemblées via des liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires étendues et des forces de Van der Waals entre les groupes hydroxyle adjacents et les oxygènes pour former des fibrilles élémentaires, qui sont ensuite maintenues ensemble pour former des microfibrilles avec des diamètres allant de 5 à 50 nm et des longueurs 100 à 500 nm [93,94]. Les molécules linéaires de cellulose sont

placées en plusieurs couches superposées, la position axiale des groupes hydroxyle stabilisant la structure par des liaisons hydrogène intra et inters moléculaires, créant des microfibrilles avec un intérieur hydrophobe et un extérieur hydrophile, qui ensemble forment ensuite des macro-fibrilles. La stabilité et l'insolubilité de la cellulose sont dues aux propriétés chimiques du polymère. La cellulose peut être définie comme un homopolysaccharide amphiphile, puisqu'elle possède des régions hydrophobes et hydrophiles. Les fibrilles sont principalement cristallines et fortement linéaires ; cependant, elles présentent également des régions amorphes où la structure a une orientation aléatoire, ce qui contribue à sa stabilité thermodynamique. On la trouve généralement dans le principal composant structurel important des parois cellulaires primaires des légumes, des plantes vertes, des algues et de certaines bactéries [95]. Les fibres de cellulose sont devenues l'un des matériaux de soutien les plus importants pour la santé et la sécurité humaines avec l'apparition de la pandémie mondiale de COVID-19 [96]. Les dérivés cellulosiques dont la carboxyle-méthyl-cellulose (CMC), la cellulose bactérienne, la cellulose microcristalline (MCC), la nano-cellulose cristalline (CNC) et les nano-fibrilles de cellulose (CNF) ont suscité une grande attention dans les applications de détection et de bio-imagerie [97]. La figure II.3 montre la structure parallèle d'unité de la cellulose [98]. La figure II.4 Décortique la zone cristalline et amorphe [99].

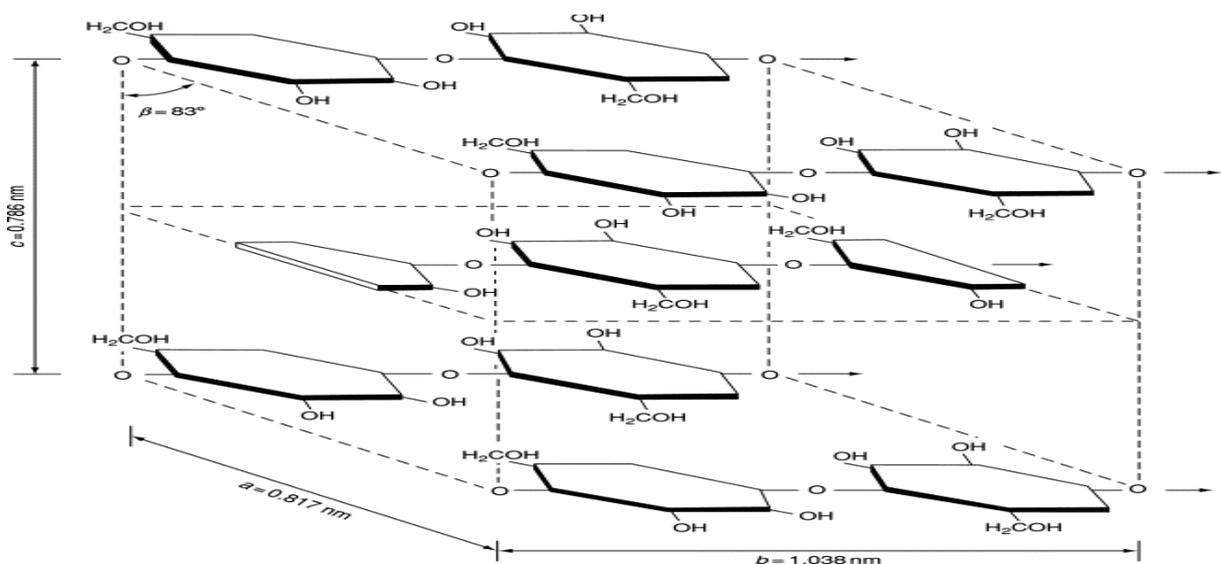
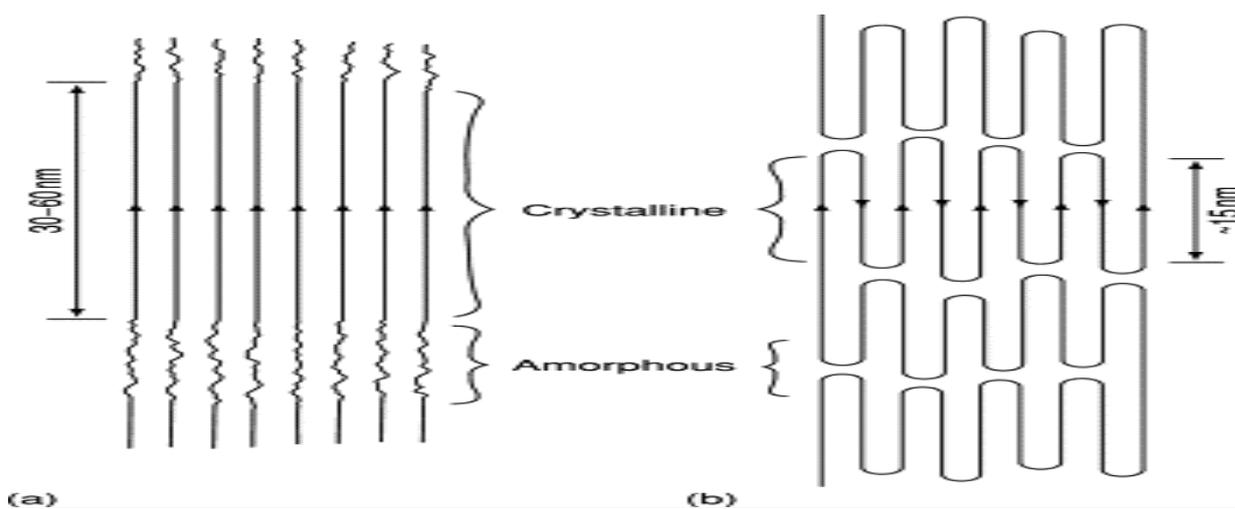


Figure II.3: Structure parallèle d'unité de cellulose [98]



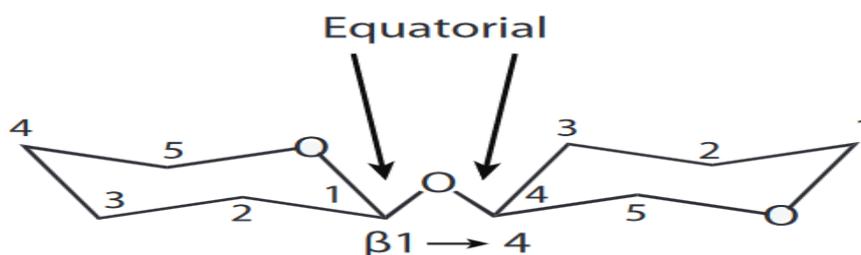
(a) Structure parallèle

(b) structure antiparallèle

Figure II.4: Structure de la cellulose [99]

II.1.2. Hémicellulose

L'hémicellulose est le deuxième polysaccharide le plus répandu dans les plantes, après la cellulose. C'est un polymère hétérogène composé de divers polysaccharides, tels que des acides de sucre, des pentoses (xylose et arabinose), des hexoses (glucose, galactose et mannose) [100–102]. Les hémicelluloses constituent la matrice de soutien des microfibrilles de cellulose. Les groupes acides des hémicelluloses les rendent très hydrophiles, solubles dans les alcalis et facilement hydrolysées par les acides et elle est exposée au risque de dégradation microbologique. Les hémicelluloses se dégradent thermiquement à des températures plus basses (150-180 °C) que la cellulose (200-230 °C) [103]. La classification structurelle des molécules d'hémicellulose dépend de la localisation, de l'origine, de l'espèce et des fonctions de la plante. Les xylanes sont un composant primaire de l'hémicellulose et sont hydrolysés par les enzymes xylanolytiques [104]. Les hémicelluloses sont des polysaccharides présentes dans les parois cellulaires végétales, qui ont des squelettes liés β (1-4) avec une configuration équatoriale (figure II.5).

**Figure II.5:** Configuration équatoriale du squelette d'hémicellulose

Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides hydrosolubles ou liposolubles, comprennent les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes et les glucomannanes, ainsi que les β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4) glucanes [105]. Ces types d'hémicelluloses sont présents dans les parois cellulaires de toutes les plantes terrestres, à l'exception des β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4) -glucanes, qui sont limités aux Poales et à quelques autres groupes. La structure détaillée des hémicelluloses et leur abondance varient considérablement d'une espèce à l'autre et d'un type de cellule à l'autre.

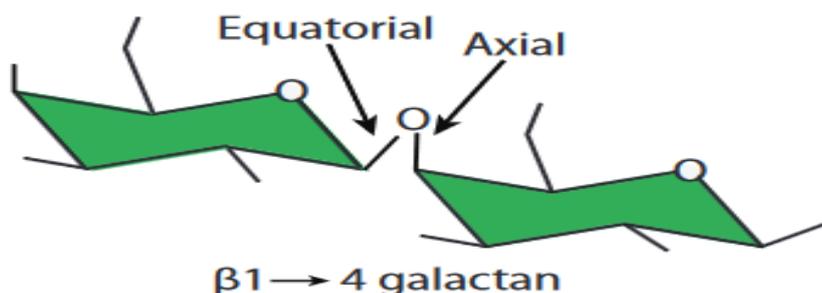


Figure II.6: Configuration de squelette d'hémicellulose cas liaison de β 1-4 galactane [105]

Le rôle biologique le plus important des hémicelluloses est leur contribution au renforcement de la paroi cellulaire par interaction avec la cellulose et, dans certaines parois, avec la lignine. L'hémicellulose est une structure amorphe et variable formée d'hétéro-polymères comprenant des hexoses (un monosaccharide avec 6 atomes de carbone) sa formule moléculaire (formule empirique), $C_6H_{12}O_6$ notamment (D. glucose, D. galactose, et D. mannose) ainsi que des pentoses $C_5H_{10}O_5$ (un monosaccharides avec 5 atomes de carbones), (D. xylose, et L. arabinose) et pouvant contenir des sucres acides connu par l'appellation acides uroniques notamment (D. glucuronique, D. galacturonique, et les acides D. methylgalacturonique). Sa structure moléculaire est principalement composée de liaisons xylane β (1,4) qui comprennent du D-xylose (près de 90 %) et du L. arabinose (environ 10 %). Les fréquences des ramifications (Branch) varient en fonction de la nature et de la source des matières premières. Une caractéristique structurelle importante des hémicelluloses est que certains groupes hydroxyle des sucres sont susceptibles d'être substitués par des groupes O-acétyle. Les hémicelluloses issues du bois mou (Soft-Wood) sont généralement des glucomannanes, tandis que celles des bois durs (Hard-Wood) sont plus fréquemment composées de xylane. Bien qu'il s'agisse du composant le plus abondant de l'hémicellulose, la composition du xylane varie encore dans chaque matière première selon la nature,

l'endroit et la variété. En raison de la diversité de ses sucres, l'hémicellulose nécessite un large éventail d'enzymes pour être complètement hydrolysée en monomères libres. Selon la composition de ces unités de sucre, les hémicelluloses sont traditionnellement classées en quatre types : xylane, mannane, xyloglucane et β -glucanes à liaison mixte. La structure détaillée, y compris le type et la proportion de substituants, la localisation des chaînes latérales ramifiées par rapport à la chaîne principale et les liaisons glycosidiques associées, dépend principalement de la source végétale.

L'hémicellulose est un hétéro-polymère hautement ramifié de pentoses (β -D-xylose and α -L-arabinoses), hexoses (β -D-glucose, α -D-galactose and β -D-mannose) et des sucres acides (α -D-glucuronique, α -D-galacturonique et α -D-4-O-méthyl galaturonique) avec des petites quantités d'autres sucres tels que α -L-rhamnose et α -L-fucose. La caractéristique de composition de l'hémicellulose dépend du type de biomasse. L'hémicellulose des bois feuillus et de la biomasse herbacée est principalement composée de xylane, tandis que le glucomannane et le galactoglucomannane sont les principaux composants de l'hémicellulose des bois résineux

II.1.3. Lignine

La lignine est le troisième polymère organique le plus répandu dans la biosphère et n'est présente que chez les angiospermes et les gymnospermes. La lignine contribue à la résistance à la traction, au stress métabolique, à la résistance aux insectes et aux agents pathogènes, et au mouvement de l'eau dans les cellules capillaires du xylème et du phloème, entre autres fonctions [106]. Il s'agit d'un polymère aromatique amorphe, très irrégulier, complexe composé d'unités molécules de phénylpropane connectées en trois dimensions. L'alcool coniférylique, l'alcool sinapylique et l'alcool p-hydroxy phénylique sont les trois monomères primaires de la lignine [107]. La lignine est toujours liée aux glucides, en particulier à l'hémicellulose, par des liaisons covalentes pour former la structure rigide de la biomasse lignocellulosique et la protéger contre les attaques des microorganismes. En raison de sa structure chimique, la lignine est naturellement hydrophobe. La lignine ayant une structure polymérique réticulée et densément ramifiée, sa décomposition est très compliquée. Les solutions alcalines, les interleukines et un nombre limité d'enzymes oxydantes modifiant la lignine sont principalement utilisés pour dépolymériser la lignine [108]. La lignine remplit l'espace entre la composition cellulosique et héli-cellulosique et les polymères, agissant comme un adhésif. Par conséquent, elle est considérée comme un sous-produit ou un résidu

de la fabrication du bioéthanol. C'est également le composant le plus résistant de la paroi cellulaire des plantes, qui sert de barrière naturelle pour empêcher la dégradation biochimique et enzymatique des cellules végétales, parmi les principaux composants de la biomasse [109]. La lignine peut encapsuler et se lier étroitement à d'autres composants (par exemple, les hémicelluloses et la cellulose) dans la paroi cellulaire de la biomasse lignocellulosique, formant un complexe lignine-Carbohydrate (CLC) [110], qui entrave gravement la déconstruction de la biomasse lignocellulosique par des méthodes physiques, chimiques et biologiques [111]. Ainsi, la lignine est généralement considérée comme un facteur important limitant la digestibilité de la biomasse lignocellulosique. Il est encourageant de constater que l'inhibition de la lignine peut être efficacement affaiblie par un prétraitement approprié en raison de sa capacité à modifier les structures physiques et chimiques de la lignine, réduisant ainsi la capacité d'adsorption des enzymes sur la lignine [112].

II.1.4. Extractibles

Les extractibles extraits de la biomasse lignocellulosique sont des molécules de poids moléculaire moyen ou faible qui peuvent être retirées des cellules végétales par différentes méthodes et techniques d'extractions au solvant, précisément les solvants blancs sans affecter et fractionner la structure cellulaire de la biomasse lignocellulosique ou ses propriétés mécaniques quel que soit son type et sa variété. Dans le cas d'extraction des déchets de bois, les matières extractibles représentent une faible proportion dans la composition globale de cette dernière, généralement moins de 11 % et ça diffère selon le type de la biomasse, sa variété, son sol, ainsi que ses conditions climatiques. Les extractibles peuvent comprendre une variété de molécules différentes qui peuvent être classées de différentes manières, par exemple selon leur polarité ou le solvant dans lequel elles sont dissoutes, ou organisées en familles chimiques. En prend exemple des extraits de serment de la vigne comprennent les n-alcanes, les n-alcanols, les cires, les terpènes, les acides gras, les glycérides, les stérols, les phénols et les polyphénols. Ils sont généralement classés en deux groupes : les aliphatiques solubilisés dans des solvants de faible polarité (par exemple, l'Hexane, le dichlorométhane, le chloroforme) et les composés phénoliques extraits par des solvants polaires (par exemple, l'éthanol et l'eau). [113]

II.2. Techniques d'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique

II.2.1. Hydro-thermolyse (Hydro-thermolysis)

L'hydro-thermolyse est l'une des méthodes de traitement appliquées à la biomasse lignocellulosique depuis des décennies, cette dernière est une voie thermo-chimique prometteuse appliquée pour convertir la biomasse lignocellulosique en produits de valeur ajoutée ou en biocarburants, en utilisant l'eau comme solvant et réactif dans des conditions sous-critiques et supercritiques [114]. Cette technique a été suggérée par les chercheurs Bobleter, Niesner et Röhr. L'utilisation de cette technique pour le fractionnement de la biomasse lignocellulosique a fait l'objet d'importantes études sur sa manière et son processus qui est relativement peu coûteux et respectueux de l'environnement, car le fractionnement est réalisé en utilisant uniquement de l'eau et de la chaleur, les températures peuvent aller de 100 à 240 °C pour des durées allant de quelques minutes à des heures, les pressions de fonctionnement peuvent varier de 0,12 à 150 MPa, ces pressions sont ajustées selon le diagramme de phase de l'eau ou diagramme pression-température d'eau, et des concentrations en solides inférieures à 100 °C : 20 mL/g, la raison au laquelle la biomasse lignocellulosique ne gonfle pas le solvant d'extraction et reste toujours immergé dans l'eau sous son état liquide, Cependant, dans des conditions de fonctionnement extrêmes, la corrosion et l'entartrage sont des limitations majeures des opérations. Une autre attention particulière ces dernières années a été considérée comme une méthode prometteuse pour l'extraction et la récupération de l'hémicellulose et de la lignine, cette technologie qui se concentre sur l'élimination de la barrière d'hémicellulose par le fait de la dissociation de l'acide acétique, par conséquent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques et la scission des substitutions de l'acide uronique dans les hydrates de carbone, ce dernier a été formé par la présence des ions hydroniums, qui coupent les groupes acétyles liés à l'hémicellulose, et favorise le clivage, le fractionnement des liaisons glucidiques, ainsi la dépolymérisation de la fraction lignine ce qui engendre sa relocalisation [115,116]. La libération de ces acides (acide acétique majoritairement et d'autres acides organiques) aide à catalyser l'hydrolyse en oligosaccharides. Cependant, les sucres monomères sont partiellement dégradés en aldéhydes en présence d'acide. Ces aldéhydes, principalement le furfural provenant des pentoses et le 5-hydroxy-méthyl-furfural provenant des hexoses, sont des inhibiteurs dans la fermentation microbienne. Les procédés utilisant de l'eau chaude à des températures et des pressions élevées dans l'objectif de maintenir le solvant à son état liquide, ce type d'hydrolyse ou de traitement est également

connu dans la littérature par le traitement hydro-thermique, hydro-thermolysé, liquéfaction hydro-thermique, extraction à l'eau chaude, procédé aquasolv et hydrolyse à cuisson sous pression dans l'eau [117]. La dégradation des composants de la biomasse lignocellulosique pendant l'hydro-thermolysé se fait par l'intermédiaire d'ions hydronium acides (H_3O^+) et d'ions hydroxyde basiques (OH^-) générés par l'auto-ionisation de l'eau à haute température [118]. Dans ce procédé ou traitement deux facteurs, autrement dit deux paramètres ont plus d'impact sur la variation de la réponse c'est la température ainsi que le temps d'extraction. Ce type de procédé est connu par sa récupération élevée des sucres d'hémicellulose avec un taux qui peut arriver à 98% et dans une fourchette de 88 jusqu'à 98%. Pour éviter la formation des inhibiteurs de la fermentation au cours de ces procédés, il faut uniquement garder et ajusté le pH entre 4 et 7. Le procédé a été développé à l'origine par l'équipe de Bobleter en Autriche, puis testé par Bouchard. Mok et Antal ont testé 10 substrats (ligneux et herbacés) par ce procédé d'hydrolyse thermique avec une durée d'extraction de 15 min, et des températures entre 200 à 240 °C, dans tous les cas l'hémicellulose a été complètement dissoute et hydrolysée enzymatique résultant on un rendement de 95% de monosaccharides. Kohlman a proposé une nouvelle méthode d'hydrolyse thermique avec contrôle du pH. Le but de ces conditions est de favoriser l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, grâce à une augmentation de la taille des pores et une diminution de l'indice de cristallinité. Ils ont utilisé des temps de réaction de 50 à 60 minutes pour atteindre des rendements d'hydrolyse de la cellulose presque maximaux. Dans des travaux récents, le groupe de Van Walsum a développé une technique de prétraitement par l'hydrolyse thermique applicable à une variété de substrats. Le taux de récupération du sucre pentose est supérieur à 80 %. Le résidu d'hydrolyse thermique a ensuite été soumis à une SFS (saccharification et fermentation simultanées) qui a permis de convertir 90 % de la cellulose en bioéthanol, après un temps de séjour de 75 heures, à une concentration en enzyme de 15 UPF (unités papier filtre/ g) et une concentration en substrat supérieure à 100 g/L. Ces résultats sont très intéressants, mais jusqu'à présent, ils n'ont été obtenus qu'à l'échelle du laboratoire et la technologie a rarement été testée dans des essais industriels, à l'exception de Bobleter, qui a été testé à l'aide d'un réacteur discontinu de 50 litres. Par conséquent, les avantages économiques de cette technologie ne sont pas encore prouvés. En particulier, des pressions élevées (supérieures à 50 bars) doivent être travaillées, ce qui peut rendre difficile une extrapolation à l'échelle industrielle. La technique de thermo-hydrolyses a des avantages attirants, on peut les citer et résumés comme suit :

1. Traitement de la matière lignocellulosique très importantes plus 200 kg/ m³.
2. Inhibition de la formation des inhibiteurs, en maintenant le pH entre 4 et 7.
3. Procédés sans produits chimiques (procédés économiques).
4. Récupération avec un taux très élevés des monosaccharides, généralement les sucres simples avec 5 atomes de carbones (Pentoses).
5. Une bonne digestibilité enzymatique de la cellulose prétraitée.
6. Traitement sans génération de sous-produits.
7. Absence préalable de traitement mécaniques (broyages).

II.2.2. Explosion des fibres à l'ammoniaque, Procédés AFEX

(Ammonia Fiber Expansion)

L'explosion des fibres à l'ammoniaque est un nouveau procédé de traitement alcalin qui entraîne une modification physico-chimique de l'ultra et de la macro structure de la biomasse lignocellulosique [119], autrement dit ce traitement est une forme d'hydrolyse physico-chimique, dans lequel l'ammoniaque liquide est appliquée à haute pression entre 200 et 1000 psi (1 psi =6,89476 Kilo-pascal) et avec des condition nettement plus faibles, grâce à l'emploi d'ammoniaque, la température moyenne dans le réacteur varie entre 70 jusqu'à 90 °C, ce qui minimise la formation des inhibiteurs au cours d'extraction, pendant une période limitée, après ce bref temps de séjour, la pression est relâchée de manière explosive, autrement dit, la pression est soudainement détendus dans le but l'évaporer l'ammoniaque et d'exploser le substrat, ce qui perturbe efficacement la structure de la biomasse lignocellulosique, qui provoque une décristallisation de la cellulose, une hydrolyse partielle de l'hémicellulose et dépolymérise la lignine [120]. Les paramètres tels que la pression de purge, la température, la durée de l'hydrolyse, le taux de charge d'ammoniac, le type de biomasse lignocellulosique et le nombre de traitements peuvent être influencés par ce type de procédé. Ce traitement a un impact significatif sur la biomasse lignocellulosique en raison de la décristallisation de la cellulose, et la rupture des liaisons glucidique ainsi que la dégradation de la lignine et l'hémicellulose suite au gonflement et désorganisation physique des fibres de la biomasse lignocellulosique, sans tenir compte de l'utilisation de l'ammoniaque résiduel comme source de nutriment pour les micro-organismes fermentaire. Enfin, l'ammoniaque est un produit dangereux et cancérigène avec une forte odeur qui se vaporise rapidement, et les installations devront être parfaitement étanches afin d'éviter toute perte de produits, les pertes non négligeables d'ammoniaque sont préjudiciables sur le plan

économique. Le traitement de la biomasse lignocellulosique avec de l'ammoniac aqueux à haute température a entraîné une rupture de la lignine et une décristallisation de la cellulose. Ce traitement à l'ammoniac est de différents types, notamment la méthode d'explosion des fibres à l'ammoniac (AFEX), le trempage dans l'ammoniac aqueux (Soaking in Aqueous Ammonia), et la percolation par recyclage de l'ammoniac (Ammonia recycle percolation) [121]. Ce type de traitement est inefficace sur des substrats ligneux et les rendements d'hydrolyse de la fraction hémi-cellulosique sont généralement faibles. Les rendements d'hydrolyse enzymatique de la cellulose n'ont jamais dépassé 50 % du rendement théorique sur des copeaux de bois de peuplier, ou 40 % sur des substrats provenant de déchets de papier [122]. La biomasse lignocellulosique obtenue après le traitement par l'explosion des fibres à l'ammoniac est sous forme sèche, ce qui montre une stabilité à long terme sans dégradation de la cellulose ou de l'hémicellulose [123,124].

II.2.3. Hydrolyse organosolv

Les bioraffineries à base d'organosolv sont les raffineries de matières premières de biomasse lignocellulosique les plus encourageantes, produisant à la fois des carburants et des produits chimiques. Cette approche avait pris l'idée de l'industrie du papier, consiste à rajouter des solvants organiques ou leurs solutions aqueuses tel que le méthanol ou l'éthanol au procédé de traitement ou prétraitement, afin de dissoudre et d'extraire la fraction lignine, lorsque cette fraction a été précipité, on le récupère par une simple filtration à vide pour accélérer la filtration, suivie d'une centrifugation, sans oublier aussi la récupération de la fraction hémicellulose, conséquence de la rupture des liaisons internes entre la lignine et l'hémicellulose, par ce moyen, on garde et on récupère un résidu de cellulose relativement pur [125]. Les bioraffineries durables utilisent simultanément l'hémicellulose et la lignine, et utiliseront bientôt différentes fractions de matières premières, le point fort de ces procédés c'est la régénération de ses solvants organiques, ces derniers vont aboutir à des traitements de recyclage et d'extractions. La nécessité d'un recyclage de 100 % condamne économiquement ce type de procédé. Le principe de ce traitement à base des organosolv c'est d'aboutir à la solubilisation de la lignine et de la fraction hémi-cellulosique ainsi qu'à la formation d'un résidu solide constitué essentiellement de cellulose. Au cours du processus de la délignification et la solubilisation de l'hémicellulose, une augmentation du volume des pores et de la surface de la cellulose, ce qui améliore l'accessibilité de l'hydrolyse enzymatique et de la saccharification. En général, le procédé Organosolv permet d'obtenir de bons rendements de récupération des sucres [126,127].

II.3. Plans expériences

Les outils de plan d'expérience et la méthodologie de la surface de réponse sont des excellentes stratégies qui permettent de tirer et inclure des conclusions plus précises que l'approche fondée sur un seul facteur à la fois (One Factor-at-Time OFAT), et permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études de développement, optimisations et de criblages industrielles, ceci peut réduire le nombre de tentative expérimentale pour obtenir des ensembles de données plus informatifs, maximum de renseignements avec le minimum d'expériences [128,129]. En plus, le plan d'expérience permet d'étudier l'interaction entre plusieurs facteurs et d'optimiser les différentes conditions testées, afin d'améliorer les performances du processus en suivant des règles mathématiques avec une adaptations d'une démarche rigoureuse. Ils sont applicables a de nombreuses disciplines et a toutes les industries à partir du moment où le lien qui existe entre une grandeur intérêt, réponse ou variables dépendantes Y avec des variables indépendantes, ou factures X_i , elle est résumée en fonction citée comme suit : $Y = f(X_i)$. La compréhension de la méthode des plans d'expérience s'appuie sur deux notions essentielles, la premier c'est l'espace d'expérimental et en second lieu la modélisation mathématique des grandeurs étudiées [130]. Un plan expérience est un ensemble de méthodes et de procédures qui sont principalement utilisées pour analyser des données relatives à des variables spécifiques concernant un problème de recherche bien défini. Il existe différents types de plan d'expérience adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur tel que : plan de Box Behnken, la méthode de Taguchi, plan factoriel fractionné connu sous la théorie des Aliases, matrice composites centrées, plan de Doehlert, il est connu aussi par le réseau de Doehlert, matrice de Hadamard (plan de criblages tel que le plan de Plackett- Burman), matrice de mélange (Scheffe), plan de Rechtschaffner, hyperpolyèdre croisé, et la matrice de Hoke. Tous ces plans présentent des avantages et des inconvénients, de sorte que le choix dépend principalement et essentiellement de l'objectif de la recherche et des ressources disponibles. La première étape de l'utilisation des plans d'expériences consiste à définir les variables indépendantes et dépendantes. Les variables indépendantes, ou facteurs, peuvent être modifiées à différents niveaux ou valeurs, tandis que la variable dépendante, ou réponse, est influencée par les facteurs [131]. Le facteur est le paramètre que le chercheur souhaite évaluer expérimentalement, et le niveau est une valeur qu'un facteur peut prendre. Pour valider le modèle mathématique obtenu dans le plan d'expérience et déterminer l'ensemble de conditions, il faut calculer la valeur résiduelle, qui est la différence entre le résultat

expérimental et le résultat estimé [132–134]. Un bon modèle mathématique à une faible valeur résiduelle, lorsque la signification du modèle mathématique est évaluée, le t-Test et l'analyse de la variance (ANOVA) sont les méthodes statistiques les plus souvent appliquées. Le t-Test est utilisé pour comparer deux échantillons ou traitements, alors que l'analyse de la variance est utilisée lorsqu'il y a plus de deux. Pour les deux analyses, le niveau de signification doit être fixé à 5 % erreur, ($P\text{-value} < 0,05$), pour indiquer que les traitements présentent une différence statistiquement significative. Le niveau de signification est également appelé " α ", c'est-à-dire la probabilité qu'une hypothèse nulle soit rejetée. Par conséquent, lorsque " p " calculé par l'ANOVA est inférieur au niveau de signification, les résultats peuvent être considérés comme significatifs, tandis que " p " supérieur au niveau de signification signifie que l'hypothèse nulle est vraie et que les résultats ne sont pas significativement différents, de sorte qu'il n'y a pas d'éléments probants pour rejeter l'hypothèse nulle. La figure II.7 présente l'enchaînement et les étapes de la conception des plans d'expériences, le choix des variables indépendantes et les variables dépendantes, la section du type de plan quel que soit le plan, le plan de screening ou un plan de surface de réponse, la réalisation expérimentale, et enfin l'interprétation des Data et la validation mathématique des plans d'expériences.

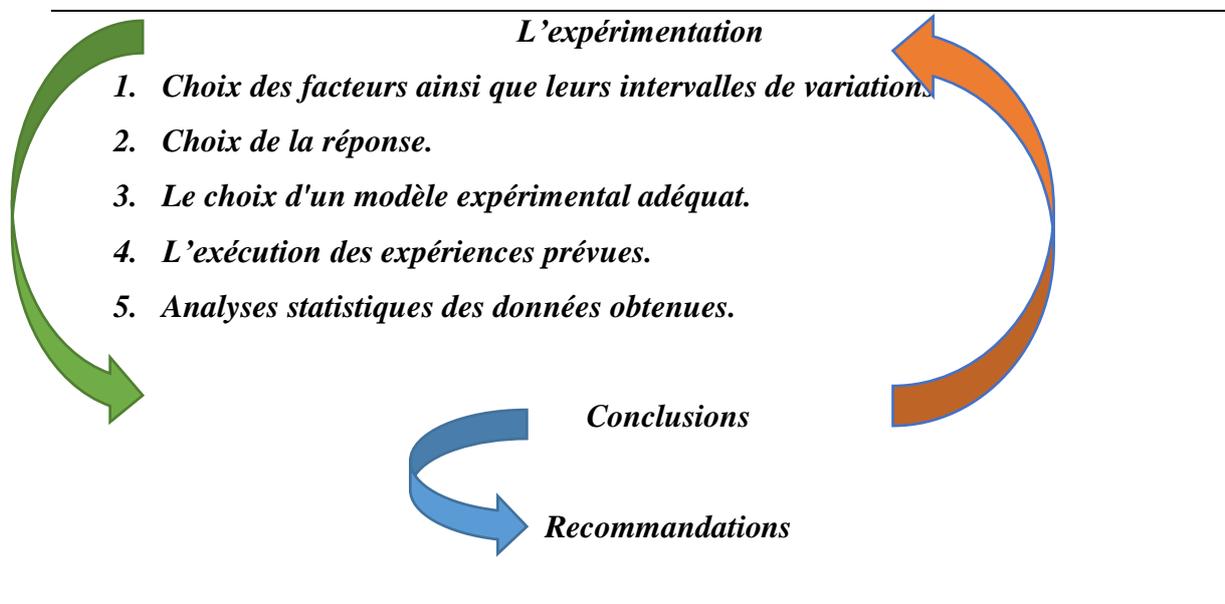


Figure II.7: Classification de conception des plans d'expériences

II.3.1. Codifications les niveaux des facteurs

La codification des niveaux de la variable ou facteur consiste à transformer chaque valeur réelle étudiée en coordonnées à l'intérieur de l'échelle avec des valeurs sans dimension, qui doivent être proportionnelles à sa localisation dans l'espace expérimental. La codification est importante car elle permet d'étudier des variables de différents ordres de grandeur, ampleur ou magnitude (qualitative ou quantitative) sans que la plus grande n'influence l'évaluation de la plus petite. L'équation II.1 peut être appliquée pour transformer une valeur réelle (z_i) en une valeur codée (x_i) selon un plan expérimental déterminé :

$$X_i = \left(\frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \right) \beta_d \quad (\text{II.1})$$

Où Z_i est la distance entre la valeur réelle au point central et la valeur réelle au niveau supérieur ou inférieur d'une variable, β_d est la valeur limite codée majeure dans la matrice pour chaque variable, et Z^0 est la valeur réelle au point central [135].

II.3.2. Type de plans d'expériences

Les plans d'expériences sont un domaine qui a été développé pour économiser les ressources grâce à des techniques et des procédures efficaces. Les plans d'expériences peuvent être utilisés pour passer au crible de multiples facteurs afin de déterminer lesquels sont importants, lesquels peuvent être ignorés sans risque et lesquels doivent être considérés comme interagissant avec d'autres facteurs. Les projets peuvent être conçus par étapes afin d'identifier d'abord et de concentrer ensuite les ressources sur les facteurs importants et les domaines d'intérêt pour passer au plan d'optimisation. Les nombres d'observations à chaque niveau d'une régression ne doivent pas nécessairement être équilibrés. Les doubles peuvent être utilisés plus efficacement que les triples. Les plans de surface de réponse ou les plans d'optimisation ainsi que les plans de screening tel que les plans factoriels sont analysés à l'aide de l'ANOVA et des fractions du plan original peuvent être utilisées pour collecter les mêmes informations plus efficacement. Le tableau II.1 représente tous les type de plans d'expériences quel que soit le plans, les plans de criblages et les plans de surface de réponse [136].

Tableau II.1 : Types des plans d'expériences [136]

<i>Plans d'expériences</i>	
<i>Plans factoriels</i>	<i>Plans de surface de réponse</i>
1. <i>Plans factoriels complets</i> 2. <i>Plans de Plackett-Burman</i>	1. <i>Plans centrales composites</i>
3. <i>Plans factoriels fractionnés</i>	2. <i>Plans de Box Behnken</i>
4. <i>Conception de réseau orthogonal Taguchi</i>	

CRIBLAGES

OPTIMISATIONS

II.3.2.1. Plans de criblages

Bien qu'un grand nombre de facteurs influencent le processus d'extraction des sucres réducteurs à partir de la biomasse lignocellulosique, certains d'entre eux n'ont pas d'effet significatif sur celui-ci. Le Criblages, la sélection, le dépistage, et le screening des facteurs les plus influents est le principal objectif de l'utilisation d'une conception expérimentale dans l'extraction des sucres réducteurs. Les plans de sélection sont utilisés pour déterminer les facteurs les plus importants et leurs interactions parmi tous les facteurs potentiels. Ces types de conceptions peuvent examiner simultanément des facteurs qualitatifs, quantitatifs et liés au mélangeur. Ils sont utilisés pour améliorer les techniques d'extraction, le rendement en sucre réducteurs, les produits ou les processus de contrôle de la qualité et pour tester la robustesse. Les plans factoriels complets à deux niveaux, les plans factoriels fractionnaires à deux niveaux et les plans de Plackett-Burman sont souvent utilisés à des fins de criblage.

Le tableau II.2 résume les avantages et les inconvénients des différents modèles de criblage [137].

Tableau II.2 : Plans de criblage [137]

Types des plans	Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> Plan factoriel complet à deux niveaux 	<ul style="list-style-type: none"> L'effet principal et l'interaction des facteurs peuvent être identifiés 	<ul style="list-style-type: none"> L'incrément du nombre de facteurs conduit à la géométrie incrémentation du numéro d'essai. Ainsi que, la conception n'est pas réalisable pour dépistage de plus de seize facteurs.
<ul style="list-style-type: none"> Plan factoriel fractionnaire à deux niveaux 	<ul style="list-style-type: none"> Moins de pistes expérimentales sont nécessaires par rapport à un plan factoriel complet pour le même nombre de facteurs 	<ul style="list-style-type: none"> L'effet des interactions entre les facteurs est très limité et peut être mal interprété car il n'y a pas de mesure de l'erreur dans ce modèle.
<ul style="list-style-type: none"> Plackett–Burman 	<ul style="list-style-type: none"> Un grand nombre de variables peuvent être examinées avec un très peu de piste expérimentale 	<ul style="list-style-type: none"> La conception n'est utile que pour identifier les principaux effets et ne tenez pas compte de l'effet d'interaction entre facteurs

a) . Plans factoriels

Les plans factoriels permettent d'étudier plus d'un facteur à deux niveaux ou plus. Les plans factoriels à deux niveaux sont utilisés à des fins de sélection ou criblage (le screening), car

ils permettent d'obtenir les effets principaux et les effets d'interaction des facteurs considérés avec un nombre réduit d'essais. Diverses combinaisons de différents niveaux de facteurs sélectionnés sont généralement incluses dans ces plans d'expérience par lequel les interactions entre les facteurs peuvent être supposées. Ces conceptions sont plus efficaces en termes de traitement d'un grand nombre de variables qu'une conception à une variable à la fois (OVAT). Le nombre de facteurs et le nombre de niveaux de chaque facteur sont utilisés pour classer les plans factoriels. Par exemple, un plan factoriel $2 * 2$ signifie qu'il comporte deux facteurs à deux niveaux chacun et un plan factoriel $2 * 3$ signifie qu'il comporte trois facteurs et deux niveaux pour chaque facteur. Habituellement, dans les plans factoriels, la variable réelle est convertie en variable codée afin d'assurer une meilleure uniformité. Pour déterminer les effets relatifs d'un facteur, l'analyse factorielle codée est recommandée car les coefficients du modèle sont sans dimension dans une analyse factorielle codée et donc directement comparables. L'analyse de la variance (ANOVA) ou l'analyse de régression peut servir de base à l'analyse d'un plan factoriel et à l'ajustement du modèle. Les plans factoriels sont généralement classés en deux catégories : les plans factoriels complets et les plans factoriels.

i). Plan factoriel complet

Un plan factoriel complet à deux niveaux peut être utile pour le criblage lorsque peu de facteurs doivent être étudiés. Toutes les combinaisons possibles de toutes les variables d'entrée et leurs niveaux sont inclus dans un plan factoriel complet à deux niveaux. Le plan factoriel complet peut être désigné par 2^n lorsque n est le nombre de facteurs. Les plans à deux niveaux, sont les formes simples d'une orthogonale conception, ils sont généralement utilisés pour sélectionner les variables et analyser leurs facteurs. Chaque facteur a deux niveaux : "Niveau bas" et "Niveau haut". Deming and Morgan, 1993 qui sont exprimés respectivement par "+1" et "1". Parfois, l'effet des facteurs étudiés sur une réponse particulière peut être décrit par un modèle polynomial et, si nécessaire, cette réponse peut être optimisée par un autre plan [138,139]. Les nombres d'essais expérimentaux sont augmentés géométriquement avec l'augmentation des facteurs pour un plan factoriel complet. Par exemple, 2^2 séries d'expériences sont nécessaires pour examiner les effets de deux facteurs, et 3^2 séries d'expériences sont nécessaires pour trois facteurs. Les plans à trois niveaux ou plus sont plus fréquemment pour construire la surface de réponse parce qu'ils montrent les effets non seulement des facteurs linéaires, mais aussi des facteurs quadratiques. Le plan factoriel complet peut ne pas être viable pour un grand nombre de

facteurs, car la mise en œuvre de nombreuses conditions expérimentales est coûteuse et complexe. Dans ce cas, les chercheurs envisagent à l'utilisation des plans factoriels fractionnés comme un plan alternatif. Le plan factoriel complet à trois niveaux est généralement utilisé dans le cadre de la méthodologie de surface de réponse (RSM), Les variables indépendantes et leurs niveaux sont combinés de manière à ce que le plan présente toutes les combinaisons possibles. Ce type de plan traite les effets principaux et les effets d'interaction entre les facteurs. Le plan factoriel complet peut être symétrique, lorsque le nombre de niveaux est le même pour tous les facteurs étudiés, ou asymétrique, lorsque chaque facteur a un nombre distinct de niveaux.

ii) . Plan factoriel fractionné

Pour évaluer les effets d'un grand nombre de facteurs, de nombreuses expériences sont nécessaires, ce qui n'est pas réalisable d'un point de vue économique et pratique. Les effets de certains facteurs sur une réponse peuvent être étudiés avec un plan factoriel fractionnaire de manière économique et pratique. Lorsqu'un nombre relativement important d'essais expérimentaux est nécessaire pour un plan factoriel complet, une fraction du plan factoriel complet est souvent utilisée pour obtenir les informations souhaitées. Le plan factoriel fractionnaire à deux niveaux ne contient qu'une fraction du plan factoriel complet et il peut examiner les facteurs (f) à deux niveaux par des expériences 2^{f-v} et ($v = 1,2,3, \dots, n$). Un plan factoriel fractionnaire est considéré comme un sous-ensemble représentatif d'un plan factoriel complet. Au stade initial de toute étude, cela semble être une bonne alternative à un plan factoriel complet.

b). Plan de Plackett-Burman

Le plan de Plackett-Burman est un plan largement utilisé pour sélectionner et cribler les variables significatives d'un processus. Il a été développé par Plackett et Burman en 1946 et il s'agit également d'un plan factoriel à deux niveaux [140]. Maximum $f = N-1$ facteurs avec N exécutions peuvent être examinés dans une expérience par un plan de Plackett-Burman, où N est un multiple de 4. Si les nombres de facteurs examinés sont inférieurs à $f = N - 1$, alors un sous-ensemble du plan de Plackett-Burman pour N exécutions peut être appliqué. Les expériences sont parfois reproduites pour déterminer les erreurs de l'expérience. En général, un modèle polynomial de premier ordre est ajusté pour le plan de Plackett-Burman afin d'estimer les effets de plusieurs facteurs. Les facteurs significatifs du modèle estimé peuvent être identifiés par l'analyse de la varian.

II.3.2.2. Plans d'optimisations

L'optimisation est une autre pratique de la conception expérimentale qui confirme les conditions optimales ou les paramètres d'une expérience. L'approche d'optimisation commence généralement par une conception de dépistage pour sélectionner les facteurs importants et se poursuit par une conception d'optimisation, tels que la conception de Taguchi, la conception composite centrale (CCD) ou Box–Behnken design (BBD).

a). Plan composite centrale

Box et Wilson ont développé Central Composite Design (CCD) en 1951 [141]. Le plan composite central de rotation (CCRD) est le plus souvent utilisé pour obtenir la surface de réponse. Pour obtenir la surface de réponse parce qu'il permet de construire un modèle (quadratique) du second ordre pour la réponse [142]. Ce type de plan se produit lorsque les distances entre les deux points axiaux, comme les points factoriels du plan composite central, et le centre sont identiques, de sorte que les chances de la réponse disponible sont les mêmes en tous les points d'une sphère centralisée à l'origine. L'équation montre le modèle mathématique de second ordre :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^F \beta_i X_i + \sum \sum_{i=j-1}^F \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^F \beta_{ii} X_i^2 \quad (\text{II.2})$$

Où y est la réponse, β_0 est l'ordonnée à l'origine, les valeurs β_i représentent le coefficient des effets principaux, β_{ij} sont les coefficients des effets d'interaction, β_{ii} sont les termes de second ordre et ε est la composante aléatoire de l'erreur qui est déterminée par l'ajustement du modèle aux données [143]. Le plan se compose de points factoriels (-1, +1) et axiaux (- α , + α) et de répétitions au point central, ce qui confère des propriétés telles que l'orthogonalité et la rotativité à l'ajustement des polynômes quadratiques. Les points axiaux (2k) permettent d'évaluer la courbure et d'estimer de nouveaux extrêmes pour tous les facteurs d'étude dans des configurations hautes et basses. Ce plan est utile car il permet d'obtenir une connaissance complète des réponses avec le plus petit nombre d'expériences possible [144]. Le nombre d'expériences pour ce plan peut être obtenu à partir de l'équation II.3 :

$$N = K^2 + 2K + C_p \quad (\text{II.3})$$

Où k représente le nombre de facteurs et C_p le nombre de répétitions du point central [145].

b). Plan de Box Behnken

La différence entre ce plan et le plan de rotation composite central est qu'il utilise trois niveaux pour les facteurs d'étude (-1, 0, +1), tandis que le plan de rotation composite central utilise cinq niveaux (- α , -1, 0, +1, + α). L'équation suivante donne le nombre d'expériences (N) requis pour le plan de Box-Behnken [146]. Où k est le nombre de facteurs et Cp le nombre de répétitions du point central :

$$N = 2k(k - 1) + Cp \quad (\text{II.4})$$

Ce plan est également utilisé dans la méthodologie de la surface de réponse pour obtenir le modèle mathématique de second ordre, qui permet d'optimiser le processus étudié. L'avantage du plan de Box-Behnken est qu'il met en évidence les problèmes liés aux limites expérimentales et évite les combinaisons inutiles de traitements [147]. Malgré les avantages de la méthodologie de la surface de réponse pour l'analyse des données expérimentales, la technique ne précise pas quel type de conception doit être utilisé pour collecter et analyser les informations [148].

II.4. Conclusion

La caractérisation physico- chimique, structurale, thermique et morphologique du sarment de vigne de variété cardinale a été étudiée par des méthodes conventionnelles. Cette étude constitue une source d'information sur les éléments de constitution de base, les groupements fonctionnels, la morphologie et le comportement de la décomposition thermique. Cette étude montre une teneur élevée en Holocellulose, d'alpha cellulose et hémicelluloses pouvant participer à la production de carburant de deuxième génération ou à la production de fibres industrielles et de nouveaux matériaux. Le principal avantage de cette biomasse lignocellulosique est qu'elle est abondante et renouvelable. À la suite de ces résultats, cette plante ouvrirait la voie à de nouvelles applications tout à fait intéressantes.

Chapitre III
Matériels et méthodes

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1. Matières premières et échantillonnages

La wilaya de Boumerdes est considérée comme une wilaya à caractère agricole par excellence, puisque la superficie agricole totale est estimée à 98 454 hectares, dont 64 600 hectares sont arables, équivalent à 66 % de la superficie totale, et la superficie irriguée représente 32 %, la partie importante pour nous c'est la viticulture, qui occupe 20 % de la superficie arable de la wilaya. Cette division s'est développée au cours des 15 dernières années, puisque la superficie de la vigne est passée de 5 199 hectares en 2000 à 10 948 hectares en 2015. La wilaya de Boumerdes et ses daïras contribuent à plus de 50 % à la production nationale de raisins de table. Les déchets de sarments de la vigne utilisés dans ce travail proviennent du cépage cardinale, une des types de variétés de vigne, il est connu par sa qualité. D'après la direction agricole de Boumerdes, la superficie viticole est 13 872 Hectare (2018), et une superficie de cardinale est de 2347,6 hectare. Les dix variétés des raisins de tables de la région de Boumerdes et ses daïras sont données dans la figure. III.1.

	1. Muscat
	2. Italia
	3. Chasselas
	4. Victoria
	5. Sultanine
	6. Gros noir
	7. Red Glob
	8. Dattier
	9. Cardinale
	10. Sabelle

Figure III.1: Variétés de vigne dans la région viticulture de Boumerdes

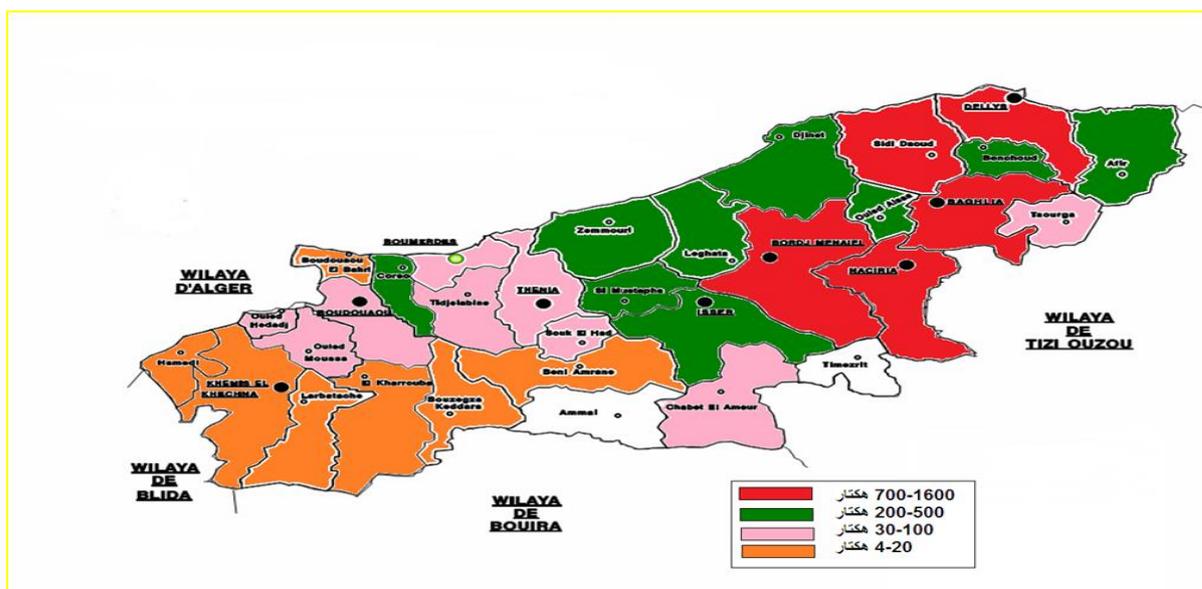


Figure III.2 : Répartition et superficies des champs de vigne dans la wilaya de Boumerdes de l'année 2020

Les échantillons ont été collectés au début de mois de mars 2018 dans la région de Bordj Menaiel, wilaya de Boumerdes (60 km à l'est d'Alger), et soigneusement lavés à l'eau distillée pour éliminer les impuretés, puis séchés pendant 20 jours à température ambiante dans une chambre noire ventilée pour protéger les composés de l'oxydation par la lumière, ce dernier a été réduit à environ de 3 cm de long avec une lame de rasoir, puis séchés dans une étuve pendant 24 h à une température de 60 °C, avant de les soumettre aux analyses physico-chimiques. La biomasse lignocellulosique (environ 800 g de biomasse en copeaux) est ensuite broyée finement jusqu'à une granulométrie inférieure à 1 mm (broyeur électrique modèle MX-E1900- puissance 900 W Condor, Algérie) puis tamisées pour avoir un lot unique et homogénéisé à l'aide d'un tamis à mailles en acier inoxydable à manche avec une ouverture de 1 mm.



Figure III.3: Biomasse lignocellulosique du sarment de la vigne à l'état poudre après broyage

La taille de la biomasse après le tamisage a été mesurée à l'aide d'une granulométrie laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments). La matière première a été stockée dans des sacs hermétiques, à l'abri de l'humidité et de la lumière, jusqu'à son utilisation ultérieure. Lors de l'étape de criblage, la matière première a été séparée en deux fractions. Il a été passé à travers deux tamis standard de 125 μm et 500 μm et stocké dans les mêmes conditions (voir annexe figure 6 et 7).

III.2. Caractérisation chimique de la biomasse lignocellulosique

III.2.1. Détermination du taux d'humidité

L'eau dans la biomasse lignocellulosique se présente sous deux formes :

- A l'état libre : cette eau se trouve dans les lumens, les méats et les capillaires intercellulaires.
- A l'état lié : elle forme la liaison chimique entre les groupements hydroxyles. Elle est aussi contenue dans les parois cellulaires, on l'appelle eau hygroscopique.

L'humidité dans une biomasse lignocellulosique varie dans de grandes proportions.

- L'humidité relative, qui s'exprime en pourcentage, c'est la quantité d'eau contenue dans l'échantillon rapportée à la masse de ce dernier à l'état humide.
- L'humidité absolue : exprime le rapport de la quantité d'humidité contenue dans une prise d'essai, sur la masse absolument sèche de la prise d'essai.

Les méthodes de détermination de l'humidité sont nombreuses et variées, basées toutes sur le séchage de la biomasse lignocellulosique.

- Séchage à l'étuve [149] :

Une masse de 2 g de la biomasse lignocellulosique est portée à l'étuve à une température de 105 ± 1 °C pendant 24 heures. Retirée de l'étuve, placée dans le dessiccateur et après refroidissement, pesée. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le taux d'humidité de la biomasse lignocellulosique est exprimé par l'équation III.1 :

$$\text{Taux d'humidité relative (\%)} = (m_i - m_f)/m_i \times 100 \quad \text{(III.1)}$$

Où m_i : masse initiale de la biomasse lignocellulosique (g)

m_f : masse de la biomasse lignocellulosique après séchage (g)

III.2.2. Détermination du taux de cendre

Dans la composition d'une biomasse lignocellulosique, on trouve également des substances minérales, la proportion et la quantité de ces dernières dépendent de la nature de la biomasse lignocellulosique et des conditions de sa croissance. La quantité des cendres obtenues après calcination de la biomasse lignocellulosique, on le nomme parfois ignifugations (c'est un nom spécifique pour la biomasse). La cendre est la partie soluble dans l'eau. Elle est généralement constituée des sels et d'oxydes des métaux alcalins et alcalino-terreux, quant à celles insolubles ce sont les sels et les oxydes des métaux lourds. Pour les analyses ultérieures, il est nécessaire de connaître non seulement le taux de cendre de la biomasse lignocellulosique, mais aussi la proportion soluble [150].

Une prise d'essai de 2 g de la biomasse lignocellulosique (homogène et finement broyé) est pesée dans un creuset en porcelaine. Le creuset est ensuite introduit dans un four à moufle chauffé à une température de $575 \pm 25^\circ\text{C}$ pendant une durée de six heures afin de consommer entièrement les composés organiques. A la fin de cette opération, à l'aide d'une pince, on retire le creuset du four et on le transfère dans un dessiccateur pour le refroidir. On pèse une nouvelle fois le creuset avec la cendre.

Le taux de cendre de la biomasse lignocellulosique ou le taux des substances minérales de la biomasse lignocellulosique est exprimé par l'équation III.2 :

$$\text{Taux de cendre (\%)} = ((m_i - m_f)/m_i) \times 100 \quad \text{(III.2)}$$

Où m_i : masse initiale de la biomasse lignocellulosique (g).

m_f : masse de la biomasse lignocellulosique après calcination.

III.2.3. Détermination du taux des extractibles

- **Teneur en lipides (matières grasses) et extractibles (Hexane\ éthanol)**

Mis à part les polysaccharides (cellulose, hémicellulose) et la lignine, la biomasse lignocellulosique contient également des substances qui ne rentrent pas dans la composition des parois cellulaires. Ces substances correspondent aux hydrocarbures aromatiques et aliphatiques, les acides organiques, les terpènes, les résines, les éthers, les graisses ...etc. Ces derniers peuvent être extraits par les solvants neutres : benzène, toluène, eau, alcool, acétone.... etc.

La composition des substances extractibles dépend de l'espèce (nature ou type de la biomasse lignocellulosique), de la période de l'année où a eu lieu la coupe ou la récolte de la biomasse lignocellulosique, les conditions climatiques, nature de sol, ainsi que l'endroit du prélèvement de l'échantillon (tronc, branches, feuilles) sans oublier que les conditions d'extractions dépendent de la nature du solvant utilisé.

Les substances extractibles sont classées en groupes, suivant leur nature et de celle de l'agent extractif [151].

1. Volatiles.
2. Solubles dans les solvants organiques : éthers, alcools, cétones...etc.
3. Solubles dans l'eau, parmi ces substances on trouve l'amidon, les substances pectiques, les sels minéraux, certains sucres, les colorants et les tanins.

Une prise d'essai de 2 g de la biomasse a été introduit dans une cartouche en cellulose (22 x 80 cm) placée dans l'extracteur à Soxhlet (voir annexe figure 8). Dans un ballon on verse 200 mL d'éther di-éthylique, dans le cas de la détermination du taux de matière grasse contenue dans une biomasse lignocellulosique, ou on verse dans un ballon 2 volume toluène/ 1V éthanol), par ailleurs la quantité extractible contenue dans une biomasse lignocellulosique). Après 4 à 6 heures d'extraction selon la nature de l'échantillon, l'extrait est transféré dans un autre ballon, préalablement séché et pesé. Le solvant est distillé et récupéré.

Le taux des extractibles contenue dans la biomasse lignocellulosique est exprimé par la relation III.3:

$$\text{Taux d'extractible (\%)} = ((m_i - m_f)/m_i) \times 100 \quad \text{(III.3)}$$

Où m_i : masse initiale de la biomasse lignocellulosique (g).

m_f : masse est de la biomasse lignocellulosique après extraction (g).

III.2.4. Détermination du taux de l'holocellulose

Dans la composition de la biomasse lignocellulosique on trouve l'holocellulose ; c'est un mélange de la cellulose et l'hémicellulose. L'holocellulose est la fraction polysaccharidique totale de la biomasse lignocellulosique, de bois, et des produits similaires, composée de cellulose et de toutes les hémicelluloses, obtenue en éliminant les matières extractibles et la lignine du matériau naturel [152].

2g de sciure de sarment de la vigne a été inséré dans un tube à vis, on ajoute dans le tube à vis un volume de 32 mL d'eau déminéralisée, après en introduire une quantité de 0,4 g de chlorite de sodium (NaClO_2) puis à l'aide d'une pipette, on ajoute un volume de 0,2 mL d'acide acétique pure (CH_3COOH). Le tube à vis a été introduit dans un bain marie porté à une température de 75 °C pendant une heure. 0,4 g de chlorite de sodium et un volume de 0,2 mL d'acide acétique a été ajouté à la solution. Ces réactifs d'ajout on était répété au minimum quatre fois, jusqu'à avoir un solide avec un aspect blanchâtre de couleur et cela heure de temps. Le mélange est alors filtré sous vide sur creuset filtrant en verre fritté N° 4, préalablement séché et pesé. Le filtrat est lavé avec de l'eau déminéralisée chaude et séché dans l'étuve à 40 °C pendant 24 heures jusqu'à avoir une prise de mesure stable, après l'avoir refroidi dans un dessiccateur, le taux d'holocellulose contenue dans la biomasse lignocellulosique est exprimé par la relation (III.4) :

$$\text{Taux d'holocellulose (\%)} = ((m_i - m_f)/m_i) \times 100 \quad (\text{III.4})$$

Où m_i : masse de la biomasse lignocellulosique après extraction des extractibles (g).

m_f : masse de la biomasse lignocellulosique à l'aspect blanchâtre (g).

III.2.5. Détermination du taux d' α -cellulose

Une prise de 2 g d'holocellulose préparé selon la méthode précédente a été introduite dans un bécher de 250 mL, ensuite 3 solutions ont été préparées, une solution d'acide acétique à 10 %, et deux solutions de la soude caustique (NaOH) ; une à 8,3 % et l'autre à 17,5 %. 10 mL de la solution de la soude caustique à 17,5 % a été ajouté à la prise de masse d'holocellulose, cette solution doit être mélangé doucement à l'aide d'une baguette de verre pendant de 2 à 5 minutes, jusqu'à ce qu'elle soit adsorbée par échantillon d'holocellulose. Après 30 min (dissolution totale de l'hémicellulose), on a ajouté 33 mL d'eau déminéralisée et on continue l'agitation, doucement et attentivement et on laisse reposer pendant une heure. Après filtration le résidu et lavé avec la solution de NaOH à (8,3%), neutralisé avec de l'acide acétique à 10 % puis rincée avec de l'eau déminéralisée, en répétant l'opération jusqu'à ce que le filtrat devienne neutre ($\text{pH} = 7$). Après filtration on finit par séchage à 100°C pendant 24 heures et on le refroidit pendant 1 heure sous dessiccateur avant la prise de mesure de la masse [148]. Le taux d' α -cellulose contenue dans la biomasse lignocellulosique est exprimé par la relation III.5 :

$$\text{Taux d' } \alpha \text{ - cellulose (\%)} = ((m_i - m_f)/m_i) \times 100 \quad (\text{III.5})$$

Où m_i : masse initiale d'holocellulose (g) .

m_f : masse de la biomasse lignocellulosique après neutralisation (g).

III.2.6. Détermination du taux de β -cellulose (Hémicellulose)

Le taux d'hémicellulose c'est la différence entre la teneur en holocellulose et α -cellulose, il a été déterminé en utilisant l'équation III.6.

$$\text{Taux d' } \beta \text{ - cellulose (\%)} = ((\%)_{holocellulose} - (\%)_{\alpha\text{-cellulose}}) \quad (\text{III.6})$$

III.2.7. Détermination l'indice de lignine

Une prise de 2 g de la biomasse lignocellulosique a été inséré dans un tube à vis on ajoute un volume de 30 mL d'une solution d'acide sulfurique à une concentration de 72% , et on le laisse agir (sans agitation) pendant deux heures à température ambiante, après deux heures, la solution est diluée par 1 L et 124 mL d'eau distillé dans le but d'obtenir une solution à concentration massique d'acide sulfurique de 3% , cette solution dilué a été mise dans un flacon résistant aux faibles pressions, à la fin, le mélange est filtré à l'aide d'une pompe à vide en utilisant le creuset préalablement pesé, lavé à l'eau distillée et séché à l'étuve ventilée [151] . L'indice de la lignine est calculé à partir de la relation III.7

$$\text{Indice de la lignine (\%)} = ((m_i - m_f)/m_i) \times 100 \quad (\text{III.7})$$

Où m_i : masse initiale de la biomasse lignocellulosique (g).

m_f : masse de la biomasse lignocellulosique après le traitement acide (g).

III.2.8. Déterminations de la teneur en sucres réducteur par la méthode de Gabriel Bertrand

La méthode permet de doser les sucres réducteurs après une inversion exprimée en glucose ou le cas échéant tel que en cas de saccharose par conversion à l'aide d'un facteur 0,95, elle est applicable aux aliments composés ou les matières de la biomasse lignocellulosique, il y a lieu de doser séparément le lactose et d'en tenir compte dans le calcul des résultats [153].

III.2.9. Détermination des teneurs en polyphénols totaux de l'hydrolysat

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode décrite par Wood [154,155] 10 mg d'échantillon ont été dissous de la solution méthanol-eau. A un volume de 300 μ L d'extrait ou de fraction ont été ajoutés 1,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois.

Le mélange obtenu a été maintenu pendant 8 min à l'obscurité à la température ambiante (27 ± 3 °C), puis 1,2 mL de solution de carbonate de sodium à 75 g/L y ont été ajoutés. La solution a été maintenue pendant 30 min à l'obscurité à la température ambiante (27 ± 3 °C). La lecture de l'absorbance a été réalisée au spectrophotomètre UV-visible (Thermo Scientific evolution 201) à une longueur d'onde de 765 nm. L'acide gallique a été utilisé comme standard de référence pour l'établissement de la courbe d'étalonnage (voir annexe figure 1) et pour la quantification des teneurs en polyphénols totaux exprimées en μg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\mu\text{g}$ d'extrait).

III.2.10. Détermination de la teneur en protéines brutes

Le principe de la méthode est basé sur la transformation de l'azote organique en sulfate d'ammonium sous l'action de l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur le sulfate d'ammonium obtenu est distillé sous forme d'ammoniac et dosé après déplacement en milieu alcalin. Pour un dosage de protéines par la méthode de Kjeldahl, on distingue deux étapes :

Une déminéralisation : introduire dans un matras de minéralisation 1g de l'échantillon à analyser de la biomasse lignocellulosique, ajouter 25 mL d'acide sulfurique concentré et un catalyseur minéral d'un mélange de sulfate de cuivre CuSO_4 à 10% et du sulfate de potassium K_2SO_4 à 90%, placer les matras au dispositif de minéralisateur, une fois la solution devient claire, plus ou moins colorée, retirer les matras et laisser refroidir.

Une distillation : prélever 20 mL de la solution déminéralisée, ajouter 40 mL de soude 6N puis distiller (pour alcaliniser fortement le milieu), le distillat est recueilli dans une solution d'acide borique BH_3O_3 à une concentration de 4% destinée à fixer l'ammoniac, contenant l'indicateur coloré (mélange de bleu de méthylène). L'excès d'ammoniac est ensuite dosé par l'acide sulfurique 0,05 (virage au violet), en parallèle un témoin est préparé par la même procédure [156].

La teneur en azote total N est déterminée par la relation III.8 :

$$N \% = (V / V') * (N - N') * 0,05 * (1,4 / P) \quad (\text{III.8})$$

Où V : volume de la solution minéralisée complété à 100 mL.

V' : volume de la soude caustique ajoutée.

N : volume en mL d'acide sulfurique lue après titration.

N' : volume en mL d'acide sulfurique lue après titration de témoin.

0,05 : normalité de l'acide sulfurique.

P : poids (prise d'essai).

III.2.11. Détermination de la teneur en flavonoïde d'hydrolysat

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par spectrométrie UV-Visible (Thermo Scientific evolution 201) avec le trichlorure d'aluminium (AlCl_3). En présence de ce dernier, les flavonoïdes sont capables de former un complexe acide stable de couleur jaunâtre qui présente un maximum d'absorption aux environ de 430 nm. Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent de quercétine par milligramme d'extrait en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de la quercétine (voir annexe figure 2).

III.3. Caractérisation physique de la biomasse lignocellulosique

III.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

L'analyse par réflexion totale atténuée - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-IRTF) a été réalisée sur un spectrophotomètre ThermoScientific Nicolet IS 10 Model (Thermo Electron Scientific Instruments IIC, Fitchburg, WI 53711, USA), équipé du module ATR ThermoScientific Smart iTR. Les déchets de sarments de la vigne de la variété cardinale ont été broyés pour obtenir des particules d'une taille inférieure à 1 mm, tamisés à nouveau (500 μm d'ouverture) et séchés à l'étuve à une température de 45 °C pendant une nuit, puis placés directement sur le cristal ATR (C/ZnSe). L'équipement a fonctionné en mode d'absorption et de transmission avec une résolution de 2 cm^{-1} et un total de 40 balayages dans la gamme de 4000-600 cm^{-1} .

III.3.2. Analyse thermique simultanée

La stabilité thermique de la biomasse lignocellulosique a été étudiée par analyse thermique simultanée, technique TG-DSC (thermogravimétrie couplée par une calorimétrie différentielle à balayage) en utilisant un analyseur NETZSCH (modèle STA 409 PC LUXX). Le but de cette analyse est de déterminer la stabilité thermique de la biomasse lignocellulosique et aussi de caractériser et d'observer la phase de transition et l'interaction de l'échantillon avec la température. Dans un creuset d'alumine (Al_2O_3) 6,754 mg de biomasse lignocellulosique a été chauffé avec une vitesse de 10 °C/min et un flux de 10 mL/min de l'argon gazeux utilisé comme gaz vecteur. L'analyse a été effectuée dans une fourchette de température entre 25 à 550 °C.

III.3.3. Analyse par spectroscopie de fluorescence de rayons X (FRX)

Dans la présente étude, l'analyse FRX a été réalisée à l'aide d'une spectroscopie FRX-1800 (Shimadzu, Japon) sous vide pour déterminer la composition minéralogique de la biomasse lignocellulosique, cette dernière a été broyée et tamisée par un tamis de 0,050 mm de porosité, mis en forme par le procédé de pressage à froid à l'aide d'une presse uni-axiale pour obtenir un échantillon sous forme de pastille.

III.3.4. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X a été effectuée pour identifier les phases cristallines présentés dans la biomasse lignocellulosique, de déterminer leurs caractéristiques cristallographiques, et de la régularisation des bandes qui forment la structure des polysaccharides [157]. L'analyse a été effectuée dans un diffractomètre de marque D8 Advance Bruker, Allemagne, qui fonctionne en mode de transmission sous une tension de 40kV et un courant de l'ordre de 35 mA en utilisant la raie de radiation monochromatique K_{α} du cuivre de longueur d'onde $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$. La biomasse lignocellulosique a été balayée pour le nombre d'onde 0-4000 cm^{-1} . Les intensités de diffraction (2θ) ont été mesurées dans un intervalle angulaire compris entre 10 et 120° par pas de 0,01°, et une vitesse de balayage de 01°/ min.

Afin de déterminer le taux de cristallinité de la cellulose, on a opté pour la détermination de l'indice de cristallinité, par la méthode empirique de la hauteur du pic de DRX, en utilisant l'équation III.9 [158] :

$$\text{Cr I} = ((I_{002} - I_{AM})/I_{002}) \times 100 \quad (\text{III.9})$$

Où I_{002} : est l'intensité de diffraction par le plan (002) à un angle 2θ entre 22° et 23°,

I_{AM} : Intensité diffusée par la phase amorphe de l'échantillon qui est prise à un angle 2θ angle entre 18° et 19° (intensité minimale)

$I_{(002)}$ représente à la fois le matériau amorphe et cristallin alors que $I_{(AM)}$ représente seulement la partie amorphe. Cette méthode suppose que la contribution de la partie amorphe soit la même à 18° à 22.7°

III.3.5. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Cette technique capable d'obtenir des images de la surface des échantillons d'une biomasse lignocellulosique étudié en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Les images de micrographies de déchets de taille de vigne cardinale traité et non traité ont été obtenues grâce à un microscope électronique à balayage de type FEI Quanta 650 (W)

Tungstène à une tension d'accélération de 2 kV, 5 kV et 10 kV à un grossissement de 100, 140, 200, 280, 400, 500 et 800 fois, qui permet d'analyser des échantillons non conducteurs tels que les végétaux en utilisant un film conducteur. Les micrographies obtenues permettent d'observer la microstructure de la surface de la poudre végétale de sarment de vigne.

III.4. Prétraitement de biomasse lignocellulosique

III.4.1. Prétraitement thermolyse

L'extraction liquide à l'eau chaude a été utilisée pour éliminer les impuretés hydrosolubles des déchets de sarment de la vigne de variété cardinale. 25 g de déchets ont été trempés dans 500 mL d'eau à 100 °C pendant 24 heures, sous agitations (500 tr/min). Les échantillons ont été séchés à 50 °C sous vide pendant 24 heures après l'extraction et refroidis sous dessiccateurs pendant 2 heures.

III.4.2. Trempage dans une solution alcaline

25 g de déchets de sarments de vigne de variétés Cardinale ont été trempés dans une solution d'hydroxyde de sodium 1 M avec un rapport solide/liquide de 1/8. L'échantillon a été laissé pendant 24 heures à température ambiante avant d'être traité, sous agitations (500 tr/min). (500 tr/min). Après trempage, un lavage à l'eau chaude déminéralisée et utilisés directement pour l'extraction des sucres réducteurs sans aucune neutralisation.

III.4.3. Prétraitement à l'acide dilué

5 g de la biomasse lignocellulosique a été trempé dans une solution d'acide sulfurique H₂SO₄ à une concentration de 3% (m/v) avec un rapport (liquide/solide) (1/20) pendant une heure à une température ambiante sous une faible agitation, en suite cette solution est maintenue dans un autoclave pendant 30 minute à une température de 120 °C. Ce prétraitement permet d'éliminer toute trace de la lignine.

III.5. Mode d'extraction des sucres réducteurs

III.5.1. Extraction sous reflux par l'acide trifluoroacétique (CF₃CO₂H)

L'extraction du sucre a été réalisée dans un Bicol à fond plat de 500 mL contenant une solution d'acide diluée de Trifluoroacétique (CF₃CO₂H) avec la biomasse lignocellulosique. Le montage a été associée avec un régulateur de température RDT (Resistance Temperature Detector) capteur de température (Pt 100) au point de consigne souhaité soumis à une plaque chauffante numérique équipé d'un agitateur numérique sous reflux à l'aide d'un condenseur à eau (30 cm) à serpentin de GRAHAM. Après extraction, l'hydrolysate est refroidi à l'eau, filtré sous vide pour éliminer les impuretés de la biomasse lignocellulosique ensuite

neutralisé avec NaOH (1 N) jusqu'à un pH=5 et 10. La délignification et la détoxification d'hydrolysats ont été effectuées avec 3 g/L de poudre de charbon de bois, filtrée sous vide avec le creuset filtrant N°3. L'hydrolysat a ensuite été centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 minutes, filtré par un papier filtre à travers un entonnoir, aspergé d'azote gazeux, stérilisé en autoclave à 121 °C pendant 20 minutes et enfin refroidi à 4 °C.

III.5.2. Extraction sous micro-onde par l'acide sulfurique

L'hydrolyse acide est réalisée à l'aide d'acide sulfurique dans des concentrations variantes à 4 %, 5.5 %, 7 %. Le mélange variant de 2 à 6 % (m/v) a été traité sous micro-onde à une puissance d'irradiation de 350 à 650 W pendant un temps de 40 à 90 min. Après refroidissement, l'hydrolysat liquide a été séparé et purifié par centrifugation et filtré (Filtration Büchner) (filtre Whatman).

III.5.3. Extraction par saccharification (hydrolyse enzymatique)

Trois types d'activités enzymatiques complémentaires ont été choisis pour l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique explicités ci-dessous

- L'activité enzymatique de l'enzyme commercial cellulolytic cocktail SN 50100
1mL équivalent à 729,47± 26 U.
- L'activité enzymatique de l'enzyme Celluclast 1,5L (Novozymes)
1mL équivalent à 71,84 ±1,3 U.
- L'activité enzymatique de la cellulase : 1mg équivalent à 120 U cellulase à partir aspergillus Niger 1,4 - (1,3 : 1,4) – β-D-glucane,1,4 glucanohydrollase.

Où 1U : correspond à la production d'une μmole de sucres réducteurs par minute dans des conditions de température et de pH contrôlées.

III.5.3.1. Préparation une solution tampon d'acétate de sodium à un pH = 4

Dissoudre une quantité de 4g d'acétate de sodium (C₃H₃NaO₂) dans un volume de 300 mL d'eau déminéralisée sous agitation ; après dissolution, le volume est ajusté à 500 mL.

Afin d'ajuster le pH à une valeur de 4 on divise la solution préparée en deux volumes, pour une utilisation ultérieure dans le but d'une correction de la neutralisation de pH, ensuite on ajuste le pH à la valeur voulue avec une solution acide acétique pure.

III.5.3.2. Technique de Saccharification

L'efficacité de commercial cellulolytic cocktails SN 50100 d'enzyme *T. amestolkiae* en tant que suppléments de β-glucosidase pour la saccharification des sucres a été étudiée à l'aide

d'une biomasse lignocellulosique du sarment de la vigne de variété cardinale soumise à trois prétraitements différents : **i)** un hydro thermolyse, **ii)** trempage à une solutions d'acide caustique (milieu alcalin) ; **iii)** un prétraitement à l'acide sulfurique dilué à l'autoclave pendant 20 minuté à une température de 120 °C. La biomasse a été lavée trois fois avec de l'eau déminéralisée, le pH a été ajusté à 5 avec une solution d'acide sulfurique, ensuite déshydraté, lyophilisé et stocké pour une utilisation ultérieure.

1g de la biomasse prétraitée a été saccharifiée à l'aide de la cellulase de différents types dans un volume de 20 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium à une concentration de 0,1 M et pH= 4, incubé dans un incubateur- agitateur à une température de 40 °C, sous agitation magnétique de 150 tr/min, pendant 96 heures. La cellulase Celluclast 1.5L (Novozymes) a été utilisé comme cocktail commercial de base, pauvre en β -glucosidase mais riche en activités cellobiohydrolase et endoglucanase [159].

La saccharification a été réalisée comme suit :

1 U d'activité enzymatique l'enzyme cellulase de type Celluclast 1.5L Novozymes avec 2 U d'activité l'enzymatique de la cellulase de type commercial cellulolytic cocktail SN 50100 (voir partie III.5.3).

L'hydrolyse enzymatique avec différents types d'enzyme de la cellulase été fait pour une comparaison sous des différents rapports de la biomasse lignocellulosique.

La figure III.4 représente les enzymes de la cellulase utilisé pour la saccharification de biomasse lignocellulosique pour la production d'un biocarburant de la deuxième génération.

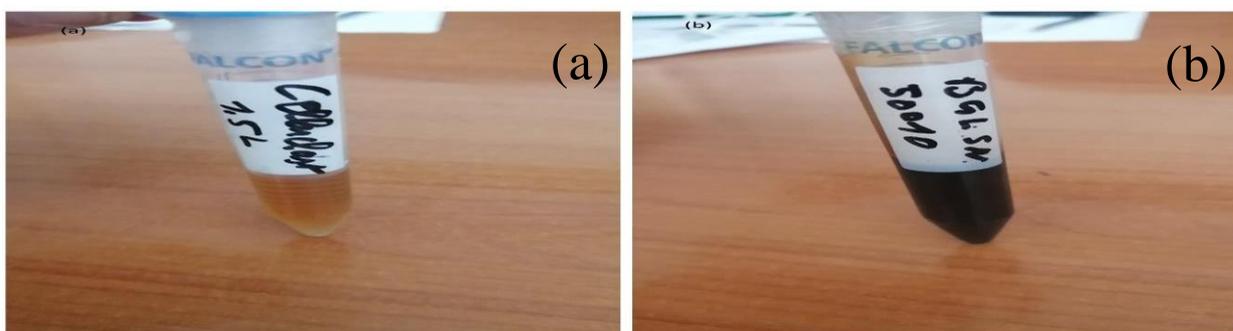


Figure III.4 : Cellulase (a) celluclast 1,5L (Novozymes), (b) commercial cellulolytic cocktails SN 50100

III.6. Détoxification d'hydrolysat de déchets de sarments cardinaux

III.6.1. Détoxification par saturation à l'aide d'hydroxyde de calcium

une méthode peu coûteuse et très efficace de détoxification de l'hydrolysat de déchets de sarments de la vigne de cardinale a été étudiée en utilisant une solution aqueuse de bio-détoxification humide d'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$; comme réactif neutralisant d'acide pour la précipitation des composés toxiques de l'hydrolysat, bien qu'elle présente un inconvénient en termes de perte de sucre, cette méthode fournit un pH doux et stable sans génération de composés phénoliques, une méthode pratique pour simplifier le processus, réduire le temps, le coût et la main d'œuvre. La détoxification a été effectuée en ajoutant d'abord une solution aqueuse humide de bio-détoxification à l'hydrolysat pour ajuster le pH à 10, l'hydrolysat initial neutralisant a été maintenu dans ces conditions à 50°C plus au moins 2°C pendant 40 min sous agitation à l'aide d'une plaque chauffante équipé d'une thermocouple, puis le pH a été réduit à 5 par une ré-acidification en ajoutant de l'acide sulfurique H_2SO_4 , ensuite il a été ré-filtré dans les mêmes conditions précédentes pour élimination tout précipité formé, le filtrat a été laissé à l'aération dans le but de débarrassé des substances volatiles après le processus de détoxification, la boue de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a ensuite été filtrée à travers un papier filtre (Whatman) sous une pompe à vide, bullé avec de l'azote gazeux pendant 5 heures pour éliminer la lignine condensés, L'hydrolysat liquide détoxifié a été stérilisé à 121°C pendant 20 mn et stocké à 4°C pour utilisation ultérieure, l'hydrolysat détoxifié stériles a été utilisé directement pour la fermentation [160,161].

III.6.2. Détoxification par charbon actif et barbotage à l'azote

Le procédé aux charbons actifs consiste à mettre en contact un hydrolysat et des charbons actifs. Ce procédé, utilisé pour éliminer les composés phénoliques, et aussi elle a montré également une aptitude à diminuer les concentrations en furanes et acide acétique [162]. La régénération du charbon actif se fait rapidement et simplement en l'immergent dans une eau bouillante pendant quelques heures de temps, mettre en contact un gramme de charbons actifs et 100 mL d'un hydrolysat extrait par micro-onde sous une concentrations dilué d'acide sulfurique ou celle par extraction à reflux par utilisations l'acide Trifluoroacétique pendant 12 heures.

III.7. Procédures analytiques des sucres réducteurs

III.7.1. Préparation du réactif DNS (3,5-acide dinitrosalicylique)

Le réactif DNS a été préparé en utilisant 1,0 g d'acide 3, 5-dinitrosalicylique, 200 mg de phénol cristallin et 50 mg de sulfite de sodium dissous dans 100 mL de NaOH à 1 %. Le sel de Rochelle $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a été préparé en dissolvant 40 g de tartrate de potassium et de sodium dans 100 mL d'eau distillée [163].

Le réactif DNS se prépare à chaud et sous agitations jusqu'à avoir un liquide homogène, ainsi qu'il son conditionnement à l'ombre (le flacon est revêtu par un film d'aluminium) à 4 °C de préférence.

Les concentrations en sucre ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage utilisant le glucose comme standard (voir annexe figure 3).

III.7.2. Dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS

Cette technique est basée sur l'utilisation des propriétés réductrices du glucose dans un milieu alcalin et à chaud. Dans cette réaction l'acide 3,5- dinitrosalicylique ou DNS (aussi appelé acide 2-hydroxy- 3,5 dinitro-benzoïque) subit une réduction. Le dosage des sucres réducteurs est déterminé par la méthode chimique au DNS, les concentrations en sucres réducteurs sont exprimées en équivalent glucose (g/g de matière sèche). Les sucres réducteurs ont été estimés par la méthode de l'acide dinitro salicylique (DNS). 1 mL d'hydrolysate a été mélangé à 1,5 mL de réactif DNS, puis bouilli dans un bain-marie à 100 °C pendant 5 minutes. L'échantillon obtenu a été refroidi avec de l'eau, puis 7,5 mL d'eau distillée ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 510 nm [164].

III.8. Optimisation des sucres réducteurs par la méthode des plans d'expériences

- **Plans d'expériences**

Le screening et l'optimisation du processus d'extraction des sucres réducteurs à partir de la biomasse lignocellulosique du sarment de la vigne de variété cardinale a été basée sur l'utilisation des plans de Plackett-Burman, Box Behnken, et central composite design en vue d'économiser l'énergie et l'efficacité énergétique pour un développement durable dans le but de construire un monde sûr et sain basé sur les 12 principes de la chimie verte.

III.8.1. Plan de Plackett Burman

Le plan de Plackett-Burman a été utilisé pour identifier les facteurs significatifs, parmi les six facteurs considérés dans cette étude qui influencent et modifient le rendement de l'extraction des sucres réducteurs extrait à partir de la biomasse lignocellulosique. Le plan était basé sur le modèle polynomial de premier ordre suivant :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^F \beta_i X_i \quad (\text{III.10})$$

Où Y : variable dépendante (la réponse), à savoir le rendement de l'extraction en sucres réducteurs.

β_0 : coefficient constant = l'intercepte du modèle = le terme de décalage.

β_i : effet linéaire.

F : numéro de la variable (d'entrée) ; dans notre cas F=6.

X_i : variables indépendantes (les facteurs).

Dans la présente étude, six facteurs (variables indépendantes) ou (intrants) comprenant la vitesse d'agitation X_1 , les concentrations d'acide Trifluoroacétique X_2 , la température X_3 , le rapport (solide/liquide) X_4 , la taille des particules de poudres X_5 , le temps d'extraction X_6 , ont été étudiés afin d'identifier les facteurs significatifs pour le rendement d'extraction en sucres réducteurs. D'autre part, les six facteurs ont été évalués dans le cadre d'un plan de Plackett Burman en 12 étapes. Chaque facteur a été évalué à deux niveaux : -1 pour le niveau bas et +1 pour le niveau haut. Le plan est présenté dans le tableau III.1 et les rendements d'extraction des sucres réducteurs donnés sont la moyenne de trois répétitions.

Tableau III.1 : Variables et les niveaux dans la conception statistique pour le criblage affectant le rendement de l'extraction du sucre

Variables	Facteurs	Niveau bas (-1)	Niveau haut (+1)
X_1	Vitesse agitation (tr/min)	500	750
X_2	Concentration d'acide TFA (%)	1	10
X_3	Température (°C)	60	100
X_4	Rapport (g/100 mL)	1	5
X_5	Taille des particules (μm)	125	500
X_6	Temps d'extractions (min)	20	180

III.8.2. Plan de Box Behnken

Le nombre d'expériences a été calculé selon l'équation suivante

$$N = K^2 + K + C_p \quad (\text{III.11})$$

Où K : nombre de facteurs, K = 3 dans cette étude,

C_p : nombre de répétitions des points centraux (C_p = 3) dans la présente étude.

L'analyse multi-régression des données pour ajuster une équation polynomiale de second ordre (modèle quadratique) a été effectuée selon l'équation suivante, qui prédit les conditions optimales de l'extraction des sucres réducteurs.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^F \beta_i X_i + \sum_{i=j-1}^F \sum_{i=j-1}^F \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^F \beta_{ii} X_i^2 \quad (\text{III.12})$$

Où Y est la variable dépendante (la réponse), à savoir le rendement d'extraction en sucres réducteurs, β_0 est le coefficient constant (interception du modèle ou le terme de décalage), β_i , β_{ii} et β_{ij} sont les coefficients des effets linéaires, quadratiques et interaction respectivement, F est le numéro de la variable (les entrées), X_i et X_j représentent sont les variables indépendantes.

Dans cette étude, un plan de Box Behnken à trois facteurs et trois niveaux a été utilisé pour optimiser les paramètres des facteurs sélectionnés, tels que la concentration en acide trifluoroacétique, X₁, le rapport (solide/liquide), X₂, le temps d'extraction, X₃, afin de maximiser le rendement d'extraction du sucre, ce qui a donné lieu à 15 essais. Chaque facteur a été évalué à trois niveaux (-1) pour le niveau bas et (0) pour le niveau moyen ou central et (+1) pour le niveau haut. Le plan est présenté dans le tableau III.2 et les rendements d'extraction en sucres réducteurs donnés sont la moyenne de trois répétitions.

Les expériences ont été réalisées dans un ordre aléatoire afin d'éviter tout biais et de réduire les résultats de la variabilité imprévue des réponses due à des facteurs non pertinents.

Tableau III.2 : Variables et les niveaux dans la conception statistique pour l'optimisation affectant le rendement de l'extraction du sucre

Variables	Facteurs	Niveau	Niveau	Niveau haut
		bas (-1)	moyen (0)	(+1)
X ₁	Concentration en acide TFA (%)	1	5,5	10
X ₂	Rapport (g/100 mL)	1	3	5
X ₃	Temps d'extraction (min)	20	100	180

III.8.3. Plan centrale composite

Un plan central composite, avec quatre variables et trois niveaux, a été choisi au cours de ce travail de recherche. Il a été appliqué pour obtenir un modèle polynomial de second ordre qui présente le rendement en sucre réducteur en fonction de 4 variables indépendantes, à savoir le temps d'extraction, le rapport liquide/solide, la concentration d'acide sulfurique et la puissance d'extraction de micro-onde. Toutes les expériences ont été réalisées de manière aléatoire. Le modèle de surface de réponse, qui vise à décrire la variable dépendante Y (la réponse) (sucre réducteur) en fonction des variables indépendantes est donné par l'équation suivante

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^F \beta_i X_i + \sum \sum_{i=j-1}^F \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^F \beta_{ii} X_i^2 \quad (\text{III.13})$$

Où β_0 , β_i , β_{ii} , et β_{ij} sont les constantes des coefficients de régression du modèle testé, tandis que X_i , X_j , et Y sont les variables indépendantes et dépendantes, respectivement.

Dans la présente étude, la méthodologie de la surface de réponse (MSR) a été appliquée aux conditions optimales pour la concentration en sucre réducteur (%). Les niveaux et les plages des variables indépendantes ou des facteurs sont indiqués dans le tableau III.3. Le temps d'extraction était compris entre 40 et 90 minutes, la concentration d'acide sulfurique entre 4 et 7 %, le rapport solide-liquide entre 2 et 6 g/100 mL et la puissance d'extraction de micro-onde entre 350 et 650 watts. Les variables codées et non codées, correspondant au plan choisi, sont également présentés dans le tableau III.3. Les niveaux des facteurs ont été basés sur les données expérimentales. Le plan étudié était le plan composite central (PCC), avec quatre variables indépendantes, une variable dépendante et trois niveaux (-1, 0 et 1), et comprenant 27 expériences comme détaillé dans le tableau IV.9 (résultats et discussion). Pour minimiser l'effet de la variabilité inexplicée de la réponse observée, les expériences

ont été réalisées dans un ordre aléatoire. L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel JMP (version 13, SAS). L'impact des variables indépendantes sur les réponses testées (concentration de l'extraction de sucre réducteur à partir de déchets de sarments cardinaux) est justifié par l'analyse des données de variance (ANOVA). Si la probabilité (p) est inférieure à 0,05, alors le facteur testé est significatif.

Tableau III.3 : Variables et les niveaux dans la conception statistique pour l'optimisation affectant le rendement de l'extraction du sucre

Variables	Facteurs	Niveau bas (-1)	Niveau moyen (0)	Niveau haut (+1)
X ₁	Puissance des radiations (watt)	350	500	650
X ₂	Temps d'extractions (min)	40	65	90
X ₃	Concentrations en acide (%)	4	5,5	7
X ₄	Rapport (g/100 mL)	2	4	6

III.9. Analyse statistique des plans d'expériences

Une analyse statistique du modèle a été effectuée pour évaluer l'analyse de la variance (ANOVA), l'analyse comprend le test de Fisher (F-test), sa probabilité associée P (F) et le coefficient de détermination (R²) qui mesure la qualité de l'ajustement du modèle de régression. La surface de réponse et les courbes de niveau des réponses prédites du modèle ont été utilisées pour accéder à l'interaction entre les facteurs significatifs.

Le logiciel JMP Pro13 a été utilisé pour la conception des expériences ainsi que pour l'analyse de la régression des données expérimentales obtenues.

III.9.1. Validation des modèles mathématiques

Pour valider les modèles testés, deux paramètres statistiques ont été appliqués dans cette étude. Les expressions du coefficient de détermination (R²) et la racine carrée de l'erreur quadratique moyenne (RMSE) sont données par les expressions suivantes :

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{ei} - Y_{pi})^2}{n}} \quad (\text{III.14})$$

$$R^2 = 1 - \sum_{i=1}^n \left(\frac{(Y_{ei} - Y_{pi})^2}{(Y_m - Y_{pi})^2} \right) \quad (\text{III.15})$$

Où n : nombre d'expériences.

Y_{ei} : concentration expérimentale de sucre réducteur.

Y_{pi} : concentration de sucre réducteur.

Y_m : concentration moyenne de sucre réducteur obtenue à partir des expériences.

III.10. Procédure analytique pour une fermentation alcoolique

- **Partie microbiologique**

Dans le cadre de la production de bioéthanol de deuxième génération via la fermentation d'une biomasse lignocellulosique du sarment de la vigne de variété cardinale en adoptant les différentes étapes selon le protocole suivant :

III.10.1. Préparation des milieux de cultures solides

III.10.1.1. Préparation du milieu de culture Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YEPDA)

Deux milieux YEPDA solide sont préparé à deux pH différents (pH=5,10 et pH neutre) pour cultiver, suivre le comportement et la croissance des levures *Saccharomyces cerevisiae* sélectionnées ; dans 2 flacons contenant chacun 10 g de glucose, 5 g d'extrait de levure en poudre, 5 g de peptone, est complété par 11 g d'agar on ajoute 500 mL d'eau distillée, chaque flacon est additionné de deux d'antibiotiques (0,4 g amoxicilline tri-hydrate et 0,025 g chloramphénicol) dans le but d'inhiber toute croissance bactérienne. Le milieu YEPDA a été mélangé pendant 2 h, le pH du milieu acide est ajusté à 5,10 avec de l'acide chlorhydrique (2 M), tout en vérifiant la neutralité du deuxième milieu YEPDA puis on les stérilise à 120 °C pendant 20 minutes à autoclave.

III.10.1.2. Préparation des milieux de culture

L'étape la plus importante dans cette partie est de préparé un environnement de travail stérile en nettoyant la paillasse à l'aide d'un oxydant, généralement on utilise de l'eau javel pour éviter toutes les contaminations des micro-organismes non cibles et d'élimination de certains germes pathogènes ou non pathogènes et par l'allumage des becs bunsen.

En premier lieu, les milieux de cultures solides YEPDA stérilisés sont liquéfiés dans un four micro-ondes, laissés les refroidir pendant quelques minutes puis couler environ 20 mL du milieu dans chaque boîte de Pétri soit en verre préalablement autoclavées à la fin on les laisse

pour se solidifier afin de nous permettre l'ensemencement des souches de levure en formes de stries.

- **Préparation de l'eau physiologique**

Eau physiologique stérile est une solution physiologique isotonique, une solution salinée, elle est composée d'eau déminéralisée stérile et de chlorure de sodium (NaCl) de 0.9 % (m/ v), elles sont utilisées pour les préparations des suspensions microbiennes, son objectif c'est de garder la souche active.

III.10.2. Revivification et vérification de la pureté des levures

Dans ce présent travail, deux espèces de la levure boulangère *Saccharomyce cerevisiae* de différents paramètres de croissances ont été sélectionnée pour la production du bioéthanol à savoir :

III.10.2.1. Vérification des levures

- **La levure *Saccharomyces cerevisiae* lyophilisée**

La *Saccharomyce cerevisiae* lyophilisée a été fournie par l'industrie de production des parfums, zone industrielle Reghaia. Pour la revivification de cette souche, nous avons reconstitué environ 0,1 g de la poudre dans 10 mL d'eau physiologique stérile puis une goutte a été prélevée et ensemencée dans des boîtes à pétri contenant le milieu de culture solide YEPDA avec un pH 5, les cultures sont incubées dans l'étuve à 37 °C pendant 48h.

- **La levure *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 9763**

La *Saccharomyce cerevisiae* ATCC® 9763 a été fournie dans un tube contenant une gélose inclinée YEPDA par le centre de recherche et de développement Saïdal d'El Harrach, Alger. La souche a été repiquée directement dans le milieu de culture solide YEPDA avec un pH =7, incubées à 37 °C pendant 48h.

- **La levure *Saccharomyces cerevisiae* ACTIFLORE® ROSÉ**

La *Saccharomyce cerevisiae* lyophilisée ACTIFLORE® ROSÉ sous forme de poudre, nous avons reconstitué environ 0,1 g de la poudre dans 10 mL d'eau physiologique stérile puis une goutte a été prélevée puis ensemencée dans des boîtes à pétri contenant le milieu de culture solide YEPDA avec un pH = 5, les cultures sont incubées à 27 °C pendant 48h.

III.10.2.2. Vérification de la pureté des levures

Pour vérifier la pureté des levures, deux examens sont effectués à partir des cultures jeunes des levures : un examen macroscopique et un autre par observation microscopique.

- **Examen macroscopique**

L'examen macroscopique est un examen de routine qui pour but de confirmer l'homogénéité des colonies après croissance indiquant ainsi que la pureté de la souche utilisée.

- **Examen microscopique à l'état frais :**

Pour la réalisation de cet examen une colonie de chaque levure est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur est déposée sur une goutte de l'eau distillée préalablement mise au centre de la lame puis recouvrir le tout par une lamelle au-dessus. L'observation au microscope se fait tout d'abord à l'objectif x40 puis x100.

III.10.2.3. Conservation des levures

Pour des utilisations ultérieure des souches revivifiables une étape de conservation de ces dernières est primordiale, la méthode la plus simple et la plus utilisée pour conservation de leur viabilité allant jusqu'à 6 mois consiste à repiquer les levures dans des tubes de gélose YEDPA incliné avec leur pH adéquat (voir annexe Figure III.10), les cultures sont incubées pendant 48h à leur température optimale, 37 °C pour la levure *lyophilisé*, 30 °C pour *ATCC® 9763*, et 27 °C pour *Actiflore® rosé* pour permettre une croissance maximale, puis elles sont stockées à 4°C.

- **Détermination de la température et pH optimum de la croissance des deux levures de *Saccharomyces cerevisiae***

Dans le but d'optimiser, de sélectionner, le pH et la température optimale de la croissance, ainsi que d'améliorer la production de bioéthanol extrait à partir de la biomasse lignocellulosique, nous avons utilisé la méthode conventionnelle One Factor at a time (OFAT) sur un milieu solide. Des boîtes de pétri contenant le milieu de culture YEPDA solide, ajusté à différents pH (4, 5, 6, et 7) sont préparés, ensuite chaque levure estensemencée dans chaque boîte et incubées pendant 3 jours à différentes température (27, 30, 37, 40, et 45°C), par la suite une observation macroscopique de la croissance est enregistrée de la manière suivante : (+++) représente une forte croissance, (++) une

croissance moyenne, (+) une faible croissance et (-) indique l'absence de croissance levurienne, cela permet d'identifier la qualité de nos levures, qu'elle soient psychophile, mésophiles, thermophiles, extrêmement thermophiles ou thermo-tolérantes.

III.11. Production du bioéthanol

III.11.1. Préparation des mouts de fermentation

Un mout de fermentation est défini comme étant un liquide riche en sucres réducteurs détoxifié pour éviter la présence des inhibiteurs ; Il a été extrait à partir de la biomasse lignocellulosique des sarments de la vigne afin de le servir comme une matière première dans les bioraffineries.

III.11.1.1. Préparation des hydrolysats détoxifiés

- **Préparation des hydrolysats détoxifiés sans aucun enrichissement**

Dans ce cas, 100 mL d'hydrolysats détoxifiés par différentes méthodes (voir III.5. Mode d'extraction des sucres réducteurs) ont été mis dans 4 erlenmeyers de 500 mL sans l'ajout d'autres produits.

- **Préparation d'hydrolysats détoxifiés avec enrichissement**

L'enrichissement consiste à ajouter des ingrédients aux hydrolysats prétraités, destinés pour la fermentation alcoolique dans le but d'améliorer le rendement en matière de la production du bioéthanol issue de la biomasse lignocellulosique, pour cela les ingrédients suivants ont été ajoutés à un litre d'hydrolysat : sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1g); phosphate mono-potassium $(\text{KH}_2)\text{PO}_4$ (1g); d'extrait de levure (5g) ; sulfate de magnésium hepta-hydrate, (le sel d'Epsom ou Epsomite) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1g) , Chloramphénicol $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$ (0,4g).

- **Ajustement de pH**

Dans chaque erlenmeyer de 500 mL, nous avons ajouté 100 mL d'hydrolysats détoxifiés par différentes méthodes (voir III.5. Mode d'extraction), Ensuite le pH optimal de chaque levure a été ajusté en fonction des conditions de croissance spécifiques de chaque levure. (La *Saccharomyce cerevisiae* ATCC® 9763, pH=7), (La levure *Saccharomyces cerevisiae* *Lyophilisée*, pH= 5), l'ajustement est fait par l'utilisation d'une solution, soit l'acide sulfurique (1N) ou la soude caustique (1N).

- **Stérilisation par un traitement thermique sous autoclave**

Les mouts de fermentation (hydrolysats détoxifiés) obtenus sont stérilisés dans l'autoclave pendant 20 minutes sous une température de 120 °C, l'agent stérilisant est la vapeur d'eau.

III.11.1.2. Préparation de la biomasse destinée à la saccharification enzymatique

Dans chaque erlenmeyer stérile nous avons mis 10 g de biomasse lignocellulosique de sarment de la vigne de variété cardinale, puis nous avons ajouté 100 mL d'une solution tampon acétate de sodium à un pH = 4, qui doit également être stérile, à la fin, nous avons ré-stérilisé le mélange à 120 °C pendant 20 min dans un autoclave.

- **Préparation d'inoculum des levures**

L'inoculum est préparé en utilisant des levures jeunes après 48 h d'incubation, elles seront recueillies dans de l'eau physiologique stérile, en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible les cellules sont ajustées d'une manière à atteindre un niveau de biomasse initial d'environ 1 à une longueur d'onde de 600 nm ($DO_{600} = 1$) cette suspension levurienne équivalent à (10^7 cellules/mL).

III.11.2. Procédés de fermentation

Pour la production du bioéthanol de deuxième génération à partir de la biomasse lignocellulosique des sarments de vigne, nous avons utilisé 3 procédés de fermentation : une fermentation des hydrolysats détoxifiés issus des traitements physico-chimiques, deux autres types de fermentations par l'utilisation des enzymes cellulosiques, appelés procédé de saccharification et fermentation séparées et procédés de saccharification et fermentation simultanées.

III.11.2.1. Production du bioéthanol issue de la saccharification et la fermentation simultanée

La saccharification et la fermentation simultanées ont été réalisées en utilisant 10 g de la biomasse lignocellulosique de sarment de la vigne préparée dans 100 mL du tampon acétate de sodium à un pH 4, ensuite d'une stérilisation dans un autoclave à 120 °C pendant 20 min. Après refroidissement, les enzymes cellulosiques (Cellulase 1.5L Novozymes et commercial cocktail SN 50100) et l'inoculum 1 % (v/v) des souches *Saccharomyce cerevisiae* ATCC® 9763, lyophilisée ont été ajoutées simultanément et la teneur en bioéthanol récupérée a été estimée par la méthode standard de dosage du $K_2Cr_2O_7$ après l'échantillon a subi une distillation. Contrairement à la Saccharification et la fermentation simultanée à partir de

l'enzyme cellulase extrait d'*Aspergillus Niger* 1,4 - (1,3 : 1,4) - β -D-glucane, 1,4 glucanohydrolase, 10g de la biomasse lignocellulosique préparée dans 100 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium à un pH 4,8 avec 0,5% de la cellulase, incubé à 27 °C pendant 48 heures sous une agitation de 250 tr/min, fermenté par un inoculum 1% de la souche levurière de *Saccharomyces cerevisiae* ACTIFLORE® ROSÉ.

III.11.2.2. Production de bioéthanol issue de la saccharification et fermentation séparée

Après 96 heures d'incubation de la biomasse lignocellulosique du sarment de vigne avec les deux types d'enzymes cellulosiques (Cellulase 1.5L Novozymes et commercial cocktail SN 50100) dans des tampons acétate de sodium à pH = 4, les hydrolysats obtenus à partir de la saccharification qui sont riches en sucres réducteurs ont été fermentés en éthanol en utilisant 1 % (v/v) de l'inoculum des deux souches standard de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC et *Lyophilise*). Après incubation dans différentes températures. Les échantillons ont été soumis à une distillation pour extraire l'éthanol des mouts de fermentation puis dosé par la méthode de dichromate (figure III.6). Contrairement à la souche standard de *Saccharomyces cerevisiae* ACTIFLORE® ROSÉ., fermenté a des conditions citées comme suit : vitesse agitation 150 (tr/min), pH 4.8, temps et température d'incubation égale à 48 heures et 27 °C respectivement, après une saccharification déroulée dans ces conditions, température incubations 37 °C, temps incubations 96, vitesse agitations 250 (tr/min), pH = 5.

III.11.2.3. Fermentation des hydrolysats détoxifiés issus des traitements physicochimiques

Comme le montre la figure III.5 ; les hydrolysats détoxifiés, avec et sans enrichissement sont inoculés avec 1 % (v/v) de l'inoculum des deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC et *lyophilise*), puis chacune est incubée à sa température optimale pendant 96 heures sous une agitation de 150 tr/min, une fois la fermentation est achevée le bioéthanol produit est extrait par une distillation suivie d'un dosage au dichromate de potassium. Le rendement de l'éthanol est le rapport entre la quantité de bioéthanol produite par la quantité des sucres réducteurs initial (g/g).

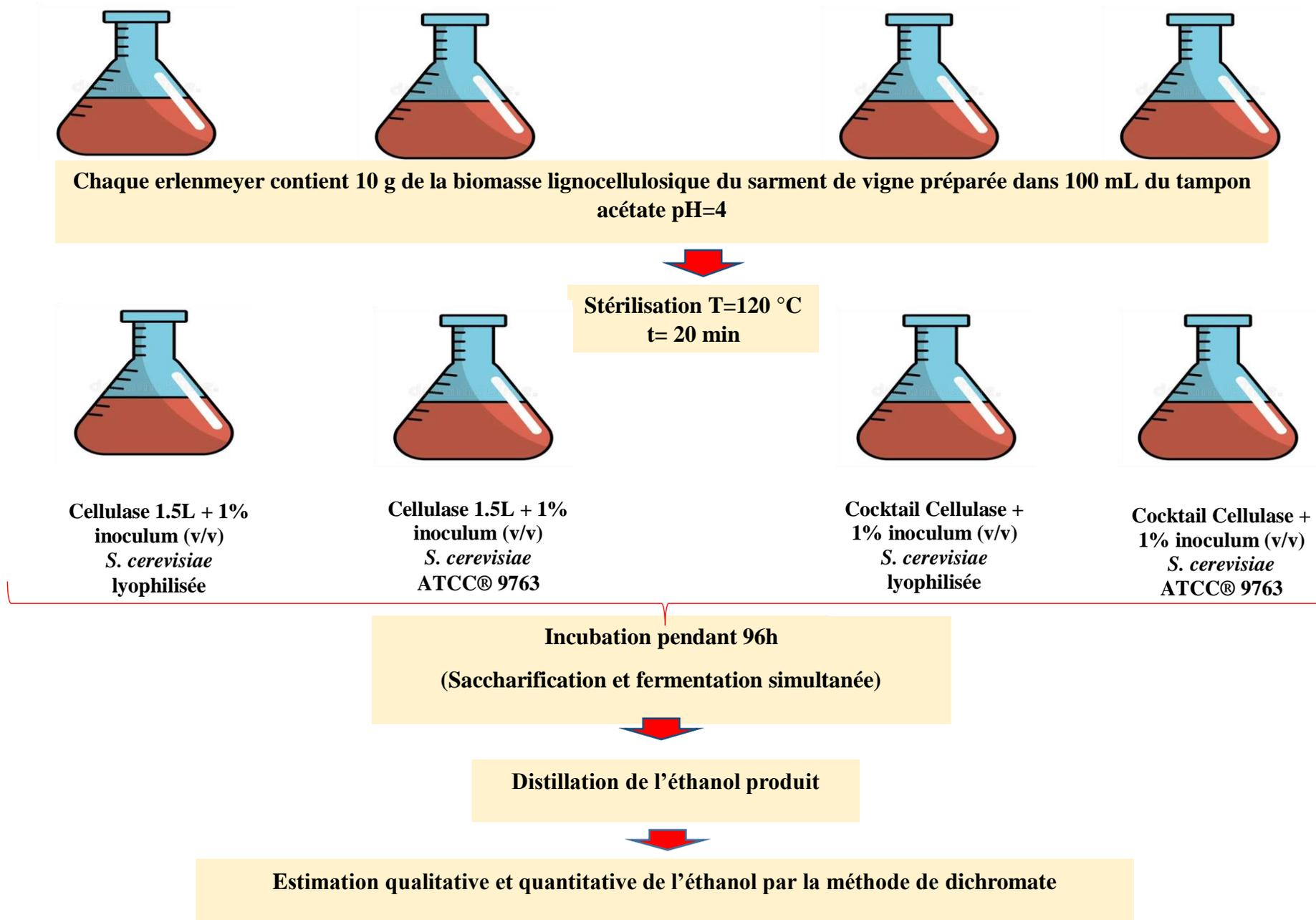


Figure III.5 : Schéma résumant la méthode de production du bioéthanol à partir de la biomasse lignocellulosique du sarment de vigne Par la saccharification et la fermentation simultanée

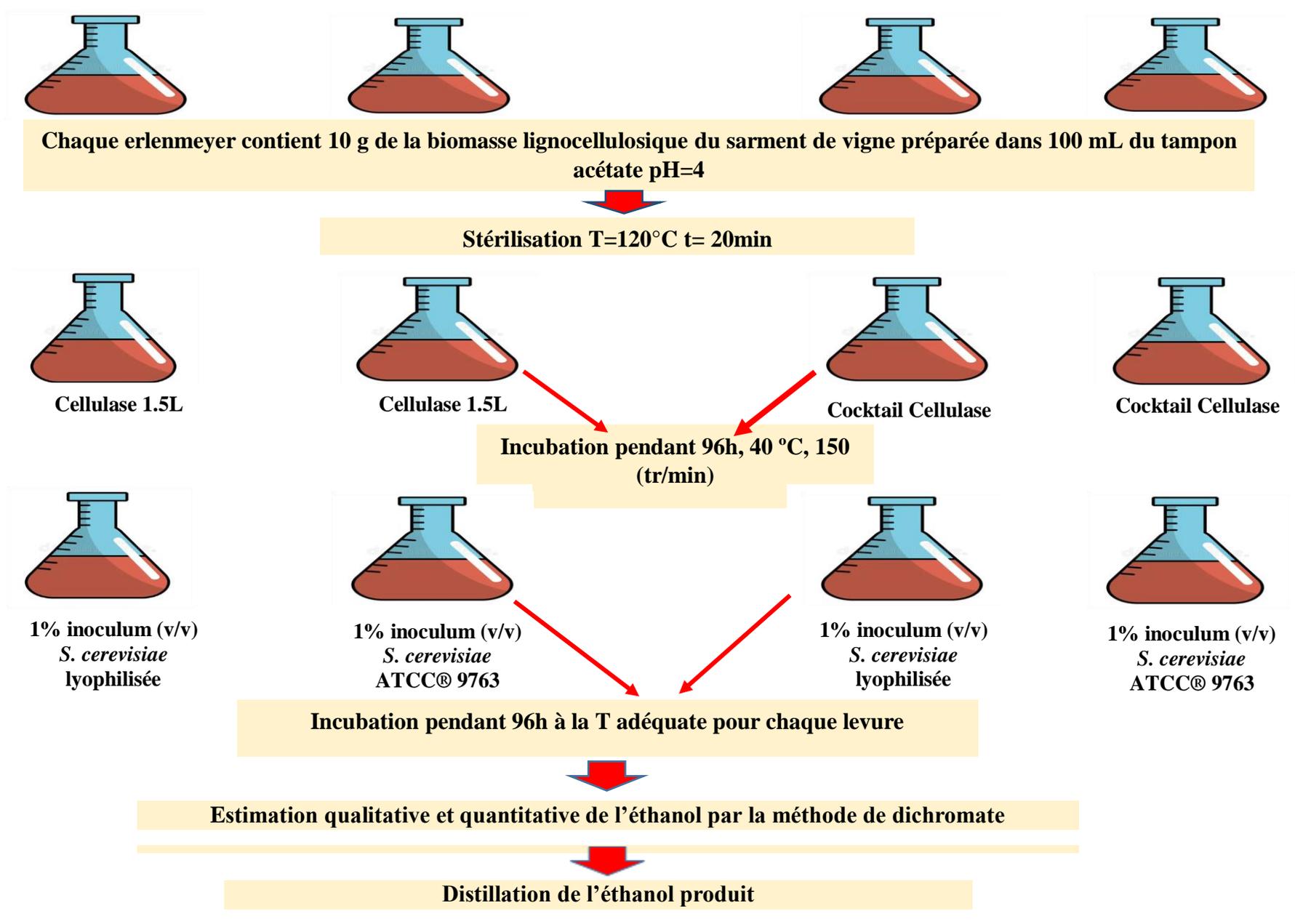


Figure III.6: Schéma résumant la méthode de production du bioéthanol à partir de la biomasse lignocellulosique du sarment de vigne Par la saccharification et fermentation séparée

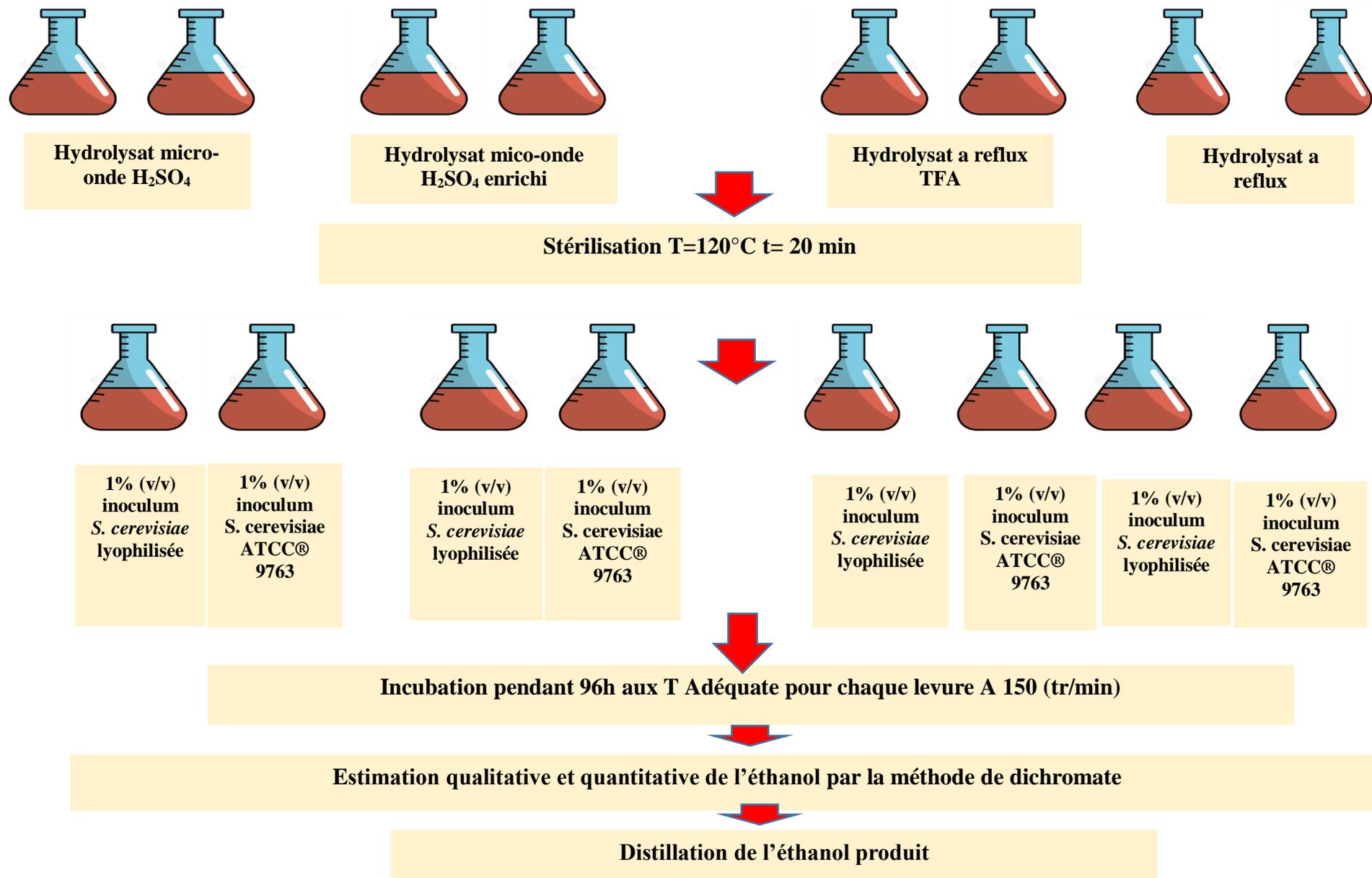


Figure III.7: Schéma résumant la méthode de production du bioéthanol à partir l'utilisation d'hydrolysats détoxifiés issue du traitement physicochimique par traitement microonde à l'acide sulfurique et le traitement a reflux par l'acide Trifluoroacétique (TFA)

III.11.3. Caractérisation de la concentration du bioéthanol

La concentration totale d'éthanol dans le milieu a été estimée par la méthode de l'acide chromique connue par la méthode de dichromate de potassium [165]. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Thermo Scientific evolution 201). Pour commencer nous allons préparer une solution du réactif d'acide chromique, ce réactif est caractérisé par une couleur orange ; le réactif d'acide chromique est préparé en dissolvant une quantité de 34 g de bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) dans 500 mL d'eau distillée sous une simple agitation à l'aide d'un agitateur magnétique. Nous ajoutons un volume de 325 mL de concentration d'acide sulfurique pure (H_2SO_4) (98 %) en petite quantité avec un pad de 5 mL sous agitation et refroidissement ; compléter le volume à 1000 mL avec l'eau distillée dans les mêmes conditions citées précédemment. En deuxième étape nous traçons une courbe d'étalonnage avec des concentrations d'éthanol connus à la même longueur d'onde (voir annexe figure.5). Dans un tube à essai nous ajoutons un volume de 1 mL de l'échantillon à caractériser, puis nous complétons ce tube avec un volume de 5 mL d'eau distillé, à la fin nous rajoutons un autre volume identique contenant le réactif d'acide chromique préparé précédemment ; Ces tubes à essais sont incubés dans un bain marie à une température de 60 °C pendant 20 minutes, par la suite, ces tubes sont refroidis à la température ambiante et les concentrations de bioéthanol sont déterminés en mesurant l'absorbance à 600 nm [166].

Chapitre IV

Résultats et discussion

Chapitre IV : Résultats et Discussion

IV.1. Caractérisation structurelle

IV.1.1. Analyse de la taille des particules par granulométrie laser

La figure IV.1 montre la taille des particules de tous les échantillons. La taille de la farine de biomasse lignocellulosique exactement celle du sarment de la vigne se situe entre 7 et 830 μm , ce qui présente une biomasse très fine. Cette gamme de tailles réduite considérablement la cristallinité de la cellulose, et améliore la dépolymérisation de la cellulose par hydrolyse acide et conduisant à un hydrolysate riche en sucres. La courbe A (Figure IV.1) représente la distribution granulométrique des déchets de sarments en fonction de leur quantité présente dans la biomasse lignocellulosique après broyage. La grande quantité de la taille des particules obtenue par le broyeur se situait entre 120 et 830 μm , ce qui représente une biomasse très fine. La biomasse lignocellulosique a été tamisée et séparée en deux échantillons et utilisée dans les plans de criblage et d'optimisation. La courbe B indique la quantité de la biomasse lignocellulosique dont la taille des particules est inférieure à 125 μm .

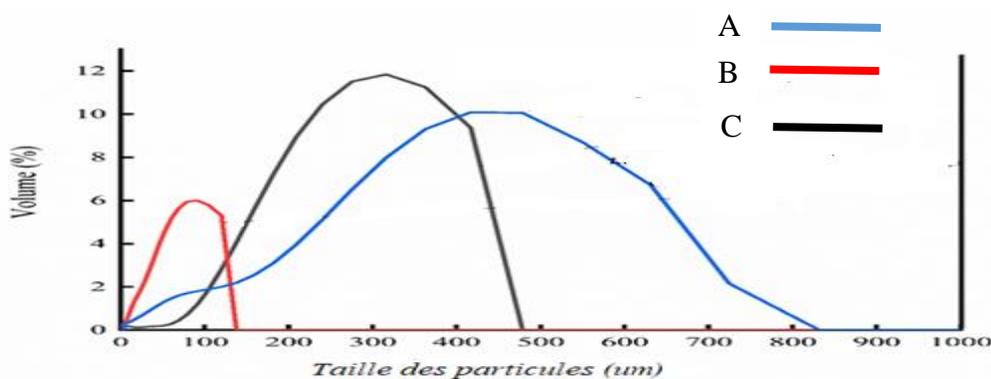


Figure IV.1: Distribution granulométrique des déchets de sarments de tous les échantillons

D'après la figure IV.1, l'échantillon contient une grande partie de particules dont la taille est comprise entre 7 et 100 μm . La courbe noire indique la quantité de biomasse lignocellulosique dont la taille des particules est inférieure à 500 μm . Une grande partie des particules ont une taille comprise entre 80 et 500 μm . En outre, la quantité de biomasse lignocellulosique qui doit subir un broyage supplémentaire correspond à la courbe bleue. La courbe A, en couleur bleue représente la taille des particules en μm utilisée dans la caractérisation de la biomasse lignocellulosique, la courbe C, en couleur noire présente la

taille des particules de sarment de vine utilisée dans le plan de criblage pour l'identification si la taille des particules est significative, et varie sur la réponse, enfin la courbe B, en couleur rouge représente la taille des particules utilisé dans le plan de criblage et d'optimisation.

IV.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée a été utilisée pour déterminer la structure moléculaire présente dans les déchets de sarments en identifiant les groupes fonctionnels ; le spectre correspondant est illustré dans la figure IV.2.

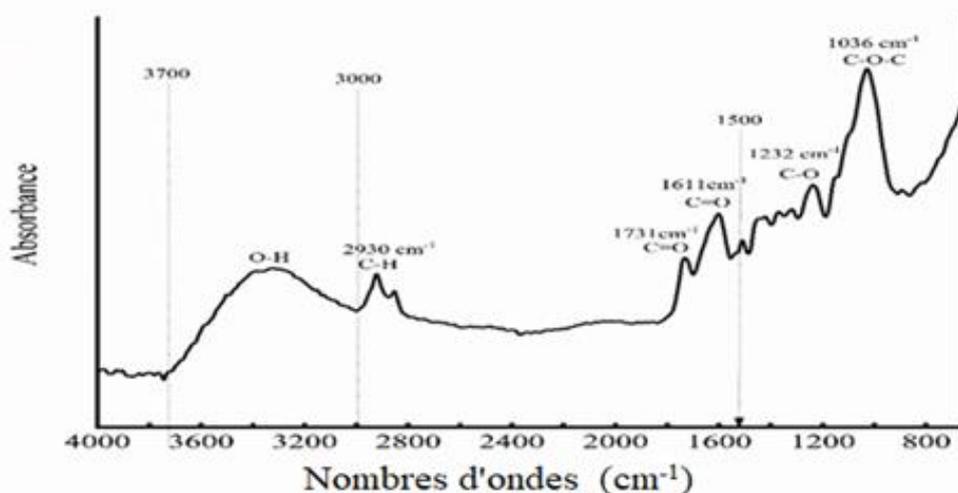


Figure IV.2 : Spectres Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier - réflectance totale atténuée des déchets de sarment de la vine issue d'une biomasse lignocellulosique

La large bande observée dans la région (3700 cm^{-1} - 3000 cm^{-1}) est attribuée aux vibrations d'étirement O-H ; en outre, cette bande pourrait également être associée à la structure des molécules de cellulose ainsi qu'aux groupes hydroxyles aromatiques et aliphatiques. De plus, la flexion O-H qui apparaît au niveau de la même bande qui caractérise l'eau adsorbée, rendant compte de la tendance hydrophile des fibres ; tandis que la position maximale à 2930 cm^{-1} indique la vibration d'étirement C-H [167,168]. D'autre part, la large pic à 1036 cm^{-1} peut être attribuée à la cellulose, présente dans le spectre avec une forte intensité, associée à l'étirement du pont asymétrique C-O-C [169]. La petite bande centrée sur 1232 cm^{-1} répond à l'étirement C-O et est caractéristique des fractions hémi cellulosiques et de lignine. Le petit pic à 1500 cm^{-1} attribué aux vibrations de flexion des liaisons N-H et aux vibrations d'étirement des liaisons C-N, ceci peut être dû à des protéines [170], tandis que celle à 1731 cm^{-1} est liée à l'élongation de la liaison C=O du groupe ester carbonique présent dans

l'hémicellulose [171]. Le pic à 1611 cm^{-1} attribué à l'étirement du groupe C=O des teneurs en hémicellulose [172].

IV.1.3. Analyse par diffraction des rayons X (DRX)

L'analyse par diffraction des rayons X des déchets de sarments de la vigne est présentée dans la figure IV.3, le schéma est basé sur les données de la littérature et l'utilisation de l'International Centre for Diffraction Data (ICDD).

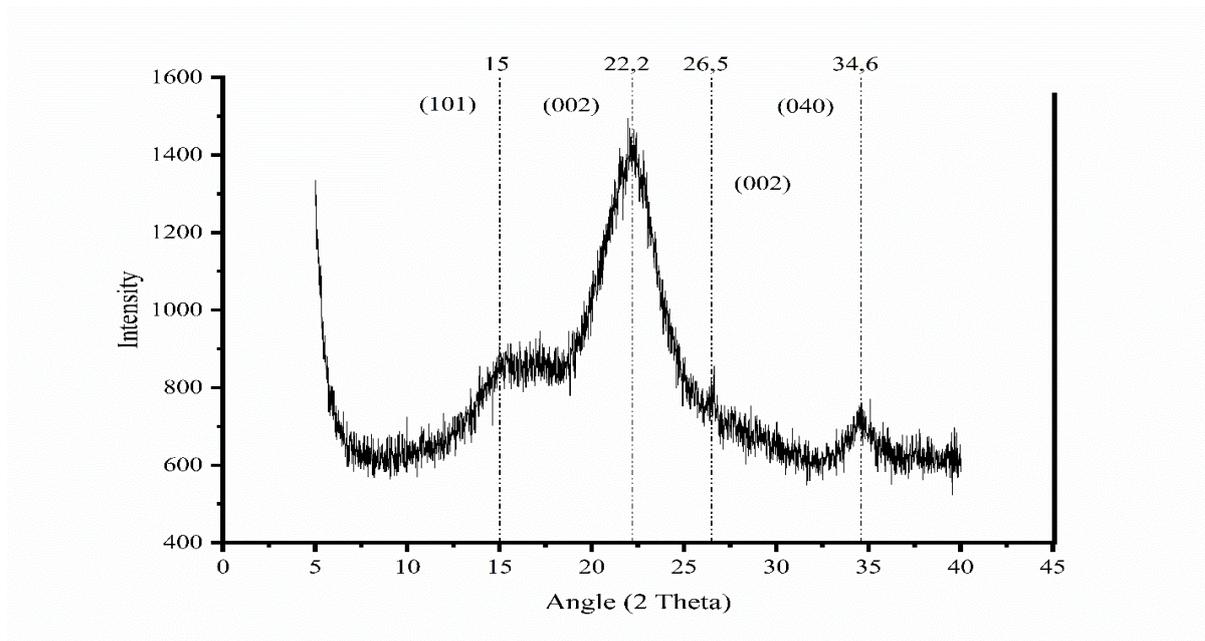


Figure IV.3 : Diagrammes de diffraction des rayons X des déchets de sarments de la vigne

Comme il est observé, les déchets de sarments présentent une partie amorphe à l'angle de Bragg (2θ) compris entre 5 et 14° , cette partie est principalement due à la lignine et à l'hémicellulose, et d'autres composés, qui lui confèrent une structure désordonnée. Par ailleurs les déchets de sarments montrent des pics liés aux plans cristallographiques de la cellulose selon l'angle 2θ à 15° , $22,2^\circ$, $26,5^\circ$ et $34,6^\circ$. Ces pics qui peuvent être attribués respectivement aux plans cristallographiques (101), (002), (002) et (040), respectivement, en raison de l'arrangement régulier parfait des molécules dans un plan équatorial, ce qui lui confère sa rigidité [173]. Cela renseigne sur la présence d'alpha-cellulose, une structure périodique régulière, responsable de la cristallinité de la biomasse [174].

Le degré de cristallinité de la cellulose est l'un des paramètres cruciaux de la structure cristalline. La rigidité des fibres de cellulose augmente et leur flexibilité diminue en

augmentant le rapport des régions cristallines aux régions amorphes. La cristallinité est fortement influencée par la composition de la biomasse ; la quantité relative de lignine, d'hémicelluloses et de cellulose qui varient en fonction de la nature de la biomasse. L'indice de cristallinité a été obtenu à partir du rapport entre l'intensité du pic 002 ($2\theta = 22,2^\circ$) et la diffraction d'intensité minimale ($2\theta = 15^\circ$) selon l'étude de Segal. L'indice de cristallinité de la biomasse lignocellulosique non traitée des déchets de sarments de la vigne cardinale (33,59 %) avec une taille de particule inférieure à 1 mm, a été comparé à un autre échantillon de déchets de sarments de la vigne (indice de cristallinité à l'état brut sans prétraitement était de 65,29 %, avec un prétraitement hydro-thermique était de 43,60 %, la taille de particule était de 0,4 cm). Le même échantillon a été comparé à la section sur la composition chimique, et l'on peut conclure que la biomasse lignocellulosique provenant des déchets de sarments de la vigne Cardinale est meilleure que les déchets de sarments de la vigne Hondarridi Zuri fournis par une entreprise vinicole locale, Aldako Bodega. S.L. (Oiartzun, Pays Basque, Espagne) en termes d'indice de cristallinité [173].

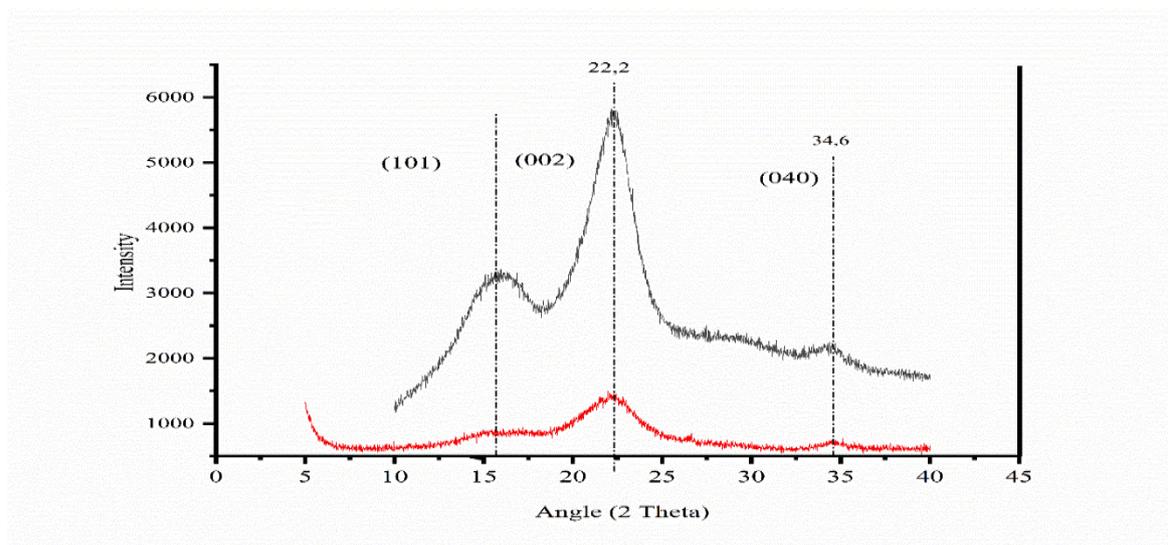


Figure IV.4: Diagrammes de diffraction des rayons X des déchets de sarments de la vigne traité (—) et non traité (—).

IV.2. Caractérisation chimique

IV.2.1. Analyse de la composition de la biomasse

La composition de la biomasse est indiquée dans le tableau IV.1. L'échantillon a été placé dans une étuve à 40°C , puis refroidi dans un dessiccateur afin que la biomasse n'absorbe pas d'humidité. La teneur en eau est l'un des signes préliminaires du taux de cellulose en raison de son facteur d'adsorption. Le taux d'extractibles représente les matières solubles dans les

solvants organiques. Dans notre cas, il s'agit d'un mélange éthanol / Hexane, et donc les composés extraits sont les suivants : flavonoïdes, terpènes, stilbènes, et tanins, qui donnent la couleur et l'odeur du bois. D'après la caractérisation chimique de la biomasse, la teneur en holocellulose était de 66,96% du poids sec. C'est l'addition des fractions cellulosiques et hémi-cellulosiques, montrant la richesse de la biomasse en cellulose et donc en sucres réducteurs et un taux moyen de lignine, qui est en faveur d'une détoxification avec la poudre de charbon de bois. On note également une richesse de la biomasse en protéines, avec un rendement de 5,62%. Les sucres réducteurs obtenus à partir de la biomasse lignocellulosique sont généralement utilisés dans la fermentation en conditions aérobies par des micro-organismes pour la production de biocarburants, ces micro-organismes ont besoin d'une source de carbone (sucre réducteur), d'azote (protéine), de vitamines et de minéraux pour leur croissance. Cette composition des déchets de sarments de cardinale peut conduire à la production de bioéthanol comme carburant pour le secteur des transports. La teneur en lignine de Klason était comparable à celle de certains résidus agricoles, tels que les coques de palmiste 45 %, les fibres de mésocarpe de palmier 32 %, les coques d'arachide 31,6 %, l'eucalyptus 27 %, la paille de riz 26,30 %, le sapin de Douglas 25,3 %, la balle de riz 23 %, la bagasse 22,8 %.

La biomasse lignocellulosique des déchets de sarments de vigne cardinale a été comparée à celles rapportées dans la littérature, l'échantillon est le déchet de sarments de vigne avec le cépage Hondarridi Zuri fourni par la cave locale Aldako Bodega. S.L. (Oiartzun, Pays Basque, Espagne) caractérisé par une taille de particule de ~ 0,4 cm, 27% d'hémicellulose, 26% de cendres, 3,1% d'extractibles. La composition chimique de cette biomasse est différente de notre biomasse lignocellulosique en raison de la nature du sol, des conditions météorologiques et également de la nature de la variété

Tableau IV.1 : Composition de la biomasse lignocellulosique des déchets de sarments de vigne

Composition	Résultats (%)
Humidité	11,70 ± 0,49
Alpha-cellulose	43,38 ± 0,60
Holocellulose	66,96 ± 0,75
Matière grasses	00,81 ± 0,14
Sucres totaux	00,56 ± 0,11
Extractibles	02,30 ± 0,46
Hémicellulose	23,58 ± 0,67
Protéine brute	05,62 ± 0,19
Lignine de klason	21,22 ± 0,71
Cendre	02,50 ± 0,22
Extractibles totaux	09,29 ± 0,45

IV.2.2. Spectroscopie de fluorescence des rayons X (FRX)

La concentration d'une substance minérale particulière dans une plante ou biomasse lignocellulosique, varie selon le type de la biomasse lignocellulosique, son âge, son stade de développement et les conditions climatiques pendant la phase de sa croissance, la nature de sol, irriguassions, et les engrais utilisés. D'après les résultats de la fluorescence, la biomasse lignocellulosique a une composition minérale globale de 2,5%, qui constituent les nutriments de la croissance cellulaire, comme le calcium sous forme d'oxyde de calcium (CaO) qui représente un composant majoritaire de la biomasse lignocellulosique, à savoir 61,5% des minéraux. Il a une importance dans la physiologie végétale et un rôle dans la cohésion des parois cellulaires. Le pentoxyde de phosphore (P₂O₅) est un engrais phosphaté, crucial pour la croissance des racines et des pousses de la vigne ; l'engrais potassique est ajouté sous forme d'oxyde de potassium (K₂O) en tant que nutriment pour le développement cellulaire. La présence de silice (SiO₂) est un signe que la biomasse n'a pas été bien irriguée ; la silice est adsorbée par la plante sous forme d'acide silicique.

Tableau IV.2 : Composition minérale de la surement de la vigne

	Oxydes	Compositions (%) en points
	CaO	61,50
	K ₂ O	21,50
Cendres (%)	SiO ₂	07,43
2,5% ±0,22	P ₂ O ₅	05,80
	SO ₃	03,42

IV.3. Caractérisation thermique

IV.3.1. Analyse thermique simultanée

Des tests thermogravimétriques en atmosphère inerte (N₂) ont été réalisés pour évaluer le comportement pyrolytique de la biomasse lignocellulosique, et pour examiner la décomposition thermique des déchets de sarments de vigne dans la plage de température allant de (25 - 550 °C). La figure IV.5 présente les courbes thermogravimétriques, ATG (% de poids) et thermogravimétriques différentielles, ATD (% de poids / °C) et la calorimétrie à balayage différentiel (DSC).

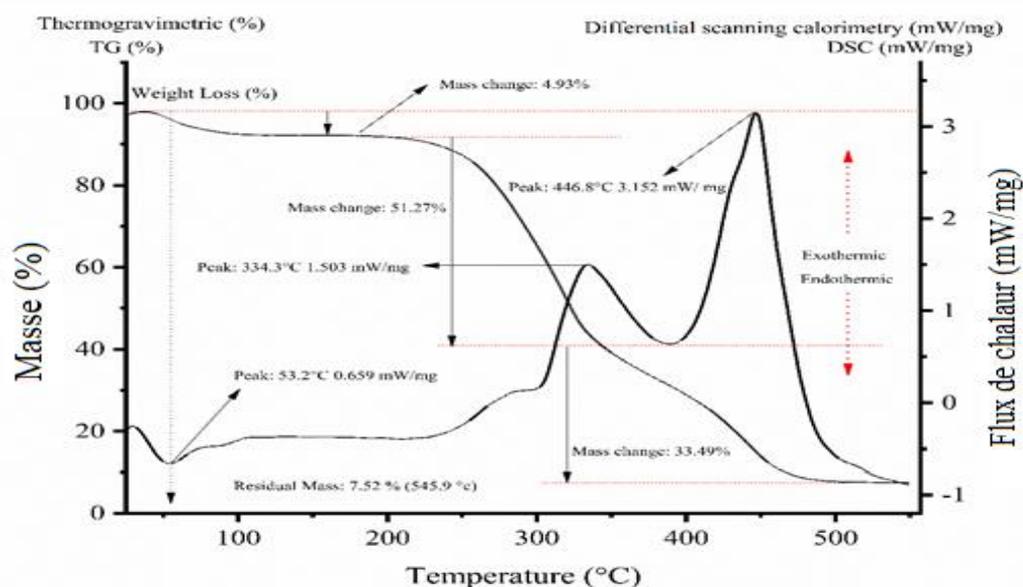


Figure IV.5 : Analyse TG-DSC des déchets de sarments de vigne

Les courbes ATG montrent trois étapes de perte de poids et leurs décompositions se déroulent en deux étapes principales. La première phase à une température 100 °C ; une petite bande endothermique correspondant à une perte de poids initiales de 5 % est observée à une température d'environ 53 °C, qui est attribuée à la perte d'eau absorbée par les fibres cellulosiques et représentant l'évaporation de l'humidité adsorbée par l'échantillon [175]. Dans la deuxième phase, la dégradation thermique commence à partir 240 °C et représente la dégradation des composants extractibles, lipides, protéines et différents composés de faible poids moléculaires. En outre, le premier pic exothermique et les taux maximaux de perte de poids sont observés entre 250 et 380 °C, ce qui correspond à la décomposition des polymères (cellulose, hémicellulose et lignine) pour générer des composés volatils [176]. Cela signifie que les chaînes de liaisons glycosidiques sont rompues, ce qui entraîne la dissolution de la phase amorphe. La décomposition thermique active des hémicelluloses pourrait être attribuée à sa structure chimique. L'hémicellulose a une structure amorphe aléatoire et elle est facilement hydrolysée en revanche, la molécule de cellulose est un très long polymère d'unités de glucose et ses régions cristallines améliorent la stabilité thermique des fibres lignocellulosique. La lignine est différente de l'hémicellulose et de la cellulose, car elle est composée de trois types d'unités benzène-propane, fortement réticulées et de poids moléculaire très élevé. La stabilité thermique de la lignine est donc très élevée et il est difficile de la décomposer. Dans la troisième Phase, entre 400 et 500 °C, un pic exothermique se produit et un pic majeur est observé entre 400 et 480 °C, correspondant à la décomposition totale de deux composition (lignine et cellulose) et à la génération de composés volatils, indiquant la destruction et la carbonisation totale de l'échantillon.

IV.4. Caractérisation morphologique

IV.4.1. Analyse de microscopie à balayage (MEB)

Les micrographies montrant la morphologie de la surface des déchets de sarment de la vigne de variété cardinale non traités et prétraités sont illustrées dans la figure IV.6 Les micrographies MEB ont été obtenues à des grossissements de 100 fois, 140 X, 200 X, 280 X, 400 X, 500X et 800 X et ces grossissements ont été significatifs pour identifier les changements structuraux de la paroi cellulaire. D'après la figure IV.6 (e), et (g) la surface des déchets de sarments non traités est irrégulière, rugueuse et inégale. Les particules de la biomasse sont regroupées. De plus, la taille et la forme des particules sont différentes selon la longueur des fibres cellulose. Alors que la figure IV.6 (a), (c), et (d) montrent des

fibres cellulosiques subit un traitement mécanique (broyages), la destruction des fibreux par les lames de broyeurs mécanique a permis de fractionnée la fibres, et la diminution de son indice de cristallinité, et le degré de polymérisation de polysaccharides et le rendre plus faible à l'hydrolyse chimique et enzymatique, de plus la surface des déchets de sarments de la vigne est plus irrégulière, plus rugueuse et plus poreuse que la biomasse non traitée. En outre, elle a une structure gonflée selon la figure IV.6 (b) et (i). La morphologie des déchets de sarment de la vigne prétraités est clairement différente des déchets non traités où le diamètre moyen des granules a diminué voir figure IV.6 (g). Le déchet de sarment de la vigne prétraité présente une porosité plus élevée avec des particules désagrégées indiquant la capacité du prétraitement à libérer et solubiliser les polysaccharides. Cela suggère que l'hydrolyse acide et le prétraitement par hydro thermolyse peuvent avoir un impact sur la structure et la morphologie de la biomasse avec une perturbation significative de la paroi cellulaire. On décrit que le prétraitement à haute température provoque la fluidification et la coalescence de la lignine, résultants ont une forme globulaire ainsi que, l'acide sulfurique dilué élimine l'hémicellulose et provoque des pores sur la surface de la biomasse, la figure IV.6 (h) l'acide sulfurique dilué a un effet majeur sur les fibres cellulosiques en compromettant l'intégrité de la paroi cellulaire et en libérant des molécules de sucres. Cela prouve l'efficacité de l'hydrolyse acide et du prétraitement par hydro thermolyse ce qui à augmenter la teneur en sucres totaux dans les hydrolysats.

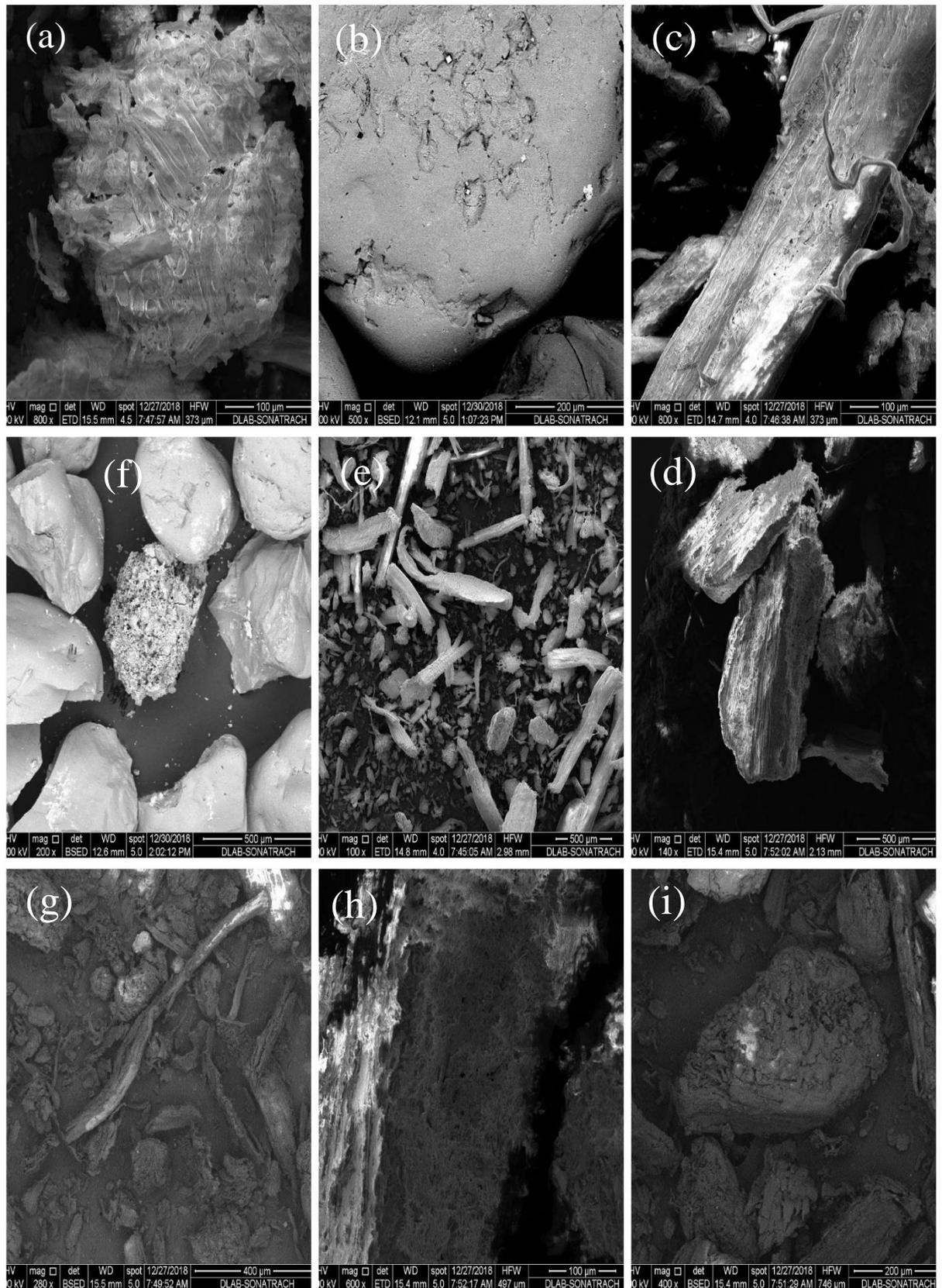


Figure IV.6 : Morphologie (MEB) de la biomasse lignocellulosique du sarment de la vigne

IV.5. Extraction des sucres

Les paramètres fondamentaux qui interviennent dans l'extraction des sucres à partir d'une biomasse lignocellulosique sont : le temps, le rapport solide / liquide, le type d'acide, l'acidification de la solution d'extraction, autrement dit la concentration de la solution d'extraction et la température, de plus, d'autres techniques telles que la sonication et l'agitation, cependant pour déterminer l'influence de chaque facteur dans le processus d'extraction [177], les outils de statistiques tels que les plans de criblage comme le plan de Plackett-Burman peuvent être utilisés. Ce plan est un outil relativement nouveau utilisé pour le dépistage, c'est un point clé pour les processus complexes, son utilité repose sur sa capacité à détecter des variables potentiellement importantes dans un groupe complexe d'interactions. Il est donc précieux de détecter pour les variables importantes, celles qui sont significatives dans un large éventail de facteur avec quelques groupes de tests, ce qui permet de faire le choix approprié pour réduire la production de déchets, coûts, produits et temps, avec les variables significatives pour l'extraction des sucres sélectionnées dans le plan de Plackett-Burman [178], nous pouvons améliorer la détection des régions optimales dans une optimisation séquentielle en utilisant le plan de Box Behnken et la méthodologie de surface de réponse. Ces derniers ont été appliqués avec succès pour optimiser de nombreux bioprocédés [179]. Les facteurs d'optimisation amélioreraient l'efficacité d'extraction de sucre et réduiraient considérablement la durée et le coût du processus. Il est donc nécessaire de concevoir le procédé de manière à maximiser l'extraction du sucre par l'acide Trifluoroacétique (CF_3COOH). Un certain nombre de méthodes de modélisation et d'optimisation sont disponibles, allant de modèles simples tels que One Factor At a Time (OFAT) à des plans statistiques complexes telles que le plan Centrale Composite et le plan de Box Behnken [180]. Les plans d'expériences permettent de réduire le nombre d'expérience et d'augmenter l'efficacité de processus et le rendre accru. Le plan OFAT est laborieux, autrement dit, elle demande beaucoup de travail et d'effort et qui coûte beaucoup de peine, longue et moins apte à trouver de véritables niveaux optimaux en raison des interactions entre les facteurs. La méthodologie de la surface de réponse est un ensemble de techniques mathématiques et statistiques qui est appliqué pour la modélisation et l'analyse de divers processus dans lesquels la réponse d'intérêt est influencée par plusieurs facteurs et la réponse est optimisée [181]. Le plan de Box Behnken utilisé dans la méthodologie de la surface de réponse est plus avantageux que l'approche classique en termes d'informations obtenues et de précision de l'expérience menée. L'obtention de résultats informatifs dépend

de la découverte des effets entre les paramètres clés du processus particulier et les effets combinés des facteurs contrôlables [182]. Pour y parvenir, les courbes résiduelles de Box Behnken sont utilisées pour vérifier l'uniformité de la distribution des erreurs et l'adéquation du modèle proposé. Les modèles de régression obtenus à partir de la technique des moindres carrés fournit une explication raisonnable de l'effet de chaque facteur individuel et de toutes les relations possibles qui existent entre les variables dépendantes et indépendantes. En conséquence l'objectif fixé pour ce travail de thèse était d'optimiser les variables à l'aide des techniques statistiques pour obtenir une meilleure extraction du sucre par l'acide Trifluoroacétique et de valider la réponse prévue par une expérimentation réelle.

IV.6. Plans d'expériences

IV.6.1. Criblage des facteurs significatifs à l'aide du plan de Plackett-

Burman

Dans cette étude, six variables ont été sélectionnées pour l'analyse à l'aide du plan de Plackett-Burman. Les conditions expérimentales à vérifier ont été sélectionnées sur la base de la plus grande désirabilité. Au total, 12 séries expérimentales ont été réalisées pour réduire la production de sucre en combinant les deux niveaux de chaque variable, comme indiqué dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3 : Plan de Plackett-Burman des déchets de sarments et valeurs expérimentales des variables de réponse

Ordre d'essai	Paramètres de plan						Réponse
	Vitesse agitation (tr/min)	T (°C)	Temps d'extraction (min)	[C] (%)	Taille des particules (µm)	Rapport (Solide/liquide) (g/mL)	[C] en sucres (%)
1	750	100	180	1	125	1	0,1769
2	500	60	180	1	500	5	0,1938
3	500	100	20	1	500	1	0,0224
4	500	100	20	10	500	5	04,896
5	500	60	180	1	125	5	0,1063
6	750	60	180	10	500	1	0,2192
7	750	60	20	1	500	1	0,0144
8	750	60	20	10	125	5	0,2037
9	750	100	20	1	125	5	0,3479
10	500	60	20	10	125	1	0,0108
11	500	100	180	10	125	1	0,2354
12	750	100	180	10	500	5	1,0032

L'impact des six facteurs considérés dans cette étude sur le rendement en sucre réducteur des déchets de sarments a fait l'objet d'une analyse statistique. L'objectif de cette analyse est d'évaluer les facteurs qui ont un effet significatif sur le rendement en sucre réducteur en vue d'une étude d'optimisation plus poussée à l'aide d'un plan de Box Behnken. Les rendements en sucre réducteur des déchets de sarments vont de 0,01 à 1 g/l ; il s'agit d'une grande variation dans l'extraction du sucre (Tableau IV.3). Le coefficient de détermination (R^2) du modèle de Plackett-Burman est de 0,90 tandis que le R^2 ajusté est de 0,81. Cela montre que les valeurs prédites (R^2) sont proches des valeurs ajustées (R^2), ce qui indique la précision du modèle. L'analyse de la variance du modèle de Plackett-Burman est présentée dans le tableau IV.4.

Tableau IV.4 : Analyse de régression (ANOVA) des résultats expérimentaux du plan de Plackett-Burman sur l'extraction sur l'extraction acide de sucre à partir de déchets de sarments de vigne

Source	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	F-value	P-value	Signification
Modèle	0,7565	6	0,1261	8,4220	0,0168	Significatif
X ₁	0,0686	1	0,0686	4,5804	0,0853	Non-significatif
X ₂	0,1409	1	0,1409	9,4118	0,0279	Significatif
X ₃	0,1943	1	0,1943	12,9817	0,0155	Significatif
X ₄	0,2312	1	0,2312	15,4424	0,0111	Significatif
X ₅	0,0618	1	0,0618	4,1316	0,0978	Non-significatif
X ₆	0,0596	1	0,0596	3,9840	0,1025	Non-significatif
Résiduel	0,0748	5	0,0150			
Cor Total	0,8313	11				

Le modèle de régression (ANOVA) est hautement significatif pour représenter la dépendance du rendement en sucre réducteur par rapport aux composants étudiés. Si $P_{\text{value}} < 0,05$, les termes respectifs sont considérés comme significatifs. En revanche, $P_{\text{value}} > 0,05$ indique des termes non significatifs. Dans notre cas, trois facteurs ont été considérés comme les plus significatifs, à savoir le rapport (liquide/solide) avec $P_{\text{value}} 0,0110$ (très faible), la température avec $P_{\text{value}} 0,0155$ et la concentration en TFA avec $P_{\text{value}} 0,0279$. Les trois autres facteurs, à savoir la vitesse d'agitation (tr/min), le temps d'extraction et la taille des particules, ont montré des effets non significatifs sur le rendement en sucre réducteur.

Tableau IV.5 : Coefficient estimé, t-value calculée, P- value et erreur standard du plan d'expérience de Plackett-Burman

Terme	Coefficient	Erreur Std	T-Ratio	Prob> t
Intercepte	0,4494	0,0578	7,7814	0,0006
Vitesse agitation (tr/min)	0,0756	0,0353	2,1402	0,0853
[TFA] (%)	0,1084	0,0353	3,0679	0,0279
Température (°C)	0,1273	0,0353	3,6030	0,0155
Rapport (mg/100 mL)	0,3123	0,0795	3,9297	0,0111
Taille des particules (µm)	0,0479	0,0235	2,0326	0,0978
Temps d'extraction (min)	0,0705	0,0353	1,9960	0,1025

Le modèle de l'équation polynomiale du premier ordre a été appliqué pour déterminer la relation entre les facteurs et la réponse, comme le montrent l'équation IV.1.

$$Y = (\text{rendement de l'extraction du sucre}) = 0,4494 + 0,0756 X_1 + 0,1084 X_2 + 0,1273 X_3 + 0,3123 X_4 + 0,0479 X_5 + 0,0705 X_6. \quad (\text{IV.1})$$

La réaction optimale dans le criblage expérimental a été obtenue lorsque le rapport (solide/liquide) a été fixé à 5, la température à 100 °C, la vitesse d'agitation à 750 tr/min, la concentration de TFA à 10 %, la taille des granulés à 500 µm et le temps d'extraction à 180 minutes.

IV.6.2. Optimisation à l'aide du plan de Box Behnken

La partie la plus déroutante de cette étude est le processus d'optimisation pour obtenir le maximum de sucre réducteur. Le plan de Box Behnken est utilisé pour optimiser le nombre d'expériences à réaliser en déterminant les interactions possibles entre les paramètres étudiés et leurs effets sur le rendement en sucre réducteur des déchets de sarments de vigne. Au total, quinze séries expérimentales et trois points centraux ont été conçus et réalisés selon les conditions appliquées dans chaque série. (Tableau IV.6).

Tableau IV.6 : Plan de Box Behnken pour les déchets de sarments de vigne et valeurs expérimentales des variables de réponse

Ordre Expérience	Paramètre de plan			extraction des sucres (Y)	
	Temps d'extraction (min)	Rapport (g/mL)	Concentration (%)	Expérimental (%)	Prédictive (%)
1	100	1	10	0,0993	-0,0244
2	100	3	5,5	0,7188	0,7188
3	100	5	1	0,6970	0,7208
4	180	1	5,5	0,5092	0,3122
5	180	3	10	0,7567	0,8575
6	180	3	1	0,7081	0,7942
7	100	3	5,5	0,7188	0,7188
8	180	5	5,5	2,5321	2,1222
9	20	3	10	0,3852	0,3991
10	100	5	10	0,9219	1,1110
11	20	3	1	0,0531	0,0323
12	20	5	5,5	0,6654	0,6624
13	20	1	5,5	0,4420	0,5519
14	100	1	1	0,0848	-0,0643
15	100	3	5,5	0,7188	0,7188

Les résultats expérimentaux et ceux de l'optimisation selon le schéma de Box Behnken sont illustrés dans le tableau IV.6. Les résultats du plan de Box Behnken ont montré que la meilleure quantité d'extraction a été obtenue dans la série expérimentale N °8 donnant 2,53 g/L de sucre réducteur, tandis que la libération totale de sucre la plus faible (50 mg/L) a été obtenue dans la série N °11. Dans l'étude d'optimisation, le rendement en sucre réducteur des déchets de sarments a augmenté de 150 % par rapport au criblage. Les quantités d'extraction les plus élevées étaient de 2,53 g/L (tableau IV.6) et de 1,0 g/L (tableau IV.3) dans l'optimisation et le criblage, respectivement. Le modèle polynomial de second ordre a été appliqué pour déterminer la relation entre le rendement en sucre réducteur et les paramètres testés.

Le modèle de l'équation polynomiale du deuxième ordre a été appliqué pour déterminer la relation entre les facteurs et la réponse, comme le montrent l'équation IV.2. Les résultats de l'équation sont donnés dans le tableau IV.7.

$$Y = 0,7188 + 0,0775 X_1 + 0,4601 X_2 + 0,3701 X_3 + 0,0526 X_1 X_2 - 0,0709 X_1 X_3 + 0,4499 X_2 X_3 - 0,4147 X_1^2 + 0,1467 X_2^2 + 0,1717 X_3^2. \quad \text{(IV.2)}$$

Tableau IV.7 : Estimations des paramètres pour les effets linéaires, quadratiques et d'interaction de la variable sur le rendement en sucre réducteur

Terme	Coefficient	Erreur Std	T Ratio	Prob> t
Intercepte	0,7188	0,1119	6,4256	0,0014
X ₁	0,0775	0,0685	1,1315	0,3092
X ₂	0,4601	0,0685	6,7167	0,0011
X ₃	0,3701	0,0685	5,4019	0,0029
X ₁ * X ₂	0,0526	0,0969	0,5429	0,6105
X ₁ * X ₃	-0,0709	0,0969	-0,7315	0,4973
X ₂ * X ₃	0,4499	0,0969	4,6436	0,0056
X ₁ ²	-0,4147	0,1008	-4,1128	0,0092
X ₂ ²	0,1467	0,1008	1,4545	0,2056
X ₃ ²	0,1717	0,1008	1,7026	0,1494

L'analyse de la variance (ANOVA) du plan d'optimisation Box Behnken sont présenté dans le tableau IV.8

Tableau IV.8 : ANOVA des résultats expérimentaux du plan de Box Behnken sur l'extraction de sucre à partir de déchets de sarments de vigne par extraction acide.

	Source	somme des carrés	Degré de liberté	carré moyen	F-value	P-value	Signification
	Modèle	4,5674	09	0,5075	13,5177	0,0052	Significatif
Linéaire	X ₁	0,0481	01	0,0418	1,2803	0,3092	
	X ₂	1,6937	01	1,6937	45,1145	0,0011	Significatif
	X ₃	1,0955	01	1,0955	29,1810	0,0029	Significatif
	X ₁ * X ₂	0,0111	01	0,0111	0,2948	0,6105	
Interaction	X ₁ * X ₃	0,0201	01	0,0201	0,5351	0,4973	
	X ₂ * X ₃	0,8095	01	0,8095	21,5633	0,0056	Significatif
Quadratique	X ₁ ²	0,6350	01	0,6350	16,9147	0,0092	Significatif
	X ₂ ²	0,0794	01	0,0794	2,1156	0,2056	
	X ₃ ²	0,1088	01	0,1088	2,8989	0,1494	
	Résiduel	0,1877	05	0,0375			
	Manque d'ajustement	0,1877	03	0,0626	.		
	Erreur pure	0,0000	02	0,0000			
	Cor Total	4,7551	14				

IV.6.3. Plan centrale composite design

IV.6.3.1. Résultats du rendement en sucres réducteurs des hydrolysats extrait par micro-ondes

Les résultats du rendement en sucres réducteurs observés et prédits à partir d'une biomasse lignocellulosique extrait par extraction sous micro-ondes suivant la matrice expérimentale des 24 expériences randomisées sont résumées dans ce tableau IV.9.

Tableau IV.9 : Plan centrale composite pour les déchets de sarments de vigne et valeurs expérimentales des variables de réponse

Ordre	Puissance (Watt)	Temps (min)	[C] d'acide (%)	Rapport (S/L)	Extraction en sucres (%)	Extraction des sucres prédictifs (%)
1	350	90	4	2	2,724	2,389
2	500	65	5,5	2	3,413	3,731
3	500	65	5,5	6	7,187	6,681
4	500	90	5,5	4	5,445	5,836
5	650	40	7	6	1,257	1,704
6	650	65	5,5	4	2,987	3,191
7	650	90	7	2	0,023	0,038
8	500	65	4	4	5,853	6,015
9	350	90	7	6	7,125	7,255
10	500	40	5,5	4	4,851	5,273
11	650	40	4	6	2,478	2,638
12	500	65	7	4	5,620	5,771
13	350	40	7	6	5,096	5,016
14	500	65	5,5	4	6,056	6,105
15	650	40	7	2	1,013	1,029
16	350	40	4	2	2,169	1,970
17	350	65	5,5	4	5,502	6,020
18	500	65	5,5	4	6,056	6,105
19	500	65	5,5	4	6,056	6,105
20	350	90	7	2	2,864	2,835
21	350	40	7	2	2,244	2,292
22	650	90	4	6	3,124	3,220
23	350	40	4	6	5,334	5,499
24	650	40	4	2	1,175	1,157
25	650	90	4	2	0,030	0,043
26	650	90	7	6	2,526	2,410
27	350	90	4	6	7,733	7,615

D'après les résultats des essais individuels utilisant la matrice de plan orthogonale d'un plan centrale composite (Tableau IV.9), on constate que la concentration de l'extraction de sucre

par micro-onde varie de 0,023 à 7,733 %. L'extraction la plus importantes en sucres réducteurs est de 0,773 %, cette expérience a été observé lorsque le traitement était effectué avec un rapport de 6 g / 100 mL à une puissance de radiation du micro-onde de 350 W sous une concentration d'acide sulfurique de 4 % pendant un temps d'extraction de 90 minutes ; alors que la concentration la plus faible est de 0,023 % a été obtenue lorsque les conditions d'hydrolyses sous micro-ondes étaient dans la valeur maximum de la puissance (650 W) pendant le temps d'extraction le plus longue 90 minutes, sous une concentration maximum d'acide sulfurique 7 % avec le rapport le plus faible 2 g / 100 mL. Dans ce contexte on peut conclure que la biomasse lignocellulosique à subit une calcination totale et une destruction de la fraction cellulose au cours de ce traitement suite à son exposition en petite quantités à un flux de chaleur élevés pour une durés de temps importantes sous un milieu agressif d'acide. Des résultats similaires en sucres réducteurs avec une concentration de 0,03 % ont été obtenue dans les même conditions sauf que la concentration en acide sulfurique plus faible, les conditions sont citées comme suit : la puissance de radiations de micro-onde est 650 W pendant une durée d'extractions de 90 minutes sous une concentration d'acide sulfurique moins faible qu'avant 4 %, avec la même quantité de la biomasse lignocellulosique prétraités. L'erreur dans l'expérience n'a pas été observée sur la base de la réponse de trois points centraux (exp N° 14, 18 et 19). L'importance de l'ajustement du polynôme d'ordre 2 pour l'extraction du sucre réducteurs des résidus de taille des sarments cardinaux a été analysée à l'aide de l'ANOVA et les résultats d'étude sont présentés dans le tableau IV.10.

Tableau IV.10 : ANOVA du plan composite central Plan orthogonale, les Résultats expérimentaux sur l'extraction de sucre à partir de déchets de sarments de vigne à l'aide de micro-ondes

	Source	S. C	D.l	C.M	F-value	P _{value}	Signification
	Model	132,1844	14	9,4417	49,7889	0,0001	Significatif
Linéaire	X ₁ Puissance	38,0715	1	38,0715	200,7614	0,0000	significatif
	X ₂ Temps	1,9847	1	1,9847	10,4658	0,0071	significatif
	X ₃ [C]	0,4519	1	0,4519	2,3829	0,1486	N-significatif
	X ₄ Rapport	41,1173	1	41,1173	216,8228	0,0000	signifiante
Interaction	X ₁ * X ₂	2,1192	1	2,1192	11,1752	0,0058	significatif
	X ₁ * X ₃	0,1151	1	0,1151	0,6063	0,4551	N-significatif
	X ₁ * X ₄	4,1443	1	4,1443	21,8539	0,0005	significatif
	X ₂ * X ₃	0,0140	1	0,0140	0,0737	0,7906	N-significatif
	X ₂ * X ₄	3,3334	1	3,3334	17,5777	0,0012	significatif
	X ₃ * X ₄	0,4593	1	0,4593	2,4222	0,1456	N-significatif
Quadratique	X ₁ ²	5,5150	1	5,5150	29,0819	0,0001	significatif
	X ₂ ²	0,8092	1	0,8092	4,2673	0,0611	N-significatif
	X ₃ ²	0,0019	1	0,0019	0,0103	0,9209	N-significatif
	X ₄ ²	2,1246	1	2,1246	11,2038	0,0058	significatif
	R	2,2756	12	0,1896			
	M. aj	2,2756	10	0,2775			
	P. E	0,0000	2	00000			
	Cor Total	134,46	26				

D.l : degré de liberté, S C : somme des carrés, C.M : carré moyen, R : Résiduel, M. aj : manque d'ajustement, P.E : pure erreur.

Les résultats (Tableau IV.10) ont montré des effets significatifs ($p \leq 0,05$) du rapport, la puissance d'irradiations de micro-ondes et le temps d'hydrolyse. Les résultats montrent aussi que les trois facteurs linéaire X₁, X₂, et X₄; les trois interactions entre facteurs X₁ * X₂, X₁ * X₄, X₂*X₄; et les deux facteurs quadratiques X₁², X₄² ont un impact significatif sur la quantité des sucres réducteurs de l'hydrolysate prétraités. Les coefficients des modèles générés pour l'extraction du sucre par micro-ondes ont été calculés en utilisant les réponses. La signification des coefficients a été observée à l'aide de la valeur P. En principe, une valeur $P < 0,05$ signifie que les termes des coefficients et le modèle sont statistiquement significatifs, tandis qu'une valeur $P > 0,1$ signifie que les coefficients et le modèle ne sont

pas significatifs. Comme nous l'avons observé, la valeur P du modèle était inférieure à 0,05 et était donc significative.

Le modèle de régression était hautement significatif pour la réponse ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,9831$) et la valeur quadratique moyenne (RMSE) était de 0,4354. Les résultats de cette étude montrent que le coefficient de détermination R^2 est égal à 0,9831 pour le modèle de régression prédisant le rendement en sucres réducteurs sous micro-onde, ce qui indique que 98,31 % de la variabilité de la réponse aux concentrations en sucre réducteurs extrait par le déchet de sarment de la vigne par l'extraction sous micro-onde pourrait être expliquée par le modèle. Un R^2 élevé indique que la variation pourrait être prise en compte de manière satisfaisante dans les données pour bon ajustement du modèle. Le modèle prédit semble représenter raisonnablement les valeurs observées. La réponse a donc été suffisamment expliquée par le modèle. Le R^2 n'est pas considéré comme le point principal pour impliquer la précision du modèle, car en plus de la variable, le modèle augmentera la valeur de R^2 . En conséquence, le R^2 ajusté est plus approprié pour évaluer le modèle si sa valeur est supérieure à 90 %. Si de nombreux termes non significatifs avaient été inclus dans le modèle, le R^2 ajusté serait remarquablement inférieur au R^2 . Le coefficient de détermination (R^2) représente le degré d'ajustement. Un bon ajustement du modèle devrait donner un $(R^2) \geq 0,8$. Comme observé, le (R^2) du modèle pour l'extraction de sucre par micro-ondes à partir de déchets de taille de sarments cardinaux était de 0,98 31, ce qui indique que le modèle prédit décrit de manière adéquate les relations entre les facteurs étudiés. En outre, la faible différence entre (R^2) ajusté et (R^2) signifie une bonne adéquation des modèles réduits aux données. L'équation du modèle quadratique en termes de facteurs codés est fournie dans l'équation polynomiale du modèle, qui est une relation empirique entre Y la réponse et les unités codées de la variable test. Chaque valeur expérimentale a été comparée à la valeur prédite, qui a été calculée à partir du modèle décrit dans le tableau IV.10 d'estimations des paramètres pour les effets linéaires, d'interaction et quadratiques des variables (Facteurs indépendant). Le niveau de signification de chaque coefficient a été déterminé à l'aide de la valeur F et de la valeur P. Une valeur F plus élevée avec une valeur P plus faible représente des variables plus significatives. Dans notre étude, le R^2 ajusté était proche de la valeur de R^2 correspondante (0,9633). Cette valeur indique un degré élevé de corrélation entre les données observées et prédites.

Le modèle de l'équation polynomiale du deuxième ordre a été appliqué pour déterminer la relation entre les facteurs et la réponse, comme le montrent l'équation IV.3. Les résultats de l'équation sont donnés dans le tableau IV.11.

$$Y = 5,8247 - 1,4543 * X_1 \text{ Puissance} + 0,3321 * X_2 \text{ Temps} - 0,1580 * X_3 \text{ [C]} + 1,5114 * X_4 \text{ Rapport} - 0,3639 * (X_1 * X_2) - 0,0848 * (X_1 * X_3) + 0,0296 * (X_2 * X_3) - 0,5089 * (X_1 * X_4) + 0,4564 * (X_2 * X_4) - 0,11694 * (X_3 * X_4) - 1,4645 * X_1^2 - 0,5610 * X_2^2 + 0,0275 * X_3^2 - 0,9090 * X_4^2. \quad (\text{IV.3})$$

Tableau IV.11: Estimations des paramètres pour les effets linéaires, d'interaction et quadratiques des variables

	Terme	Estimation	Erreur standard	t ratio	Prob. > t
	Constante	5,8247	0,1605	36,30	<,0001*
Linéaire	X ₁ Puissance	-1,4543	0,1026	-14,17	<,0001*
	X ₂ Temps	0,3321	0,1026	3,240	0,0072*
	X ₃ [C]	-0,1580	0,1026	-01,54	0,1486
	X ₄ Rapport	1,5114	0,1026	14,72	<,0001*
Interaction	X ₁ * X ₂	-0,3639	0,1089	-3,340	0,0059*
	X ₁ * X ₃	-0,0848	0,1089	-0,780	0,4510
	X ₂ * X ₃	0,0296	0,1089	0,270	0,7906
	X ₁ * X ₄	-0,5089	0,1089	-04,67	0,0005*
	X ₂ * X ₄	0,4564	0,1089	4,190	0,0012*
	X ₃ * X ₄	-0,1694	0,1089	-01,56	0,1456
Quadratique	X ₁ ²	-1,4645	0,2716	-05,39	0,0002*
	X ₂ ²	-0,5610	0,2716	-02,07	0,0611
	X ₃ ²	0,0275	0,2716	00,10	0,9210
	X ₄ ²	-0,9090	0,2716	-03,35	0,0058*

(*): facteur est significatif

Les conditions optimales pour un rendement maximal en sucres réducteurs extrait par des déchets de sarment de la vigne de la variété cardinale étaient respectivement, le rapport 6 g/100 mL (poids / volume), la puissance des radiations de micro-onde 350 W et le temps extraction 90 minutes, avec une concentration d'acide sulfurique H₂SO₄ de 4 %. La valeur prédite des sucres réducteurs était de 7,617 %.

IV.6.3.2. Teneur des flavonoïdes totaux et des polyphénols totaux des hydrolysats extraits par micro-onde

La teneur en phénolique totale et la teneur en flavonoïdes totaux des extraits de sarments de vigne de variété de cardinale obtenus à l'aide des trois différentes techniques d'extraction, à savoir l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction sous reflux et l'extraction conventionnelle (Prétraitement). La teneur en polyphénols totaux exprimée en ($\mu\text{g}/\text{mL}$ équivalent l'acide gallique) donne une estimation globale de la teneur de différentes classes des composés phénoliques contenus dans l'extrait analysé. Pour la variété étudiée les moins élevées du contenu phénolique total ont été obtenues avec les techniques d'extraction les plus respectueuses de l'environnement, l'extraction sous reflux et l'extraction assisté par micro-onde ($80,519 \pm 0,423$ et $94,259 \pm 1,645 \mu\text{g}/\text{mL}$ d'équivalents d'acide gallique respectivement).

Contrairement, pour la teneur totale en flavonoïdes, le rendement maximal a été obtenu avec les techniques d'extraction les plus respectueuses de l'environnement, à savoir l'extraction assisté par micro-onde, et extraction sous reflux de sarment de la vigne de variété de cardinale ($50,663 \pm 4,862$ et $47,621 \pm 6,879 \mu\text{g}/\text{mL}$). Ces différences entre les techniques testées pourraient être liées au principe qui sous-tend chaque extraction utilisée. Les flavonoïdes constituent une classe importante de composés bioactifs en raison de leurs propriétés antioxydants, anti cancérigènes et antiinflammatoires polyvalentes et de leur capacité à avoir des effets anti-péroxydant sur les lipides. On compare nos résultats avec d'autres échantillons, on constate que la teneur des flavonoïdes et les polyphénols sont moins faible que celle qui sont trouvé dans la littératures [183]. En général, la teneur en polyphénols totaux varie quantitativement d'une plante à une autre ; ceci peut être lié à plusieurs facteurs

- Les facteurs environnementaux : zone géographique, sécheresse, agressions et maladies, etc.
- Les facteurs génétiques, le moment de la récolte et le stade de développement de la plante.
- La nature du sol et le type de microclimat.
- La maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols.

Tableau IV.12 : Résultats de dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des différents d'échantillons de sarment de la vigne

	Extraction conventionnelle	Hydrolyse Sous reflux	Hydrolyse (micro-onde)
A vide	21,4160	20,4213	19,6104
Eau	31,2815	30,3266	29,4803
Echantillon	31,7669	31,7435	30,5643
Densité	1,0492	1,1430	1,1098
10 mg d'extrait = Prise de Volume (mL)	0,00953	0,008748	0,0090
Polyphénols totaux ($\mu\text{g/mL}$)	146,249 \pm 1,435	80,519 \pm 0,423	94,259 \pm 1,645
Flavonoïdes ($\mu\text{g/mL}$)	14,382 \pm 4,199	47,621 \pm 6,879	50,663 \pm 4,862

IV.7. Saccharification de la biomasse lignocellulosique

Le tableau IV.13 représente les résultats de la saccharification d'un échantillon de la biomasse lignocellulosique de sarment de la vigne 2g d'échantillon dans solution tampon à un pH = 4 incubé pendant 24h dans un incubateur à une température de 40 °C sous une agitation de 150 tr \ min, comparé par un échantillon de la même quantité extrait par un traitement acide sous micro-onde. La figure IV.7 représente la saccharification enzymatique à partir de la biomasse lignocellulosique.

Tableau IV.13: Résultats d'hydrolyse acide et d'une saccharification d'échantillon de la biomasse lignocellulosique

Saccharification		
Hydrolyse acide 776,666 mg/L * 10	Hydrolyses enzymatiques	
	1. Cocktail enzyme	414,456 mg/L
	2. Cellulase enzyme	570,055 mg/L

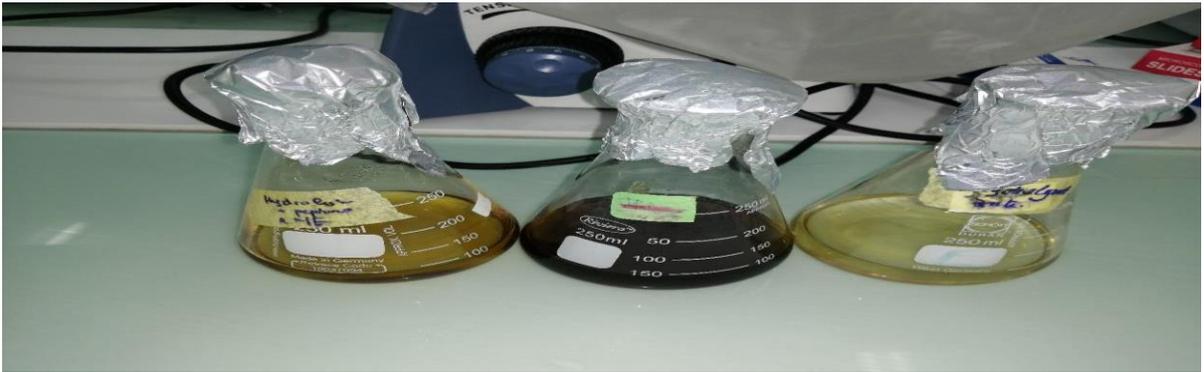


Figure IV.7 : Hydrolyse enzymatique pour l'extraction des sucres réducteurs à partir de la biomasse lignocellulosique

IV.8. Fermentation alcoolique

IV.8.1. Résultats de la vérification de la pureté des souches de la *Saccharomyces cerevisiae*

IV.8.1.1. Résultat de l'observation macroscopique

Du point de vue macroscopique et d'après la figure IV.8 on remarque que les deux souches *Saccharomyces cerevisiae* ATCC®9763, et ACTIFLORE® ROSÉ se ressemblent morphologiquement et ayant les caractères culturels suivant : elles sont de consistance crémeuse, une surface lisse, opacité compacte avec une forme et contour régulier de couleur blanche, confirmant ainsi que leur pureté.

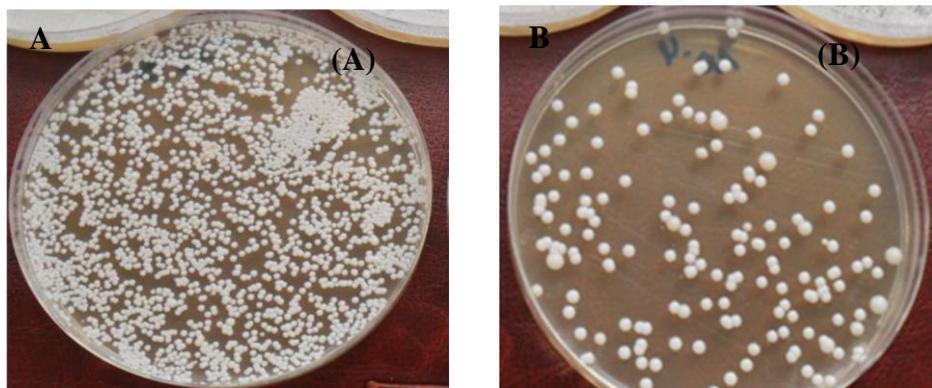


Figure IV.8 : Photo montrant les colonies des deux levures de *Saccharomyces cerevisiae* référenciés (A) ACTIFLORE® ROSÉ et (B) ATCC® 9763 ensemencées sur le milieu YEPDA

IV.8.1.2. Résultat de l'observation microscopique des souches de *Saccharomyces cerevisiae*

L'observation microscopique a été réalisée à l'état frais sur les trois souches de *Saccharomyces cerevisiae*, d'après la figure IV.9, les cellules des souches ont une morphologie globuleuse à ovoïde allongée avec un mode de reproduction par bourgeonnement.

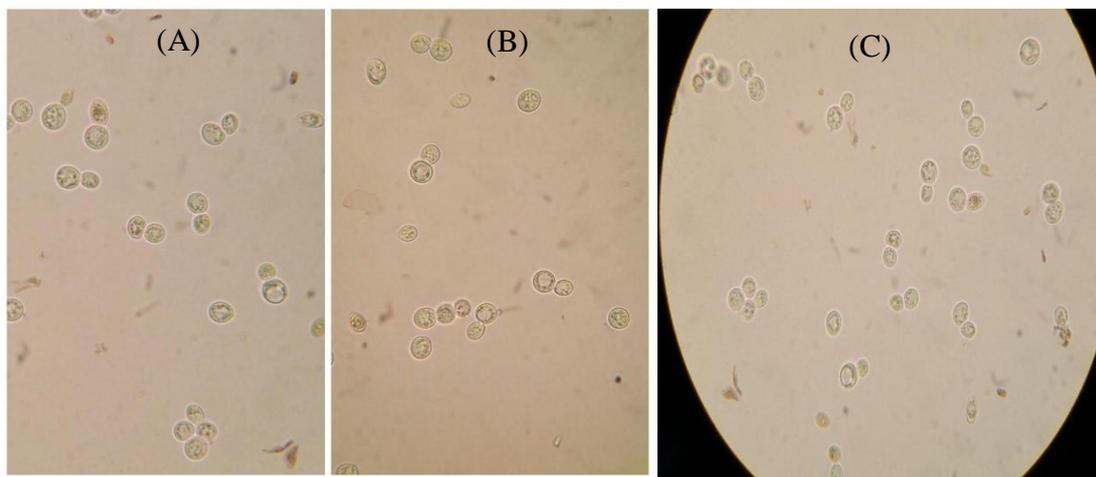


Figure IV.9 : Aspect microscopique à l'état frais de la levure *Saccharomyces cerevisiae* lyophilisée (A), l'ATCC® 9763 (B), ACTIFLORE® ROSÉ (C) observée par le microscope photonique (G x 100).

IV.8.1.3. Résultat de détermination de la température et pH optimum de la croissance des trois levures de *Saccharomyces cerevisiae*

D'après le tableau IV.14 on remarque que la levure *Saccharomyces cerevisiae* lyophilisée représente une croissance négative à pH neutre et à des températures 27 et 30 °C alors qu'elle peut tolérer une température de 35°C à un pH acide égale à 4 bien qu'une croissance maximale a été enregistrée à des températures plus au moins élevées de l'ordre de 37°C et 40°C au niveau du même pH d'où cette souche peut être classée comme étant une souche thermo tolérante et acidophile. Contrairement à la souche lyophilisée, la *Saccharomyce cerevisiae* ATCC® 9763 a donné une croissance maximale à pH neutre à une température de 27°C, donc cette dernière est classée dans la catégorie des thermophiles neutrophiles. Par contre, le *saccharomyce cerevisiae* ACTIFLORE® ROSÉ, cette souche de référence a donné une croissance maximale à un pH = 5 et à une température de 27 °C, ce qu'il fait donc, cette souche est classée autant qu'une souche thermophile, acidophile.

Tableau IV.14 : Comportement de la croissance des levures *saccharomyces cerevisiae* en fonction du pH et de la température

Levure	pH	Température (°C)					
		27	30	35	37	40	45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	–	–	++	+++	+++	++
<i>Lyophilisée</i>	5	–	–	–	+++	+++	++
	6	+	+	+	+	+	+
	7	–	–	–	–	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	–	–	–	–	–	–
<i>ATCC® 9763</i>	5	–	–	–	–	–	–
	6	++	–	–	–	–	–
	7	+++	++	+	–	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	++	++	+	-	-	-
<i>ACTIFLORE® ROSÉ</i>	5	+++	++	+	-	-	-
	6	+	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-

IV.8.2. Identification qualitative du bioéthanol

Une identification qualitative de bioéthanol a été faite pour chaque type d'échantillon avant une analyse analytique du bioéthanol pour prédire la présence d'éthanol dans les échantillons fermenté par différents types de levures de la *Saccharomyces cerevisiae* après une saccharification, la couleur verdâtre prédire une présence d'éthanol dans l'échantillon à analysés, et cela dû à la réaction d'oxydation de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) dans un milieu acide avec l'éthanol (CH_3CH_2OH), (voir annexe figure 12).

IV.8.2.1. Les résultats de la fermentation alcoolique par levure *Saccharomyces cerevisiae* *ACTIFLORE® ROSÉ*, *ATCC® 9763* et *lyophilisée*

Le processus de production d'éthanol par fermentation est favorable s'il permet de produire rapidement des concentrations élevées tout en maintenant des rendements élevés. Ces conditions sont nécessaires pour minimiser les coûts d'investissement et l'énergie nécessaire à la distillation [184] . Un autre facteur important dans les processus de fermentation est la concentration de substrat. Une concentration élevée de substrat inhibe la croissance

cellulaire et la formation de produits et peut fausser le métabolisme de la souche productrice [185]. En ce qui concerne la fermentation de l'éthanol, des études antérieures ont montré que l'inhibition du substrat devient significative dans une fourchette de 5 à 25 % de sucre, avec une inhibition complète de la croissance à 40 % de glucose [186]. Les tableaux IV.15 et IV.16 présente les résultats de la production de bioéthanol par différentes méthodes de traitement (hydrolyse assistée par micro-onde à l'aide d'acide sulfurique, hydrolyse sous reflux par acide trifluoroacétique et hydrolyse enzymatique par trois différents enzymes de la cellulase) dans les milieux enrichis et non enrichi fermenté de trois type de levure de la *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que des mesures de teneur en sucres réducteurs après un prétraitement et après la fermentation alcoolique. La moyenne de la teneur en sucres réducteurs après le prétraitement pour la méthode de traitement hydrolyse assistée par micro-onde, hydrolyse par acide trifluoroacétique et la méthode d'hydrolyse enzymatique sous une cellulase *aspergillus Niger* 1,4 - (1,3 : 1,4) – β -D-glucane,1,4 glucanohydrollase est de 53,073 et 91,683 g/L respectivement. La moyenne de la teneur en sucres réducteurs après la fermentation alcoolique (DNS) Pour la méthode de traitement Hydrolyse assistée par micro-onde, hydrolyse par acide sulfurique et la méthode d'Hydrolyse enzymatique sous une cellulase à partir *aspergillus Niger* 1,4 - (1,3 : 1,4) – β -D-glucane,1,4 glucanohydrollase est de 1,125 et 0,723 g/L respectivement. Les meilleurs rendements enregistrés c'est la fermentation par la levure lyophilisée quel que soit les milieux enrichis ou non enrichis par rapport à la levure ATTC et aussi dans le cas d'hydrolyse enzymatique. La teneur en bioéthanol enregistré est celle des hydrolysés fermenté par la levure *Saccharomyces cerevisiae* ACTIFLORE® ROSÉ. Les valeurs de déviation standard sont également fournies pour chaque série de données de 6 échantillons, elles indiquent la dispersion de données autour de la moyenne, comme présente dans le tableau IV.15

Tableau IV.15 : Résultats de la fermentation alcoolique des déchets de sarment de la vigne fermenté par la levure *Saccharomyces cerevisiae* *ACTIFLORE® ROSÉ*

	Hydrolyse acide (H ₂ SO ₄) assisté par micro-onde		Hydrolyse enzymatique sous une Cellulase aspergillus Niger 1,4 - (1,3 : 1,4) – β-D-glucane,1,4 glucanohydrollase	
	Prétraitement	Fermentation alcoolique	Prétraitement	Fermentation alcoolique
Teneur des sucres réducteurs (g/L)	53 ,073± 2,505	1,125± 0,124	91,683 ± 1,557	0,723 ± 0,114
La production de bioéthanol				
Résultats	11,29 ± 1,069 (g/L)	1,267 ± 0,23 (%)	26,435 ± 2,66 (g/L)	3,01 ± 0,146 (%)
Rendement (g/g)	0,231 ± 0,009		0,285 ± 0,008	

Tableau IV.16 : Résultat de la fermentation alcoolique pour la production d'un biocarburant

Essai	Type de traitement	Technique	Types de milieu	Levure	Concentration Bioéthanol	
					%	g/L
01	Physico-chimique	Hydrolyse acide par acide sulfurique assisté par Micro-onde	Milieu non enrichi	ATCC® 9763	1,01	08,011
				<i>Lyophilisée</i>	1,34	10,701
			Milieu enrichi	ATCC® 9763	1,22	09,731
			<i>Lyophilisée</i>	1,61	12,847	
		Hydrolyse acide sous reflux par TFA	Milieu non enrichi	ATCC® 9763	0,89	07,110
				<i>Lyophilisée</i>	1,02	08,109
Milieu enrichi	ATCC® 9763		1,19	09,469		
	<i>Lyophilisée</i>	1,53	12,175			
02	Enzymatique	Saccharification fermentation simultanée	Celluclast 1.5L (Novozymes)	ATCC® 9763	1,28	10,192
				<i>Lyophilisée</i>	1,31	10,443
		Saccharification fermentation séparée	Commercial cellulolytic cocktail SN 50100	ATCC® 9763	1,21	09,680
			<i>Lyophilisée</i>	1,30	10,364	

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une valorisation de la biomasse lignocellulosique issue des sarments de la vigne de variété de cardinale de la région de Bordj Menaiel la wilaya de Boumerdes, Algérie. La production d'un hydrolysats riche en sucres réducteurs extrait par différentes techniques d'extraction en utilisant les outils d'optimisations par une stratégie des plans d'expériences, le criblage et la surface de réponses suivie d'une production de bioéthanol par des souches levurienne de la *Saccharomyces cerevisiae*. Ces travaux ont permis de développer un bioprocédé capable de produire du bioéthanol de deuxième génération. Les premiers travaux de cette étude ont été porté sur une caractérisation thermique, chimique, structurale et morphologique de la biomasse lignocellulosique. Les premiers résultats ont permis de valider la faisabilité de ce projet de valorisation par la teneur élevée en holocellulose et une faible fraction de la composition en lignine. La caractérisation de la matière première montre que :

La composition de la biomasse lignocellulosique correspondant à un mélange de trois fractions polymériques.

La composition chimique des déchets de cardinale était la suivante (43,38 % de cellulose, 23,58 % d'hémicellulose, 21,22 % de lignine, 2,53 % de cendres, 5,82 % de protéines brutes, 11,7 % d'humidité et des matières extractibles (0,81 % de matières grasses, 0,56 % de sucres totaux, 2,3 % de matières extractibles (Hexane-éthanol)). La deuxième partie de ce travail a porté sur le prétraitement, hydrolyse acide et enzymatique de la biomasse lignocellulosique en composés à grande valeur ajoutée et l'obtention d'une quantité maximale de sucres réducteurs. En outre, les résultats obtenus à partir des caractérisations physiques et chimiques ont démontré que les déchets de sarments de vigne cardinale sont une excellente source de composés bioactifs et peuvent être utilisés comme matière première potentielle pour produire des produits biochimiques.

Les essais de prétraitement ont permis de montrer que :

- Le prétraitement permet effectivement de récupérer un solide riche en cellulose et une solution riche en lignine solubilisée qu'il est ensuite possible de récupérer par précipitation dans l'eau.
- La présence d'acide sulfurique (H_2SO_4) en tant que catalyseur est absolument nécessaire à la délignification, et élimine toute trace de lignine par autoclavage.

- Il existe une concentration optimale, voisine de 3 %, car un excès d'acide dégrade à la fois la lignine et la cellulose, mais favorise aussi la formation des inhibiteurs de fermentation ;
- L'augmentation de la température favorise la délignification, mais elle dégrade aussi la cellulose et favorise la formation d'inhibiteurs.

Pour l'étude statistique, 3 plans d'expériences ont été effectués, un plan de criblage (Plackett- Burman) et deux plans d'optimisation de surface de réponse ont été faites, (plan de Box Behnken et plan Composite centrale).

A cet effet, les plans de Plackett-Burman, de Box Behnken, et de centrale composite design ont été des approches efficaces pour cribler et optimiser les paramètres d'extraction des sucres réducteurs afin d'obtenir un rendement maximal. Le plan de Plackett-Burman a permis d'identifier la température, la concentration et le rapport (solide-liquide) comme les facteurs significatifs influençant l'extraction des sucres réducteurs. Les conditions optimales du criblage étaient : (500 μm , 10 % (V/V), 100 °C, 5 g/100 mL, 180 min et 750 tr/min). Dans cette étape, l'extraction du sucre réducteur a été augmentée de 1 à 2,53 g/L, avec un rendement de 150%. Les conditions optimisées selon le modèle de Box Behnken étaient : (125 μm , 5,5 % (V/V), 100 °C, 5 g/100 mL, 180 min et 750 tr /min). Le modèle polynomial s'est adapté avec précision aux données expérimentales et aux conditions optimales ; le modèle a donc été validé expérimentalement. Les conditions d'optimisations des sucres réducteurs selon le modèle central composite design étaient : (500 μm , 4 % (V/V), 350 Watt, 6 g/100 mL, 90 min).

La troisième partie de ce travail a porté sur une investigation microbienne et expérimentale de la production de bioéthanol. Les déchets de la vigne Cardinale sont une source non utilisée de biomasse lignocellulosique, dont la production de bioéthanol n'a été établie par aucune étude jusqu'à présent. En fait, un plan composite central rotatif a été utilisé pour obtenir le maximum de sucres réducteurs utilisés dans la fermentation du bioéthanol comme source de carbone. Le total des sucres réducteurs a été estimé par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS). D'un point de vue économique, cette étude suggère que la substitution partielle de l'essence produite dans le pétrole brut de la raffinerie à partir de l'unité de distillation atmosphérique, MS bloc en tant qu'unité d'isomérisation du naphta léger (produit isomérat), de l'unité de régénération continue du catalyseur de reformage du naphta lourd (produit reformat), du bloc de craquage catalytique du fluide résiduel en tant qu'huile

du cycle léger avec le bioéthanol produit à partir des déchets de la vigne Cardinale pourrait conduire à un aspect commercial significatif d'économies de carburant pour le secteur des transports en Algérie.

Défis et perspectives

La biomasse lignocellulosique est la matière première naturelle la plus abondante pour la production de produits chimiques, des biocarburants et de matériaux biosourcés pour les besoins industriels ou la vie quotidienne. La plateforme de biogaz utilise les méthodes de digestion anaérobie pour la production de biométhane. Les huiles végétales de palme, de maïs, de soja et de canola sont les principales sources de matières premières pour la plateforme des chaînes riches en carbone. Les esters méthyliques d'acides gras obtenus par le procédé de Trans-estérification de l'huile végétale ou de la graisse animale sont utilisés dans la production de biodiesel. Cependant, il existe encore des obstacles dans les technologies de bioraffinerie qu'il fallait surmonter. Certains obstacles dans les technologies de conversion thermochimique de la biomasse lignocellulosique comprennent une efficacité énergétique globale insatisfaisante, la qualité et la cohérence des produits bio-huileux, la fiabilité et l'évolutivité du réacteur, et des normes complètes de qualité des produits pour les producteurs et les consommateurs. L'innovation et l'amélioration de la fiabilité des réacteurs, le développement de catalyseurs pour la valorisation des bio-huiles, les Co-mélanges ou co-blendings avec d'autres matières premières, l'intégration avec d'autres sources d'énergie renouvelable, et d'autres sont plusieurs directions de recherche qui peuvent être poursuivies.

Du point de vue des perspectives, il est clair qu'une optimisation plus poussée des conditions opératoires et des technologies du procédé est encore nécessaire. Les deux pistes principales résident d'une part dans une diminution de la durée et de la température du prétraitement afin de réduire son coût énergétique, et d'autre part dans la recherche de cocktails enzymatiques encore plus efficaces afin de réduire la durée de l'opération. Dans le cas du prétraitement, il est également clair que le changement d'échelle pilote vers l'industriel constitue à la fois un challenge et une opportunité car les transferts thermiques et la mise sous pression sont difficile à réaliser, des technologies alternatives performantes n'existant pas à petite échelle peuvent devenir accessibles. Enfin, une analyse techno-économique détaillée qui prendra en compte ces technologies reste une étape indispensable et elle devra faire l'objet d'une étude dédiée dans le futur.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Changements Climatiques, Ministère de l'environnement (n.d.). <https://www.me.gov.dz/fr/changements-climatiques/> (accessed June 22, 2023).
- [2] Ministère de l'Énergie | Algérie, (n.d.). <https://www.energy.gov.dz/?rubrique=energies-nouvelles-renouvelables-et-maitrise-de-lrenergie> (accessed June 22, 2023).
- [3] E.B. Sydney, L.A.J. Letti, S.G. Karp, A.C.N. Sydney, L.P.D.S. Vandenberghe, J.C. De Carvalho, A.L. Woiciechowski, A.B.P. Medeiros, V.T. Soccol, C.R. Soccol, Current analysis and future perspective of reduction in worldwide greenhouse gases emissions by using first and second generation bioethanol in the transportation sector, *Bioresource Technology Reports* 7 (2019) 100234. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100234>.
- [4] J. Cooper, J. Kavanagh, A. Razmjou, V. Chen, G. Leslie, Treatment and resource recovery options for first and second generation bioethanol spentwash – A review, *Chemosphere* 241 (2020) 124975. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124975>.
- [5] K.K. Valladares-Diestra, L. Porto De Souza Vandenberghe, V.S. Nishida, L.A. Zevallos Torres, A. Zandoná Filho, C.R. Soccol, Integrated sugarcane biorefinery for first- and second-generation bioethanol production using imidazole pretreatment, *Journal of Cleaner Production* 381 (2022) 135179. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135179>.
- [6] R.F. Association, Annual Ethanol Production, Renewable Fuels Association (n.d.). <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production> (accessed June 22, 2023).
- [7] Ethanol fuel production in Brazil 2021, Statista (n.d.). <https://www.statista.com/statistics/981955/brazil-ethanol-fuel-production/> (accessed June 22, 2023).
- [8] T.W. Counts, Global Energy Consumption, (n.d.). <https://www.theworldcounts.com/challenges/climate-change/energy/global-energy-consumption> (accessed June 22, 2023).
- [9] IEA – International Energy Agency, IEA (n.d.). <https://www.iea.org> (accessed June 22, 2023).
- [10] J.B. Holm-Nielsen, Introduction to biomass supply chains, in: *Biomass Supply Chains for Bioenergy and Biorefining*, Elsevier, 2016: pp. 3–13. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-366-9.00001-0>.
- [11] A. Suman, Role of renewable energy technologies in climate change adaptation and mitigation: A brief review from Nepal, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 151 (2021) 111524. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111524>.
- [12] C. Jung, D. Schindler, A review of recent studies on wind resource projections under climate change, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 165 (2022) 112596. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112596>.
- [13] A. Noor, Climate change adaptation and mitigation in cities, in: *Urban Climate Adaptation and Mitigation*, Elsevier, 2023: pp. 23–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85552-5.00001-4>.
- [14] L. Wang, F. Zhang, X. Shi, C. Zeng, I. Ahmad, G. Wang, S. Thapa, X. Xu, Water resources system vulnerability in high mountain areas under climate change, *Journal of Cleaner Production* 403 (2023) 136789. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136789>.

- [15] S. Perkins-Kirkpatrick, D. Green, Extreme heat and climate change, in: *Heat Exposure and Human Health in the Context of Climate Change*, Elsevier, 2023: pp. 5–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819080-7.00006-9>.
- [16] C.J. Hamilton, Coal and “climate change,” in: *The Coal Handbook*, Elsevier, 2023: pp. 77–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824327-5.00007-7>.
- [17] R.A. Usmani, Biofuel consumption and global climate change: Solutions and challenges, in: *Environmental Sustainability of Biofuels*, Elsevier, 2023: pp. 183–200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91159-7.00019-9>.
- [18] A.B. Omotoso, S. Letsoalo, K.O. Olagunju, C.S. Tshwene, A.O. Omotayo, Climate change and variability in sub-Saharan Africa: A systematic review of trends and impacts on agriculture, *Journal of Cleaner Production* (2023) 137487. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137487>.
- [19] L.E. Bender, S.T. Lopes, K.S. Gomes, R.J.B. Devos, L.M. Colla, Challenges in bioethanol production from food residues, *Bioresource Technology Reports* 19 (2022) 101171. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101171>.
- [20] A.K. Das, A. Sharma, Climate change and the energy sector, in: *Advancement in Oxygenated Fuels for Sustainable Development*, Elsevier, 2023: pp. 1–6. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90875-7.00006-X>.
- [21] P. Zhu, Z. (Justin) Zhang, B. Lin, Understanding spatial evolution of global climate change risk: Insights from convergence analysis, *Journal of Cleaner Production* 413 (2023) 137423. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137423>.
- [22] N.M. Clauser, F.E. Felissia, M.C. Area, M.E. Vallejos, A framework for the design and analysis of integrated multi-product biorefineries from agricultural and forestry wastes, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 139 (2021) 110687. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110687>.
- [23] J. Gaffey, G. Rajauria, H. McMahon, R. Ravindran, C. Dominguez, M. Ambye-Jensen, M.F. Souza, E. Meers, M.M. Aragonés, D. Skunca, J.P.M. Sanders, Green Biorefinery systems for the production of climate-smart sustainable products from grasses, legumes and green crop residues, *Biotechnology Advances* 66 (2023) 108168. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108168>.
- [24] P.V. Almeida, L.M. Gando-Ferreira, M.J. Quina, Biorefinery perspective for industrial potato peel management: technology readiness level and economic assessment, *Journal of Environmental Chemical Engineering* 11 (2023) 110049. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110049>.
- [25] A. Velidandi, P. Kumar Gandam, M. Latha Chinta, S. Konakanchi, A. Reddy Bhavanam, R. Raju Baadhe, M. Sharma, J. Gaffey, Q.D. Nguyen, V.K. Gupta, State-of-the-art and future directions of machine learning for biomass characterization and for sustainable biorefinery, *Journal of Energy Chemistry* 81 (2023) 42–63. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2023.02.020>.
- [26] A. Yadav, V. Sharma, M.-L. Tsai, C.-W. Chen, P.-P. Sun, P. Nargotra, J.-X. Wang, C.-D. Dong, Development of lignocellulosic biorefineries for the sustainable production of biofuels: Towards circular bioeconomy, *Bioresource Technology* 381 (2023) 129145. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129145>.
- [27] H. Ohara, *Biorefinery*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (2003) 474–477. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1383-7>.
- [28] J. Castilla-Archilla, V. O’Flaherty, P.N.L. Lens, *Biorefineries: Industrial Innovation and Tendencies*, in: J.-R. Bastidas-Oyanedel, J.E. Schmidt (Eds.), *Biorefinery*, Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 3–35. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_1.

- [29] N.S. Bentsen, Biomass for Biorefineries: Availability and Costs, in: J.-R. Bastidas-Oyanedel, J.E. Schmidt (Eds.), *Biorefinery*, Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 37–48. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_2.
- [30] T. Tan, J.-H. Xu, *Biorefinery: an Efficient Way to Sustainable Development of Chemical Industry—a Special Issue for International Conference on Biorefinery (ICB 07) and the 5th International Conference on Separation Science and Technology (ICSST2007)*, *Appl Biochem Biotechnol* 160 (2010) 301–302. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8785-7>.
- [31] Q. Fei, Y. Liu, H. Meruvu, Z. Jiao, R. Fu, Advanced Fermentation Strategies to Enhance Lipid Production from Lignocellulosic Biomass, in: Z.-H. Liu, A. Ragauskas (Eds.), *Emerging Technologies for Biorefineries, Biofuels, and Value-Added Commodities*, Springer International Publishing, Cham, 2021: pp. 229–243. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65584-6_10.
- [32] H. Chen, *Anaerobic Solid-State Fermentation*, in: *Modern Solid State Fermentation*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2013: pp. 199–242. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1_5.
- [33] D. Sidiras, D. Politi, G. Giakoumakis, I. Salapa, Simulation and optimization of organosolv based lignocellulosic biomass refinery: A review, *Bioresource Technology* 343 (2022) 126158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126158>.
- [34] M. Faisal, A. Saeed, Sustainable Approaches Toward the Production of Bioethanol from Biomass, in: M. Arshad (Ed.), *Sustainable Ethanol and Climate Change*, Springer International Publishing, Cham, 2021: pp. 15–38. https://doi.org/10.1007/978-3-030-59280-6_2.
- [35] S. Ingale, V.A. Parnandi, S.J. Joshi, Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized in Calcium Alginate–Magnetite Beads and Application of Response Surface Methodology to Optimize Bioethanol Yield, in: N. Srivastava, M. Srivastava, P.K. Mishra, S.N. Upadhyay, P.W. Ramteke, V.K. Gupta (Eds.), *Sustainable Approaches for Biofuels Production Technologies*, Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 147–181. https://doi.org/10.1007/978-3-319-94797-6_9.
- [36] P. Bajpai, *Chemistry, Types and Sources of Ethanol*, in: *Developments in Bioethanol*, Springer Singapore, Singapore, 2021: pp. 27–39. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8779-5_4.
- [37] J.G. Segovia-Hernández, E. Sanchez-Ramirez, H. Alcocer-Garcia, A.G. Romero-Garcia, J.J. Quiroz-Ramirez, Bioethanol, in: *Sustainable Production of Biofuels Using Intensified Processes*, Springer International Publishing, Cham, 2022: pp. 25–50. https://doi.org/10.1007/978-3-031-13216-2_3.
- [38] H.B. Aditiya, T.M.I. Mahlia, W.T. Chong, H. Nur, A.H. Sebayang, Second generation bioethanol production: A critical review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66 (2016) 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>.
- [39] B.M. Masum, H.H. Masjuki, M.A. Kalam, S.M. Palash, M.A. Wakil, S. Imtenan, Tailoring the key fuel properties using different alcohols (C₂–C₆) and their evaluation in gasoline engine, *Energy Conversion and Management* 88 (2014) 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.08.050>.
- [40] L.R. Lynd, J.H. Cushman, R.J. Nichols, C.E. Wyman, Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass, *Science* 251 (1991) 1318–1323. <https://doi.org/10.1126/science.251.4999.1318>.
- [41] O.C. Nwifo, O.M.I. Nwafor, J.O. Igbokwe, Effects of blends on the physical properties of bioethanol produced from selected Nigerian crops, *International Journal of Ambient Energy* 37 (2016) 10–15. <https://doi.org/10.1080/01430750.2013.866907>.

- [42] T.T. Manhongo, A.F.A. Chiphango, P. Thornley, M. Röder, Current status and opportunities for fruit processing waste biorefineries, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 155 (2022) 111823. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111823>.
- [43] Anu, A. Kumar, A. Rapoport, G. Kunze, S. Kumar, D. Singh, B. Singh, Multifarious pretreatment strategies for the lignocellulosic substrates for the generation of renewable and sustainable biofuels: A review, *Renewable Energy* 160 (2020) 1228–1252. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.031>.
- [44] M.K. Mahapatra, A. Kumar, Fermentation of Oil Extraction: Bioethanol, Acetone and Butanol Production, in: A.A. Rastegari, A.N. Yadav, A. Gupta (Eds.), *Prospects of Renewable Bioprocessing in Future Energy Systems*, Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 219–249. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14463-0_8.
- [45] P. Bajpai, Production of Bioethanol, in: *Developments in Bioethanol*, Springer Singapore, Singapore, 2021: pp. 41–110. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8779-5_5.
- [46] T.A. Moonsamy, M. Mandegari, S. Farzad, Johann.F. Görgens, A new insight into integrated first and second-generation bioethanol production from sugarcane, *Industrial Crops and Products* 188 (2022) 115675. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115675>.
- [47] S.N. Naik, V.V. Goud, P.K. Rout, A.K. Dalai, Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>.
- [48] C. Boutesteyjn, D. Drabik, T.J. Venus, The interaction between EU biofuel policy and first- and second-generation biodiesel production, *Industrial Crops and Products* 106 (2017) 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.067>.
- [49] P. Havlík, U.A. Schneider, E. Schmid, H. Böttcher, S. Fritz, R. Skalský, K. Aoki, S.D. Cara, G. Kindermann, F. Kraxner, S. Leduc, I. McCallum, A. Mosnier, T. Sauer, M. Obersteiner, Global land-use implications of first and second generation biofuel targets, *Energy Policy* 39 (2011) 5690–5702. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.03.030>.
- [50] F. Saladini, N. Patrizi, F.M. Pulselli, N. Marchettini, S. Bastianoni, Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66 (2016) 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.073>.
- [51] S. Mohapatra, Chapter 1 - Bioethanol From Biorenewable Feedstocks: Technology, Economics, and Challenges, (n.d.).
- [52] B. Kumar, N. Bhardwaj, K. Agrawal, V. Chaturvedi, P. Verma, Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept, *Fuel Processing Technology* 199 (2020) 106244. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>.
- [53] B.V. Ayodele, M.A. Alsaffar, S.I. Mustapa, An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks, *Journal of Cleaner Production* 245 (2020) 118857. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118857>.
- [54] S.A. Haji Esmaeili, A. Sobhani, J. Szmerekovsky, A. Dybing, G. Pourhashem, First-generation vs. second-generation: A market incentives analysis for bioethanol supply chains with carbon policies, *Applied Energy* 277 (2020) 115606. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.115606>.
- [55] T. Bera, K.S. Inglett, P.W. Inglett, L. Vardanyan, A.C. Wilkie, G.A. O'Connor, K.R. Reddy, Comparing first- and second-generation bioethanol by-products from

- sugarcane: Impact on soil carbon and nitrogen dynamics, *Geoderma* 384 (2021) 114818. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114818>.
- [56] H. Chowdhury, B. Loganathan, Third-generation biofuels from microalgae: a review, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 20 (2019) 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.003>.
- [57] P. Kumar, B. Singh, S.B. Patwardhan, S. Dwivedi, S. Sarkar, A. Roy, S. Pandit, Brief Introduction to First, Second, and Third Generation of Biofuels, in: P. Chowdhary, N. Khanna, S. Pandit, R. Kumar (Eds.), *Bio-Clean Energy Technologies: Volume 1*, Springer Nature Singapore, Singapore, 2022: pp. 1–29. https://doi.org/10.1007/978-981-16-8090-8_1.
- [58] DIRECTIVE (EU) 2018/ 2001 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL - of 11 December 2018 - on the promotion of the use of energy from renewable sources, (n.d.).
- [59] J. Kirshner, E. Brown, L. Dunlop, J.P. Franco Cairo, K. Redeker, F. Veneu, S. Brooks, S. Kirshner, P.H. Walton, “A future beyond sugar”: Examining second-generation biofuel pathways in Alagoas, northeast Brazil, *Environmental Development* 44 (2022) 100739. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2022.100739>.
- [60] E. Bryngemark, Second generation biofuels and the competition for forest raw materials: A partial equilibrium analysis of Sweden, *Forest Policy and Economics* 109 (2019) 102022. <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2019.102022>.
- [61] Condor et al. - 2022 - Bioethanol production from microalgae biomass at h.pdf, (n.d.).
- [62] F. Alam, A. Date, R. Rasjidin, S. Mobin, H. Moria, A. Baqui, Biofuel from Algae- Is It a Viable Alternative?, *Procedia Engineering* 49 (2012) 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.10.131>.
- [63] S.A. Jambo, R. Abdulla, S.H. Mohd Azhar, H. Marbawi, J.A. Gansau, P. Ravindra, A review on third generation bioethanol feedstock, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 65 (2016) 756–769. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>.
- [64] M.P. Sudhakar, B.R. Kumar, T. Mathimani, K. Arunkumar, A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective, *Journal of Cleaner Production* 228 (2019) 1320–1333. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.287>.
- [65] F. Bibi, H. Yasmin, A. Jamal, M.S. AL-Harbi, M. Ahmad, M. Zafar, B. Ahmad, B.N. Samra, A.F. Ahmed, M.I. Ali, Deciphering role of technical bioprocess parameters for bioethanol production using microalgae, *Saudi Journal of Biological Sciences* 28 (2021) 7595–7606. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.011>.
- [66] K. Kusmiyati, H. Hadiyanto, A. Fudholi, Treatment updates of microalgae biomass for bioethanol production: A comparative study, *Journal of Cleaner Production* 383 (2023) 135236. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135236>.
- [67] J.-B. Beigbeder, J.-M. Lavoie, Effect of photoperiods and CO₂ concentrations on the cultivation of carbohydrate-rich *P. kessleri* microalgae for the sustainable production of bioethanol, *Journal of CO₂ Utilization* 58 (2022) 101934. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2022.101934>.
- [68] Megawati, Z.A.S. Bahlawan, A. Damayanti, R.D.A. Putri, B. Triwibowo, H. Prasetiawan, S.P.K. Aji, A. Prawisnu, Bioethanol production from glucose obtained from enzymatic hydrolysis of *Chlorella* microalgae, *Materials Today: Proceedings* 63 (2022) S373–S378. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.03.551>.
- [69] Priya, P.S. Deora, Y. Verma, R.A. Muhal, C. Goswami, T. Singh, Biofuels: An alternative to conventional fuel and energy source, *Materials Today: Proceedings* 48 (2022) 1178–1184. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.08.227>.

- [70] B. Abdullah, S.A.F. Syed Muhammad, Z. Shokravi, S. Ismail, K.A. Kassim, A.N. Mahmood, M.M.A. Aziz, Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 107 (2019) 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.018>.
- [71] N.S. Mat Aron, K.S. Khoo, K.W. Chew, P.L. Show, W. Chen, T.H.P. Nguyen, Sustainability of the four generations of biofuels – A review, *Int J Energy Res* 44 (2020) 9266–9282. <https://doi.org/10.1002/er.5557>.
- [72] S. Malik, A. Shahid, C.-G. Liu, A. Zafar Khan, M.Z. Nawaz, H. Zhu, M.A. Mehmood, Developing fourth-generation biofuels secreting microbial cell factories for enhanced productivity and efficient product recovery; a review, *Fuel* 298 (2021) 120858. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120858>.
- [73] N.S. Mosier, C.M. Ladisch, M.R. Ladisch, Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation, *Biotechnol. Bioeng.* 79 (2002) 610–618. <https://doi.org/10.1002/bit.10316>.
- [74] S. Ferreira, A.P. Duarte, M.H.L. Ribeiro, J.A. Queiroz, F.C. Domingues, Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production, *Biochemical Engineering Journal* 45 (2009) 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.03.012>.
- [75] R. Arora, Chapter 9 - Lignocellulosic Ethanol: Feedstocks and Bioprocessing, (n.d.).
- [76] T. Karl, A.J. Curtis, T.N. Rosenstiel, R.K. Monson, R. Fall, Transient releases of acetaldehyde from tree leaves – products of a pyruvate overflow mechanism?: Acetaldehyde emissions from tree leaves, *Plant, Cell & Environment* 25 (2002) 1121–1131. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00889.x>.
- [77] K.J. Jardine, N. McDowell, Fermentation-mediated growth, signaling, and defense in plants, *New Phytologist* 239 (2023) 839–851. <https://doi.org/10.1111/nph.19015>.
- [78] J.M. Candy, R.G. Duggleby, Structure and properties of pyruvate decarboxylase and site-directed mutagenesis of the *Zymomonas mobilis* enzyme, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1385 (1998) 323–338. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00077-6).
- [79] S. Chniti, Optimisation de la bioproduction d'éthanol par valorisation des refus de l'industrie de conditionnement des dattes, (n.d.).
- [80] H.B. Aditiya, T.M.I. Mahlia, W.T. Chong, H. Nur, A.H. Sebayang, Second generation bioethanol production: A critical review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66 (2016) 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>.
- [81] J. Chen, B. Zhang, L. Luo, F. Zhang, Y. Yi, Y. Shan, B. Liu, Y. Zhou, X. Wang, X. Lü, A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 149 (2021) 111370. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111370>.
- [82] Y. Wang, P. Liu, G. Zhang, Q. Yang, J. Lu, T. Xia, L. Peng, Y. Wang, Cascading of engineered bioenergy plants and fungi sustainable for low-cost bioethanol and high-value biomaterials under green-like biomass processing, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 137 (2021) 110586. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110586>.
- [83] O.A. Awadalla, W.A. Atawy, M.Y. Bedaiwy, S.S. Ali, Y.A.-G. Mahmoud, Anaerobic digestion of lignocellulosic waste for enhanced methane production and biogas-digestate utilization, *Industrial Crops and Products* 195 (2023) 116420. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116420>.
- [84] X. Wan, J. Liu, Y. Zhang, D. Tian, Y. Liu, L. Zhao, M. Huang, J. Hu, F. Shen, Conversion of agricultural and forestry biomass into bioethanol, water-soluble polysaccharides, and lignin nanoparticles by an integrated phosphoric acid plus

- hydrogen peroxide process, *Industrial Crops and Products* 191 (2023) 115969.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115969>.
- [85] S.-E. Ban, E.-J. Lee, J. Yoon, D.-J. Lim, I.-S. Kim, J.-W. Lee, Role of cellulose and lignin on biochar characteristics and removal of diazinon from biochar with a controlled chemical composition, *Industrial Crops and Products* 200 (2023) 116913.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116913>.
- [86] Z. Usmani, M. Sharma, P. Gupta, Y. Karpichev, N. Gathergood, R. Bhat, V.K. Gupta, Ionic liquid based pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion, *Bioresource Technology* 304 (2020) 123003.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123003>.
- [87] H. Xu, C. Dong, W. Wang, Y. Liu, B. Li, F. Liu, Machine learning prediction of deep eutectic solvents pretreatment of lignocellulosic biomass, *Industrial Crops and Products* 196 (2023) 116431. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116431>.
- [88] E.R. Abaide, M.V. Tres, G.L. Zobot, M.A. Mazutti, Reasons for processing of rice coproducts: Reality and expectations, *Biomass and Bioenergy* 120 (2019) 240–256.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.11.032>.
- [89] S.K. Bhatia, S.S. Jagtap, A.A. Bedekar, R.K. Bhatia, A.K. Patel, D. Pant, J. Rajesh Banu, C.V. Rao, Y.-G. Kim, Y.-H. Yang, Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges, *Bioresource Technology* 300 (2020) 122724.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>.
- [90] H. Liang, D. Yin, L. Shi, Y. Liu, X. Hu, N. Zhu, K. Guo, Surface modification of cellulose via photo-induced click reaction, *Carbohydrate Polymers* 301 (2023) 120321.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120321>.
- [91] S. Song, H. Li, P. Liu, X. Peng, Applications of cellulose-based composites and their derivatives for microwave absorption and electromagnetic shielding, *Carbohydrate Polymers* 287 (2022) 119347. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119347>.
- [92] Z. Sun, M. Ahmad, S. Wang, Ion transport property, structural features, and applications of cellulose-based nanofluidic platforms — A review, *Carbohydrate Polymers* 289 (2022) 119406. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119406>.
- [93] S. Tanpichai, A. Boonmahitthisud, N. Soykeabkaew, L. Ongthip, Review of the recent developments in all-cellulose nanocomposites: Properties and applications, *Carbohydrate Polymers* 286 (2022) 119192.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119192>.
- [94] Z. Zhang, N. Abidi, L. Lucia, S. Chabi, C.T. Denny, P. Parajuli, S.S. Rumi, Cellulose/nanocellulose superabsorbent hydrogels as a sustainable platform for materials applications: A mini-review and perspective, *Carbohydrate Polymers* 299 (2023) 120140. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120140>.
- [95] A. Lorenci Woiciechowski, C.J. Dalmas Neto, L. Porto de Souza Vandenberghe, D.P. de Carvalho Neto, A.C. Novak Sydney, L.A.J. Letti, S.G. Karp, L.A. Zevallos Torres, C.R. Soccol, Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances, *Bioresource Technology* 304 (2020) 122848.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>.
- [96] H. Tu, X. Li, Y. Liu, L. Luo, B. Duan, R. Zhang, Recent progress in regenerated cellulose-based fibers from alkali/urea system via spinning process, *Carbohydrate Polymers* 296 (2022) 119942. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119942>.
- [97] M. Saleh Mohammadnia, H. Roghani-Mamaqani, H. Mardani, A. Rezvani-Moghaddam, S. Hemmati, M. Salami-Kalajahi, Fluorescent cellulosic composites

- based on carbon dots: Recent advances, developments, and applications, *Carbohydrate Polymers* 294 (2022) 119768. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119768>.
- [98] M. Abhilash, D. Thomas, *Biopolymers for Biocomposites and Chemical Sensor Applications*, in: *Biopolymer Composites in Electronics*, Elsevier, 2017: pp. 405–435. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809261-3.00015-2>.
- [99] K. Ruel, Y. Nishiyama, J.-P. Joseleau, Crystalline and amorphous cellulose in the secondary walls of *Arabidopsis*, *Plant Science* 193–194 (2012) 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.05.008>.
- [100] W.-H. Chen, S. Nižetić, R. Sirohi, Z. Huang, R. Luque, A. M. Papadopoulos, R. Sakthivel, X. Phuong Nguyen, A. Tuan Hoang, Liquid hot water as sustainable biomass pretreatment technique for bioenergy production: A review, *Bioresource Technology* 344 (2022) 126207. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126207>.
- [101] Z. Chen, Y. Wang, H. Cheng, H. Zhou, Hemicellulose degradation: An overlooked issue in acidic deep eutectic solvents pretreatment of lignocellulosic biomass, *Industrial Crops and Products* 187 (2022) 115335. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115335>.
- [102] Y. Chen, H. Yang, H. Zou, T. Sun, M. Li, J. Zhai, Q. He, L. Gu, W.Z. Tang, Effects of acid/alkali pretreatments on lignocellulosic biomass mono-digestion and its co-digestion with waste activated sludge, *Journal of Cleaner Production* 277 (2020) 123998. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123998>.
- [103] J.P. Patel, P.H. Parsania, Characterization, testing, and reinforcing materials of biodegradable composites, in: *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites*, Elsevier, 2018: pp. 55–79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100970-3.00003-1>.
- [104] E.H. Ehte, E. Drumm, N. Abdoulmoumine, The effect of hemicellulose on the interparticle frictional behavior of lignocellulosic biomass particulates, *Particuology* 55 (2021) 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2020.09.002>.
- [105] H.V. Scheller, P. Ulvskov, Hemicelluloses, *Annu. Rev. Plant Biol.* 61 (2010) 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>.
- [106] C. Wang, S. Xia, C. Cui, S. Kang, A. Zheng, Z. Yu, Z. Zhao, Investigation into the correlation between the chemical structure of lignin and its temperature-dependent pyrolytic product evolution, *Fuel* 329 (2022) 125215. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125215>.
- [107] M.B. Folgueras, J.M. Gómez-Martín, M.A. Diez, How height-related variations in hybrid poplars affect composition and pyrolytic behaviour: The key role of lignin maturity during woody-biomass pyrolysis, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 169 (2023) 105861. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2023.105861>.
- [108] M.P. Gundupalli, K. Cheenkachorn, S. Chuetor, S. Kirdponpattara, S.P. Gundupalli, P.-L. Show, M. Sriariyanun, Assessment of pure, mixed and diluted deep eutectic solvents on Napier grass (*Cenchrus purpureus*): Compositional and characterization studies of cellulose, hemicellulose and lignin, *Carbohydrate Polymers* 306 (2023) 120599. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120599>.
- [109] F. Brienza, K. Van Aelst, F. Devred, D. Magnin, M. Tschulkow, P. Nimmegeers, S. Van Passel, B.F. Sels, P. Gerin, D.P. Debecker, I. Cybulska, Unleashing lignin potential through the dithionite-assisted organosolv fractionation of lignocellulosic biomass, *Chemical Engineering Journal* 450 (2022) 138179. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138179>.
- [110] Y. Han, Y. Bai, J. Zhang, D. Liu, X. Zhao, A comparison of different oxidative pretreatments on polysaccharide hydrolyzability and cell wall structure for interpreting the greatly improved enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by delignification, *Bioresources and Bioprocessing* 7 (2020) 1–16.

- [111] X. Meng, S. Bhagia, Y. Wang, Y. Zhou, Y. Pu, J.R. Dunlap, L. Shuai, A.J. Ragauskas, C.G. Yoo, Effects of the advanced organosolv pretreatment strategies on structural properties of woody biomass, *Industrial Crops and Products* 146 (2020) 112144. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112144>.
- [112] R. Wu, W. Liu, Z. Li, Q. Hou, Revealing adsorption of mixed enzymes onto lignin resulted from integration of hydrothermal and chemi-mechanical pretreatment, *Industrial Crops and Products* 194 (2023) 116353. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116353>.
- [113] M.A. Alio, Production de bioéthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique multi-ressources locale par prétraitement Organosolv et hydrolyse enzymatique, (n.d.).
- [114] H.A. Ruiz, M. Galbe, G. Garrote, D.M. Ramirez-Gutierrez, E. Ximenes, S.-N. Sun, D. Lachos-Perez, R.M. Rodríguez-Jasso, R.-C. Sun, B. Yang, M.R. Ladisch, Severity factor kinetic model as a strategic parameter of hydrothermal processing (steam explosion and liquid hot water) for biomass fractionation under biorefinery concept, *Bioresource Technology* 342 (2021) 125961. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125961>.
- [115] M. Ståhl, K. Nieminen, H. Sixta, Hydrothermolysis of pine wood, *Biomass and Bioenergy* 109 (2018) 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.12.006>.
- [116] H.A. Ruiz, W.G. Sganzerla, V. Larnaudie, R.J. Veersma, G. van Erven, Shiva, L.J. Ríos-González, R.M. Rodríguez-Jasso, G. Rosero-Chasoy, M.D. Ferrari, M.A. Kabel, T. Forster-Carneiro, C. Lareo, Advances in process design, techno-economic assessment and environmental aspects for hydrothermal pretreatment in the fractionation of biomass under biorefinery concept, *Bioresource Technology* 369 (2023) 128469. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128469>.
- [117] H.A. Ruiz, R.M. Rodríguez-Jasso, B.D. Fernandes, A.A. Vicente, J.A. Teixeira, Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21 (2013) 35–51. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.069>.
- [118] S. Guran, Sustainable Waste-to-Energy Technologies: Hydrothermal Liquefaction, in: *Sustainable Food Waste-To-Energy Systems*, Elsevier, 2018: pp. 159–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811157-4.00009-7>.
- [119] S.P.S. Chundawat, B. Venkatesh, B.E. Dale, Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 219–231. <https://doi.org/10.1002/bit.21132>.
- [120] H.K. Murnen, V. Balan, S.P.S. Chundawat, B. Bals, L. daCostaSouza, B.E. Dale, Optimization of Ammonia Fiber Expansion (AFEX) Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of *Miscanthus x giganteus* to Fermentable Sugars, *Biotechnol. Prog.* 23 (2007) 846–850. <https://doi.org/10.1021/bp070098m>.
- [121] K. Malik, P. Sharma, Y. Yang, P. Zhang, L. Zhang, X. Xing, J. Yue, Z. Song, L. Nan, S. Yujun, M.M. El-Dalatony, E.-S. Salama, X. Li, Lignocellulosic biomass for bioethanol: Insight into the advanced pretreatment and fermentation approaches, *Industrial Crops and Products* 188 (2022) 115569. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115569>.
- [122] Chenah, May, Contribution à la valorisation de l'ampelodesmos mauritanicus grâce à *saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 pour produire du biodiesel, M'hamed Bougara of Boumerdes, 2019. <http://dlibrary.univ-boumerdes.dz:8080/handle/123456789/5687>.
- [123] H. Chen, J. Liu, X. Chang, D. Chen, Y. Xue, P. Liu, H. Lin, S. Han, A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals, *Fuel Processing Technology* 160 (2017) 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>.

- [124] A.W. Bhutto, K. Qureshi, K. Harijan, R. Abro, T. Abbas, A.A. Bazmi, S. Karim, G. Yu, Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass, *Energy* 122 (2017) 724–745. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.01.005>.
- [125] J. Baruah, B.K. Nath, R. Sharma, S. Kumar, R.C. Deka, D.C. Baruah, E. Kalita, Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products, *Front. Energy Res.* 6 (2018) 141. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>.
- [126] D. Sidiras, D. Politi, G. Giakoumakis, I. Salapa, Simulation and optimization of organosolv based lignocellulosic biomass refinery: A review, *Bioresource Technology* 343 (2022) 126158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126158>.
- [127] J. Moncada, I. Vural Gursel, W.J.J. Huijgen, J.W. Dijkstra, A. Ramírez, Techno-economic and ex-ante environmental assessment of C6 sugars production from spruce and corn. Comparison of organosolv and wet milling technologies, *Journal of Cleaner Production* 170 (2018) 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.195>.
- [128] L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, Response Surface Methodology, in: *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, 2009: pp. 345–390. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00083-1>.
- [129] A.S. Thomareis, G. Dimitreli, Techniques used for processed cheese characterization, in: *Processed Cheese Science and Technology*, Elsevier, 2022: pp. 295–349. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821445-9.00007-8>.
- [130] D.B. Muñoz-Márquez, J.E. Wong-Paz, J.C. Contreras-Esquivel, R. Rodríguez-Herrera, C.N. Aguilar, Extraction of Phenolic Compounds From *Coriandrum sativum* L. and *Amaranthus hybridus* L. by Microwave Technology, in: *Polyphenols in Plants*, Elsevier, 2019: pp. 185–190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00012-8>.
- [131] M. Nassiri Mahallati, Advances in modeling saffron growth and development at different scales, in: *Saffron*, Elsevier, 2020: pp. 139–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00009-5>.
- [132] X. Guo, W. Jiang, D. Du, X. Shang, Plackett–Burman experimental design of modified wood ceramics for ammonia nitrogen removal from water and response optimization of the modified wood ceramic’s comprehensive performance, *Ceramics International* 49 (2023) 11612–11622. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.12.008>.
- [133] Y.M. Youssef, M.A. Mahrouse, E.A. Mostafa, Plackett–Burman and face-centered composite designs for development and optimization of chromatographic method for the simultaneous determination of glycopyrronium, indacaterol and mometasone in their fixed dose combination inhaler – Green profile assessment, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 234 (2023) 115553. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115553>.
- [134] M.H.Z.M. Harun, A.L. Ahmad, Optimization of ibuprofen and sulfamethoxazole extraction in green diluent liquid membrane using Plackett–Burman and Box Behnken designs, *Journal of Molecular Liquids* 390 (2023) 123084. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123084>.
- [135] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escalera, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76 (2008) 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>.
- [136] T.C. Nelsen, Efficient design of experiments (DOE), in: *Probability and Statistics for Cereals and Grains*, Elsevier, 2023: pp. 201–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91724-7.00011-3>.
- [137] K.M. Sharif, M.M. Rahman, J. Azmir, A. Mohamed, M.H.A. Jahurul, F. Sahena, I.S.M. Zaidul, Experimental design of supercritical fluid extraction – A review, *Journal of Food Engineering* 124 (2014) 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.003>.

- [138] S.N. Deming, S.L. Morgan, *Experimental design: a chemometric approach*, 2nd rev. and expanded ed, Elsevier, Amsterdam ; New York, 1993.
- [139] M. Otto, *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*, Third edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2017.
- [140] R.L. Plackett, J.P. Burman, THE DESIGN OF OPTIMUM MULTIFACTORIAL EXPERIMENTS, *Biometrika* 33 (1946) 305–325.
<https://doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>.
- [141] G.E.P. Box, K.B. Wilson, On the Experimental Attainment of Optimum Conditions, *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 13 (1951) 1–38.
<https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x>.
- [142] S. Latha, G. Sivaranjani, D. Dhanasekaran, Response surface methodology: A non-conventional statistical tool to maximize the throughput of *Streptomyces* species biomass and their bioactive metabolites, *Critical Reviews in Microbiology* 43 (2017) 567–582. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1271308>.
- [143] B. Singh, R. Kumar, N. Ahuja, Optimizing drug delivery systems using systematic “design of experiments.” Part I: fundamental aspects, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 22 (2005) 27–105. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v22.i1.20>.
- [144] D.E. Aziz, A.A. Abdelbary, A.I. Ellassasy, Implementing Central Composite Design for Developing Transdermal Diacerein-Loaded Niosomes: Ex vivo Permeation and In vivo Deposition, *CDD* 15 (2018) 1330–1342.
<https://doi.org/10.2174/1567201815666180619105419>.
- [145] M. Yolmeh, S.M. Jafari, Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes, *Food Bioprocess Technol* 10 (2017) 413–433.
<https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2>.
- [146] D.W. Lee, N. Marasini, B.K. Poudel, J.H. Kim, H.J. Cho, B.K. Moon, H.-G. Choi, C.S. Yong, J.O. Kim, Application of Box–Behnken design in the preparation and optimization of fenofibrate-loaded self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS), *Journal of Microencapsulation* 31 (2014) 31–40.
<https://doi.org/10.3109/02652048.2013.805837>.
- [147] A. Witek-Krowiak, K. Chojnacka, D. Podstawczyk, A. Dawiec, K. Pokomeda, Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process, *Bioresource Technology* 160 (2014) 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.021>.
- [148] B.W. Chong, R. Othman, R. Putra Jaya, M.R. Mohd Hasan, A.V. Sandu, M. Nabiałek, B. Jeż, P. Pietrusiewicz, D. Kwiatkowski, P. Postawa, M.M.A.B. Abdullah, Design of Experiment on Concrete Mechanical Properties Prediction: A Critical Review, *Materials* 14 (2021) 1866. <https://doi.org/10.3390/ma14081866>.
- [149] Ann Timberlake, Determination of equilibrium moisture in pulp, paper and paperboard for chemical analysis (Revision of T 550 om-08), (n.d.).
- [150] S. Van Wychen, L.M. Laurens, Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Lab.(NREL), Golden, CO (United States), 2016.
- [151] D. Ouair, A. Megherbi Benali, F. Toumi Benali, M.-F. Thévenon, K. Candelier, L. Pignolet, J. Gérard, Durabilité naturelle et composition en extractibles du bois de *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* du Nord-Ouest de l’Algérie, *Bois for. Trop.* 350 (2022) 57–69. <https://doi.org/10.19182/bft2021.350.a36837>.
- [152] L. Maxime, F.D. Valérie, CARACTERISATION CHIMIQUE, PHYSIQUE ET MECANIQUE DE PIEUX ANCIENS, (n.d.).
- [153] D. Bourdon, H. Gielfrich, Observations sur la méthode de Gabriel Bertrand pour le dosage des sucres réducteurs, *Sciences Agronomiques Rennes* (1972) np.

- [154] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 1999: pp. 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- [155] X. Gao, M. Ohlander, N. Jeppsson, L. Björk, V. Trajkovski, Changes in Antioxidant Effects and Their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during Maturation, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1485–1490. <https://doi.org/10.1021/jf991072g>.
- [156] P.L. Kirk, Kjeldahl Method for Total Nitrogen, *Anal. Chem.* 22 (1950) 354–358. <https://doi.org/10.1021/ac60038a038>.
- [157] A.K. Saleh, N.A. Soliman, A.A. Farrag, M.M. Ibrahim, N.A. El-Shinnawy, Y.R. Abdel-Fattah, Statistical optimization and characterization of a biocellulose produced by local Egyptian isolate *Komagataeibacter hansenii* AS.5, *International Journal of Biological Macromolecules* 144 (2020) 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.103>.
- [158] S. Nam, A.D. French, B.D. Condon, M. Concha, Segal crystallinity index revisited by the simulation of X-ray diffraction patterns of cotton cellulose I β and cellulose II, *Carbohydrate Polymers* 135 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.035>.
- [159] J. Méndez-Liter, L.I. De Eugenio, N.L.S. Hakalin, A. Prieto, M.J. Martinez, Production of a β -Glucosidase-Rich Cocktail From *Talaromyces Amestolkiae* Using Raw Glycerol: Its Role for Lignocellulose Wastes Valorization, *LIFE SCIENCES*, 2021. <https://doi.org/10.20944/preprints202104.0418.v1>.
- [160] H. Nouri, M. Ahi, M. Azin, S.L. Mousavi Gargari, Detoxification vs. adaptation to inhibitory substances in the production of bioethanol from sugarcane bagasse hydrolysate: A case study, *Biomass and Bioenergy* 139 (2020) 105629. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105629>.
- [161] F. Ahmed, Z. Yan, J. Bao, Dry biotreatment of acid pretreated wheat straw for cellulosic ethanol fermentation, *Bioresour. Bioprocess.* 6 (2019) 24. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0260-x>.
- [162] J.O.B. Carioca, *Biofuels From Hopes To Reality*, IntechOpen, s.l., 2011.
- [163] K. Kapoor, A.K. Tyagi, R.K. Diwan, Effect of gamma irradiation on recovery of total reducing sugars from delignified sugarcane bagasse, *Radiation Physics and Chemistry* 170 (2020) 108643. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.108643>.
- [164] G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *ANALYTICAL CHEMISTRY* (n.d.).
- [165] A. Caputi, M. Ueda, T. Brown, Spectrophotometric Determination of Ethanol in Wine, *Am J Enol Vitic.* 19 (1968) 160–165. <https://doi.org/10.5344/ajev.1968.19.3.160>.
- [166] G.J. Pilone, Determination of Ethanol in Wine by Titrimetric and Spectrophotometric Dichromate Methods: Collaborative Study, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 68 (1985) 188–190. <https://doi.org/10.1093/jaoac/68.2.188>.
- [167] A. Rastogi, R. Banerjee, Production and characterization of cellulose from *Leifsonia* sp., *Process Biochemistry* 85 (2019) 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.008>.
- [168] M. El Achaby, N. El Miri, H. Hannache, S. Gmouh, H. Ben youcef, A. Aboulkas, Production of cellulose nanocrystals from vine shoots and their use for the development of nanocomposite materials, *International Journal of Biological Macromolecules* 117 (2018) 592–600. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.201>.
- [169] A.-R. Xu, L. Chen, X. Guo, Z. Xiao, R. Liu, Biodegradable lignocellulosic porous materials: Fabrication, characterization and its application in water processing,

- International Journal of Biological Macromolecules 115 (2018) 846–852.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.133>.
- [170] F. Jiang, Y.-L. Hsieh, Cellulose nanocrystal isolation from tomato peels and assembled nanofibers, *Carbohydrate Polymers* 122 (2015) 60–68.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.064>.
- [171] Z. Belouadah, L. Toubal, N. Belhaneche-Bensemra, A. Ati, Characterization of ligno-cellulosic fiber extracted from *Atriplex halimus* L. plant, *International Journal of Biological Macromolecules* 168 (2021) 806–815.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.142>.
- [172] A.A.M. Moshi, D. Ravindran, S.R.S. Bharathi, S. Indran, S.S. Saravanakumar, Y. Liu, Characterization of a new cellulosic natural fiber extracted from the root of *Ficus religiosa* tree, *International Journal of Biological Macromolecules* 142 (2020) 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.094>.
- [173] R. Vijay, D. Lenin Singaravelu, A. Vinod, M.R. Sanjay, S. Siengchin, M. Jawaid, A. Khan, J. Parameswaranpillai, Characterization of raw and alkali treated new natural cellulosic fibers from *Tridax procumbens*, *International Journal of Biological Macromolecules* 125 (2019) 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.056>.
- [174] L. Segal, J.J. Creely, A.E. Martin, C.M. Conrad, An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer, *Textile Research Journal* 29 (1959) 786–794.
<https://doi.org/10.1177/004051755902901003>.
- [175] S.C. K, M. S, J.S.N. Raju, J.S. Md, Characterization of novel natural cellulosic fiber extracted from the stem of *Cissus vitifolia* plant, *International Journal of Biological Macromolecules* 161 (2020) 1358–1370.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.230>.
- [176] T. Ganapathy, R. Sathiskumar, P. Senthamaraiannan, S.S. Saravanakumar, A. Khan, Characterization of raw and alkali treated new natural cellulosic fibres extracted from the aerial roots of banyan tree, *International Journal of Biological Macromolecules* 138 (2019) 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.136>.
- [177] A.S. Babu, S.A.O. Adeyeye, Extraction of sugar from sugar beets and cane sugar, in: *Extraction Processes in the Food Industry*, Elsevier, 2024: pp. 177–196.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819516-1.00007-7>.
- [178] P.C. Giordano, A.J. Beccaria, H.C. Goicoechea, Significant factors selection in the chemical and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues by a genetic algorithm analysis and comparison with the standard Plackett–Burman methodology, *Bioresource Technology* 102 (2011) 10602–10610.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.015>.
- [179] A.Z. Izzi, W.M.F. Wan Ishak, N.N.A.N. Yusuf, Raslan.A. Alenezi, N.A. Alias, Thermophilic biohydrogen production from optimized enzymatic pretreatment of palm oil mill effluent via box-behnken design, *Journal of Engineering Research* 11 (2023) 100054. <https://doi.org/10.1016/j.jer.2023.100054>.
- [180] O.A. Olalere, C.-Y. Gan, Process optimisation of defatted wheat germ protein extraction in a novel alkaline-based deep eutectic solvent (DES) via Box–Behnken experimental design (BBD), *Food Chemistry* 409 (2023) 135224.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135224>.
- [181] S.U.K. Reddy Sagili, P.W. Addo, F.-A. Gladu-Gallant, S.E. Bilodeau, S. MacPherson, M. Paris, M. Lefsrud, V. Orsat, Optimization of wiped-film short path molecular distillation for recovery of cannabinoids from cannabis oil using response surface methodology, *Industrial Crops and Products* 195 (2023) 116442.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116442>.

- [182] A. Mostafa, M. Mourad, A. Mustafa, I. Youssef, Influence of aluminum oxide nanoparticles addition with diesel fuel on emissions and performance of engine generator set using response surface methodology, *Energy Conversion and Management: X* 19 (2023) 100389. <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2023.100389>.
- [183] M.M. Moreira, M.F. Barroso, J.V. Porto, M.J. Ramalhosa, J. Švarc-Gajić, L. Estevinho, S. Morais, C. Delerue-Matos, Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds, *Science of The Total Environment* 634 (2018) 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.035>.
- [184] J. Grahovac, J. Dodić, A. Jokić, S. Dodić, S. Popov, Optimization of ethanol production from thick juice: A response surface methodology approach, *Fuel* 93 (2012) 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.10.019>.
- [185] J. Grahovac, A. Jokić, J. Dodić, D. Vučurović, S. Dodić, Modelling and prediction of bioethanol production from intermediates and byproduct of sugar beet processing using neural networks, *Renewable Energy* 85 (2016) 953–958. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.054>.
- [186] M. Ergun, Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresource Technology* 73 (2000) 251–255. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00140-6).

Annexes

Annexes

- **Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour dosage des Polyphénols totaux d'hydrolysat**

Calcul de densité

Une prise d'essai de la fiole jaugé à vide (F_{vide}), en premier lieu on mesure dans la fiole jaugée rempli d'eau (F_{eau}) ensuite avec l'échantillon ($F_{\text{échantillon}}$).

Le calcul se fait comme suit : $(F_{\text{échantillon}} - F_{\text{vide}}) / (F_{\text{eau}} - F_{\text{vide}})$.

Préparation d'une solution (Méthanol / eau déminéralisée) avec un ratio (6 / 4) (V/V).

Préparation d'une solution aqueuse de carbonate de sodium avec une concentration de 7.5 %.

Dilution du réactif de Folin-Ciocalteu dix fois (1/10).

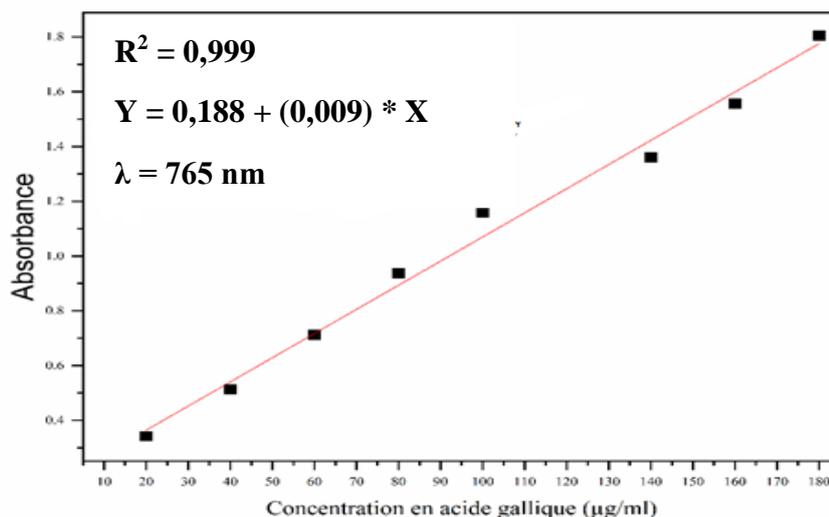


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

- **Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes d'hydrolysats**

Calcul de densité

Le calcul de densité a été fait dans le but de convertir la quantité d'extrait à un volume d'hydrolysats.

Une prise d'essai de la fiole jaugé à vide (F_{vide}), en premier lieu on mesure dans la fiole jaugée rempli d'eau (F_{eau}) ensuite avec l'échantillon ($F_{\text{échantillon}}$).

Le calcul se fait comme suit : $(F_{\text{échantillon}} - F_{\text{vide}}) / (F_{\text{eau}} - F_{\text{vide}})$.

1,5 mL de chaque extrait à analyser est ajouté à 1,5 mL d' AlCl_3 à 2 % (solution éthanoïque). Après 10 min d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 430 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible (Thermo Scientific evolution 201).

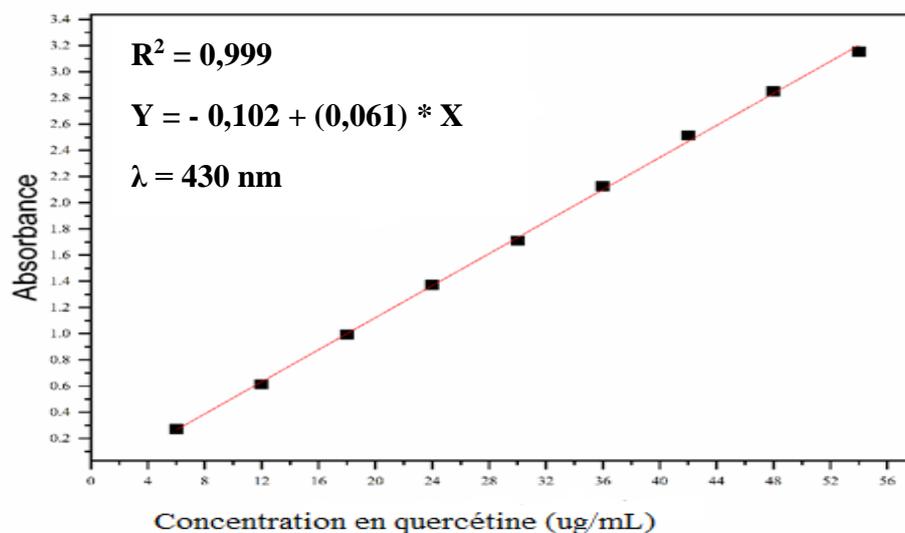


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

- **Courbe d'étalonnage du glucose pour le dosage des sucres réducteurs d'hydrolysat**

Préparation de la courbe

Une solution mère standard de glucose de 1 mg/mL a été préparée. Les solutions étalon de glucose ayant des concentrations de 100 à 1000 $\mu\text{g/mL}$ ont été préparées. Environ 1 mL de chacun de solution étalon (solutions filles) du glucose a été prélevés dans des tubes à essai, 1,5 mL de réactif DNS ont été ajoutés dans chaque tube contenant les solutions d'étalons. Des tubes à blanc ont également été préparés en mélangeant 7,5 mL d'eau distillée. Tous standards (les échantillons et le blanc) ont été placés dans un bain d'eau bouillante pendant 5 minutes, ensuite l'absorbance a été enregistrée à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Thermo Scientific evolution 201). La concentration du sucre présent dans l'échantillon a été estimée en se référant à la courbe d'étalonnage du glucose (voir figure 3).

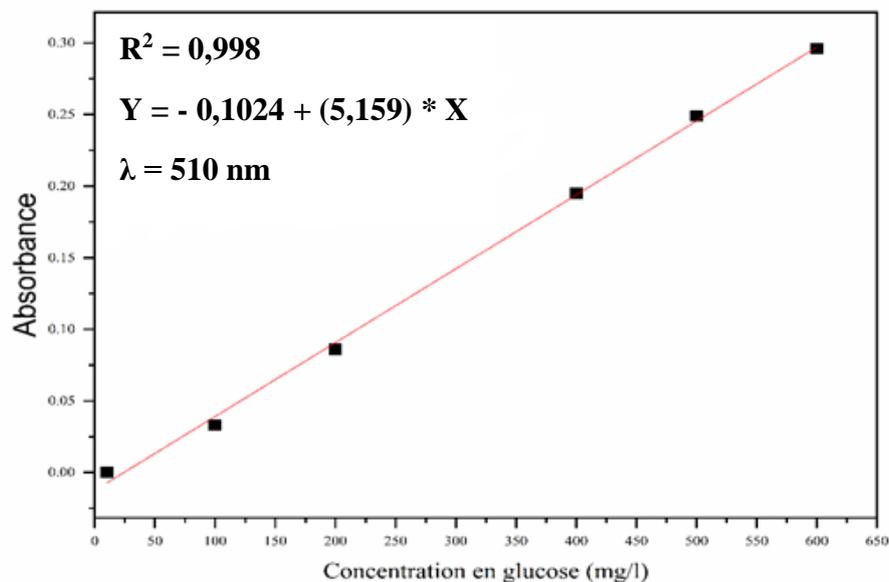


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de glucose pour dosage des sucres réducteurs

- Courbe d'étalonnage du glucose pour dosage des sucres totaux

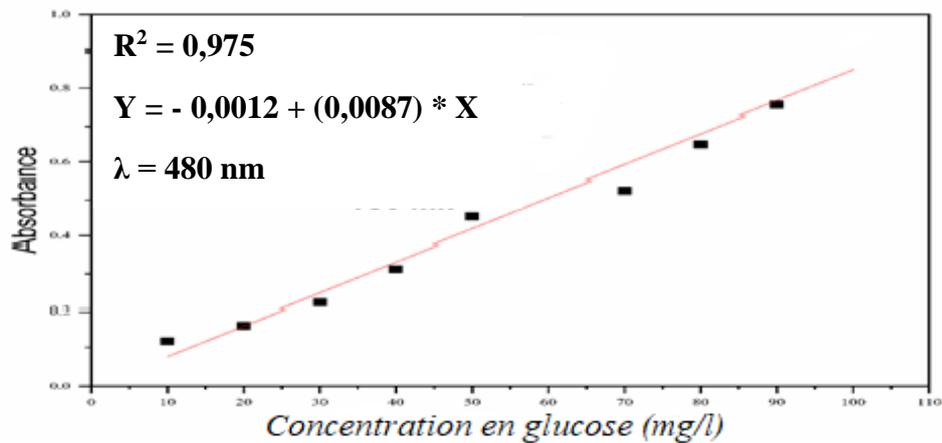


Figure 4 : Courbe d'étalonnage du glucose pour de dosage des sucres totaux

- Courbe d'étalonnage d'éthanol pour dosage du bioéthanol

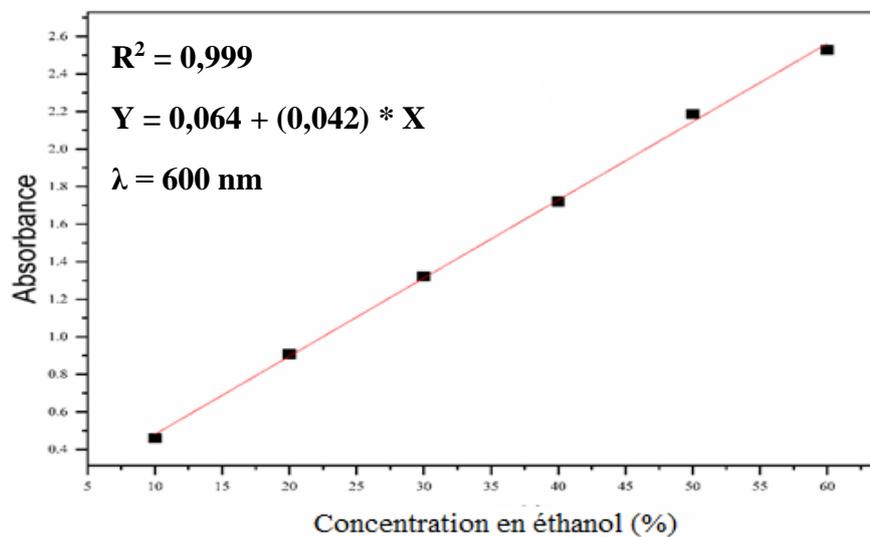


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'éthanol pour de dosage en bioéthanol



Figure 6 : Montage Soxhlet représentatif d'extraction des matières grasses et des extractibles
(Hexane / éthanol)



Figure 7 : Détoxification d'hydrolysats extraits à l'aide d'une hydrolyse chimique à partir de la biomasse lignocellulosique de sarment de la vigne



Figure 8 : Analyse qualitative de la présence du bioéthanol par dichromate de potassium



Figure 9 : Photos des appareils utilisés dans cette présente étude au cours de l'étape de prétraitement de la biomasse

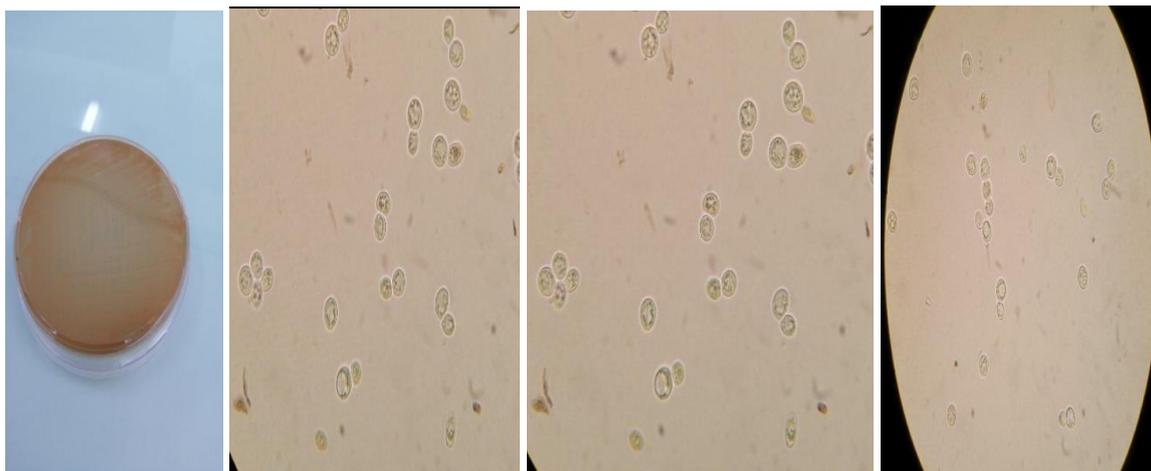


Figure 10 : Photos de la partie microbiologique des souches de la levure *saccharomyces cerevisiae*

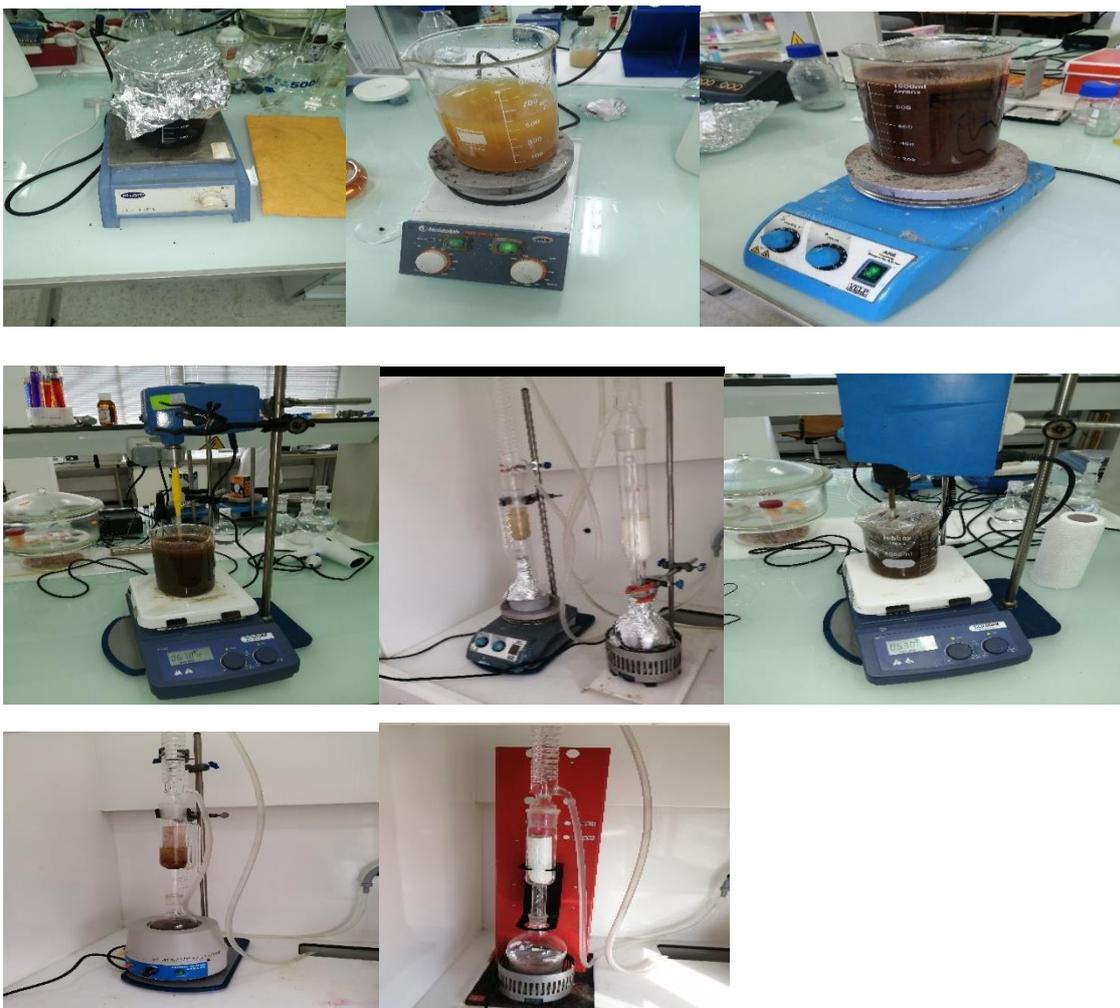


Figure 11 : Photos des appareils utilisés dans cette présente étude au cours de caractérisation de la biomasse lignocellulosique



Characterization of cardinal vine shoot waste as new resource of lignocellulosic biomass and valorization into value-added chemical using Plackett–Burman and Box Behnken

Didaoui Amine¹ · Amrane Abdeltif² · Aksil Tounsia³ · Boubieb Naima¹

Received: 11 March 2021 / Revised: 21 June 2021 / Accepted: 28 June 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

The objective of this work was to valorize a waste from cardinal vine shoot into a hydrolysate rich in reducing sugars. Plackett–Burman design was considered to identify the significant factors, while a Box Behnken design was considered to optimize the extraction in the following experimental conditions: 100 °C, 750 rpm, trifluoroacetic acid (CF₃O₂H) concentration (TFA) in the range (1–10%), for 20 to 180 min and considering the following solid–liquid (S/V) ratios (1:1, 3:1, 5:1). The optimal result was 2.53% in sugars equivalent to a yield of 50.64% per gram of dry matter. Shoot vine waste was characterized by attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), X-ray diffraction (XRD), simultaneous thermal analysis (STA), and X-ray fluorescence (XRF). The chemical composition was 43.38% cellulose, 23.58% hemicellulose, 21.22% lignin, 2.53% ash, 5.82% crude protein, 11.7% moisture, and extractives (0.81% fat, 0.56% total sugars, 2.3% extractive (hexane-ethanol)). The promising potential of shoot vine waste to produce sugar and other added-value compounds was demonstrated.

Keywords Hydrolysis · Extraction · Reducing sugar · Design of experiments · Renewable energy

1 Introduction

Humans' progressive fuel consumption has driven people to find new energy resources either in the transport or in other energy fields [1]. Fossil fuels are in finite amount and has caused severe environmental pollution [2, 3]. Renewable energy has therefore become more significant to achieve environment-healthy human and socio-economic prosperity [4]. In this regard, research presents challenges in the development of green chemistry with the use of an important natural source of organic matter and accessible raw materials

to avoid ecosystem disruption [5, 6]. This requires the inclusion of various products with high added value, such as the energy source, solid fuel for combustion and biofuels, and biomaterials like bioplastic, road binder, and dye dispersant in addition to other common chemicals like propanol, acetone, succinic acid, lactic acid, pesticides, and others [7–9]. One of the renewable and sustainable resources is the lignocellulosic biomass [10]. Lignocellulosic waste materials are a promising source for various products; this is chosen in terms of overall cost, energy efficiency, and environmental impact [11, 12]. Lignocellulosic biomass materials contain various polymers, such as polysaccharides (cellulose, hemicellulose), lignin, and polar and non-polar substances which are interwoven together [13, 14]. The morphological structure of lignocellulosic biomass presents a complex structure, where the holocellulose and hemicellulose are closely linked to lignin that hinders the depolymerisation of polysaccharides into monosaccharides [15]. Nowadays, agricultural wastes are excellent lignocellulosic feedstocks [16, 17]; biomass waste is considered interesting, since it is available in large amounts [18, 19]. The grape is one of the major fruits to be cultivated by man and vine is an important plant crops in the world. Vine shoots represent the main waste fraction

✉ Didaoui Amine
a.didaoui@univ-boumerdes.dz

¹ Laboratory of Fibrous Polymers Treatment and Forming, Faculty of Technology, Department of Process Engineering, University M'hamed Bougara of Boumerdes, Avenue de l'indépendance-3500, Boumerdes, Algeria

² Univ Rennes, Ecole Nationale Supérieur de Chimie de Rennes, CNRS, ISCR - UMR, 6226 F-35000 Rennes, France

³ Laboratory of Soft Technologies and Biodiversity, Faculty of Science, Department of Chemistry, University M'hamed Bougara of Boumerdes, Boumerdes, Algeria

of the foot, representing roughly half of the vine mass and have been studied because they contain numerous polysaccharides including cellulose. The design of experiment for the variable optimization has a number of advantages: (i) it reduces the number of experiments, which results in the use of less material and reagent; (ii) it provides information on the interactions among the variables [20]. The Plackett–Burman design is an essential tool in screening the effects of process variables. Furthermore, it is frequently used to enhance the product yield and reduce the process variability and number of experiments, process time, and overall cost [21–23]. The response surface methodology (RSM) with Box Behnken design is a widely used mathematical optimization tool due to simultaneous analysis of interactions of several parameters with the minimum of experimental trials. The Box Behnken design is a spherical-type design which consists of a central point and middle points of the edges of the cube circumscribed on the sphere [24, 25]. Grape production has increased extensively in recent decades. In Algeria, the region of Boumerdès is known for its wine culture and its table grapes, which represent 49% of its national production. The area devoted to vine plantations is about 13,872 ha, divided into 10 varieties: Muscat, Italia, Chasselas, Victoria, Sultanine, wholesale Black, Red glob, Dattier, Sabelle, and Cardinal. In general, the density of plantation is about 10,000 foot per hectare producing 7 kg of vine waste biomass per foot, accounting for 971,040 t of biomass waste for the total area. To ensure the good harvest and fruiting, in winter, the viticulturists focus on the most important step which is the limitation of the excessive growth of vines. This generates waste rich in cellulose, namely a rich promoter for the extraction of sugars.

Accordingly, the purpose of the present work is to valorise the abundant lignocellulosic biomass from the waste of cardinal shoot vine and to further examine the chemical composition of the feedstock, including its physical and chemical characterizations. Otherwise, based on statistical techniques, the effect of different extraction parameters on the efficiency and recovery of hydrolysate rich in reducing sugar without any chemical or biological pretreatment of the vine shoot waste was investigated. The extraction optimization was done in a two-step level. The Plackett–Burman design was used to screen the significant components, and then the RSM based on the Box Behnken design was considered. The objective was to optimize the parameters of the screened factors, such as the extraction time, the concentration of trifluoroacetic acid (TFA), and the solid–liquid ratio to maximize the sugar extraction yield, as well as to reveal any possible interaction effect between the independent variables in a timely manner.

To the best of our knowledge, and according to the recent literature on lignocellulosic biomass from vine shoot waste, it has been used as natural resources of bioactive compounds

such as production of lactic acid and lignin [26], resources of phenolic and antioxidant [27, 28], cellulose nanocrystals [29], oligosaccharides [30], bio-butanol [31], bioethanol [32, 33], and bio-composite films [34].

2 Materials and methods

2.1 Raw materials

The vine shoot waste used in this work comes from cardinal grape variety. The samples were collected in the area of Bordj Menaïel (70 km East of Algiers) and thoroughly washed with distilled water, and dried for 20 days at room temperature in a ventilated dark room to protect the compounds from light oxidation. They were treated at 60 °C for 24 h, followed by mechanical treatment by a centrifugal miller (ground with an electrical grinder model MX-E1900-power 900 W Condor, Algeria), milled to a particle size of less than 1 mm, and thereafter sieved to have a single and homogenized batch using a handle stainless steel mesh sieve with an aperture of 1 mm. The size of the biomass after sieving was measured by using a laser granulometry particle size analyzer (Mastersizer 2000, Malvern Instruments). The feedstock was stored in airtight bags in a dark and dry place to be protected of moistures and light, until its further use. In the screening step, the feedstock was separated in two fractions. It was passed through two standard 125- μm and 500- μm sieves and stored in the same conditions. All chemicals used were purchased from Sigma-Aldrich (Algeria), and all solvents used were of analytical grade.

2.2 Physical and chemical characterization of lignocellulosic biomass

2.2.1 Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy

The ATR-FTIR analysis was performed on a ThermoScientific Nicolet IS 10 Model spectrophotometer (Thermo Electron Scientific Instruments IIC, Fitchburg, WI 53,711, USA), equipped with ATR ThermoScientific Smart iTR module. The feedstock was milled to a particle size of less than 1 mm. It was milled and sieved with a handle stainless steel mesh with an aperture of 250 μm and oven-dried at 30 °C overnight to avoid the moisture absorption during milling and sieving; it was placed directly on the ATR crystal. The sample was characterized via ATR-FTIR spectroscopy in ATR mode with C/ZnSe crystal. The equipment worked in absorbance and transmission mode with a resolution of 2 cm^{-1} , and a total of 40 scans were accumulated. The spectrum was obtained in the range 4000–600 cm^{-1} .

2.2.2 Biomass composition analysis

In a previous study, the chemical composition of the lignocellulosic material from vine shoot waste was determined using the method prescribed in the Technical Association of Pulp and Paper Industry Standard Method (TAPPI) and the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Method. The weight fractions of the lignocellulose components were determined in triplicates.

Moisture and ash contents were estimated using standard protocol. Samples were heated (oven-dried, 105 °C, 24 h), (muffle furnace, 550 °C, 5 h), respectively (Tappi Standard T-211.om-02.2002 [35] and T-421.om-02.2002) [36].

Fat and extractive contents were extracted in a Soxhlet extractor (diethyl ether (CH₃-O-CH₃, anhydrous, ACS Reagent, ≥ 99.9%, Sigma-Aldrich), 80 °C, 50 min), (hexane C₆H₁₄ (N-Hexane, 99%, AR, BIOCHEM Chemopharma); ethanol (CH₃CH₂OH, Ethyl alcohol, pure, Sigma-Aldrich) ratio of 2:1 (V/V)), respectively (Tappi Standard T-204.cm.97) [37].

The lignin content was determined by extracting in H₂SO₄ (ACS, Reagent, 95–98%, Sigma-Aldrich) (72% (V/V)), at room temperature and constant stirring for 2 h, then diluted to 3% concentration (V/V) with distilled water [38].

Holocellulose content The biomass was milled into powder, sieved, and oven-dried at 60 °C for 2 h. One gram of ground biomass was treated with 0.4 g of sodium chlorite (NaClO₂, puriss. p.a. 80% (RT), Sigma-Aldrich), 0.2 mL of CH₃COOH (glacial, ACS reagent, ≥ 99.7%, Sigma-Aldrich) and 32 mL of distilled water, boiled in a water bath at 75 °C for 1 h. Every hour, 0.4 g of NaClO₂ and 0.2 mL of acetic acid were added until a whitish appearance was observed. The suspension was then cooled at room temperature, filtered under a vacuum pump with filter crucible n°4 and washed with hot water repeatedly; finally, it was dried in an oven at 105 °C until a constant weight was achieved. It was estimated by the measure of the mass loss [39].

Content of α-cellulose Two 2 g of holocellulose was treated with 10 mL of NaOH (ACS Reagent, ≥ 97%, pellets, Sigma-Aldrich) at a concentration of 17.5%. Then, it was mixed with class rod for 5 min. Five milliliters of NaOH of the same concentration was added and mixed until total dissolution. The beaker was covered with parafilm to prevent evaporation and kept for 30 min at room temperature. Thirty-three milliliters of distilled water was mixed and kept for 1 h and filtered by using a vacuum pump with a filter crucible (n°3). The residue was washed with 100 mL of NaOH solution (8.3%) and rinsed with distilled water. Fifteen milliliters of acetic acid (10%) was added and rinsed until it reached neutral pH (~ 7). It was then rinsed with 250 mL of distilled

water and oven-dried at 40 °C until a constant weight was reached. It was estimated by the measure of the mass loss [40].

The hemicellulose content was calculated by the difference: content of holocellulose – content of α-cellulose [40].

The crude protein content of vine shoot waste was calculated based on the N amount, determined by the Kjeldahl method with appropriated factor 6.25 [41].

2.2.3 X-ray diffraction

The XRD analysis was performed to distinguish the phases and to gain an overview of the morphology of the biomass and regularization of shear bands that form the structure of the polysaccharides [22]. The XRD pattern of shoot vines wastes was carried out at the CuKα radiation (λ = 1.54056 Å). The test was run in an X-ray diffractometer (D8 Advance Bruker, Germany), operating in transmission mode, and working at a voltage of 40 kV and 35 mA of filament emission. Furthermore, diffraction intensities of 2θ peaks were measured in the range (05–40°) with step sizes of 0.04° and scanning rate of 01°/min.

The crystallinity index (CrI) was calculated from the height ratio between the height of the maximum interference (I₀₀₂) and the intensity at 22.2°, referred as I_{am} [42] (Eq. 1).

$$CrI = (I_{002} - I_{am}) / I_{002} \times 100 \quad (1)$$

2.2.4 Simultaneous thermal analysis

The thermal stability of the biomass was studied by STA analysis and combined TG-DSC techniques (thermogravimetry and differential scanning calorimetry) using a NETZSCH-Gerätebau GmbH analyzer (model STA 409 PC LUXX, Wittelsbacherstraße 42, D-95100 Selb-Bavaria, Germany). The aim of this analysis is to determine the thermal stability of the sample and to characterize and observe the transition phase and the interaction of the biomass as a function of temperature. The biomass was weighed in an AL₂O₃ crucible. A sample of 6.754 mg was heated at 10 °C min⁻¹ under Ar flow at a flux of 10 mL/min as a carrier gas. Analysis was performed from 25 to 550 °C.

2.2.5 X-ray fluorescence spectroscopy analysis

In the present study, the XRF analysis was carried out by using an XRF-1800 spectroscopy (Shimadzu, Japan) with a vacuum medium to determine the mineralogical composition of the biomass. The latter was ground and sieved by a sieve of 0.050-mm porosity, shaped by the cold pressing process using a uniaxial press to obtain dense pellets.

Table 1 The variables and levels in statistical design for screening affecting sugar extraction yield

Variable code	Variables Name	Low level (−1)	High level (+1)
X ₁	Agitation speed	500 rpm	750 rpm
X ₂	Concentration of TFA acid	1%	10%
X ₃	Temperature	60 °C	100 °C
X ₄	Solid/liquid ratio	1 g/100 mL	5 g/100 mL
X ₅	Particle size of powders	125 μm	500 μm
X ₆	Extraction time	20 min	180 min

2.3 Design of experiments and statistical analysis

The optimization of the process was based on the use of Plackett–Burman and Box Behnken designs with a view of saving energy and having energy efficiency towards sustainable development with the aim of building a safe and healthy world based on the 12 principles of green chemistry.

2.3.1 Data analysis

The JMP software (version 13, SAS) was used to construct the Plackett–Burman and Box Behnken designs, as well as for regression analysis of the experimental data obtained.

2.3.2 Plackett–Burman design

The P-B design was used to identify significant factors among the six factors considered in this study that influence and edit in sugar extraction yield.

The design was based on the following first-order polynomial model (Eq. 2).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^F \beta_i X_i \quad (2)$$

where Y is the dependent variable (response), namely the sugar extraction yield. β_0 is the constant coefficient/the model intercept/the offset term. β_i is the linear effect. F is the number of the variable (input); in our case F=6. X_i is the independent variable (factors).

In the present study, six factors (independent variables) or input including agitation speed X₁, concentrations of TFA acid X₂, temperature X₃, solid/liquid ratio X₄, particle size of powders X₅, and extraction time X₆ were investigated to identify the significant factors for the sugar extraction yield. On the other hand, 12-run Plackett–Burman design has evaluated the six factors. Each factor was evaluated at

two levels −1 for the low level and +1 for the high level. The design is shown in Table 1, and the given sugar extraction yields were the average of three trials.

2.3.3 Box Behnken design

The number of experiments was calculated according to the following equation (Eq. 3).

$$N = K^2 + K + C_p \quad (3)$$

where K is the factor number, K=3 in this study; and C_p is the replicate number of the center points (C_p=3) in the present study.

The multi-regression analysis of the data to fit a second-order polynomial equation (quadratic model) was carried out according to the following equation (Eq. 4.), which predicts the optimum conditions of the sugar extraction.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^F \beta_i X_i + \sum_{i=j-1}^F \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^F \beta_{ii} X_i^2 \quad (4)$$

where Y is the dependent variable (response); namely the sugar extraction yield, β_0 is the constant coefficient, was the model intercept, and was the offset term. β_i is the linear effect; β_{ii} is the quadratic effect; and β_{ij} is the interaction effect.

F is the number of the variable (input); X_i and X_j are the independent variables.

In this study, a Box Behnken design with three factors and three levels was used to optimize the parameters of the screened factors, such as the TFA concentration, X₁, the (solid / liquid) ratio, X₂, the extraction time, X₃, and to maximize the sugar extraction yield, leading to 15 runs. Each factor was evaluated at three levels (−1) for the low level and (0) middle level or central level and (+1) for high level. The design is shown in Table 2, and the given sugar

Table 2 The variables and levels in statistical design for optimization affecting sugar extraction yield

Variable code	Variables name	Low level (−1)	Middle level (0)	High level (+1)
X ₁	Concentration of TFA acid	1%	5.5%	10%
X ₂	Ratio (solid/liquid)	1 g/100 mL	3 g/100 mL	5 g/100 mL
X ₃	Extraction time	20 min	100 min	180 min

extraction yields were the average of three trials. Experiments were carried out in a random order to avoid any bias to reduce the outcomes of unpredicted variability in the responses due to irrelevant factors.

2.4 Extraction and analysis of sugars

The sugar extraction was carried out in a 500-mL flat bottom Bicol containing a diluted acid solution TFA ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, BIOCHEM Chemopharma) with a biomass associated with a temperature controller RDT (resistance temperature detector) temperature sensor (Pt 100) at the desired set point subjected to a digital hot plate equipped with a digital stirrer under reflux using a water condenser (30 cm). The objective was the liquid steam equilibrium to prevent loss of mass by evaporation. This dilute acid solution ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) was used due to various reasons such as the sugars which generally remain stable during hydrolysis, efficiency, and easily removed from hydrolysates (volatile). After extraction, the hydrolysate was cooled with water and filtered under Büchner using a vacuum pump to remove impurities from the biomass. It was neutralized with NaOH (1 mol/L) until a pH of 5.10. Delignification and detoxification were performed with M3 g per liter of charcoal powder [16, 43], filtered under a vacuum with filter crucible N°3. The hydrolysate was vigorously centrifuged (3000 rpm, 10 min), filtered through a funnel, splashed with N_2 gas, sterilized in an autoclave at 121 °C for 20 min. and finally cooled to 4 °C. The sugars were evaluated by the dinitrosalicylic acid (DNS) method. One milliliter of hydrolysate was mixed with 1.5 mL of DNS reagent, boiled in a water bath at 100 °C for 5 min. The obtained sample was cooled with water, to which 7.5 mL of distilled water was added. The absorbance was measured at 530 nm [44].

3 Results and discussion

3.1 Particle size analysis using laser granulometry

Figure 1 shows the particle size of the all samples where the size of the flour of the vine shoot wood lies between 7 and 830 μm , indicating a very fine biomass. Such range of sizes should drastically reduce the crystallinity of cellulose, thus improving the depolymerization of the cellulose by acid hydrolysis leading to a hydrolysate rich in sugars. The curve A (Fig. 1) represents the particle size distribution of shoot vine waste as a function of its amount present in the lignocellulosic biomass after grinding. The large amount obtained by the grinder was between 120 and 830 μm , which represents a very fine biomass. Lignocellulosic biomass was sieved and separated in two samples and used in the screening and optimization processes. The red color in this figure

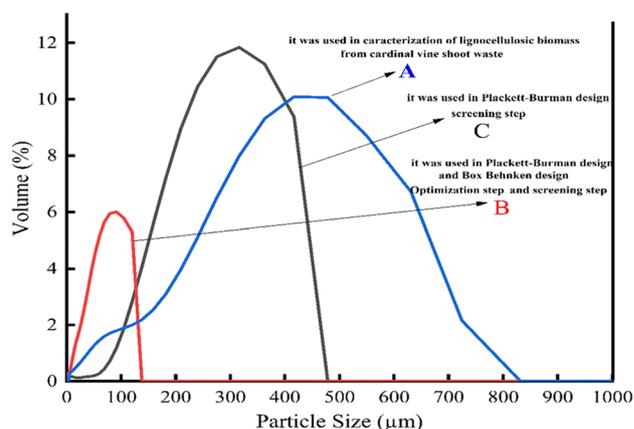


Fig. 1 Particle size distribution of the shoot vine waste of all samples

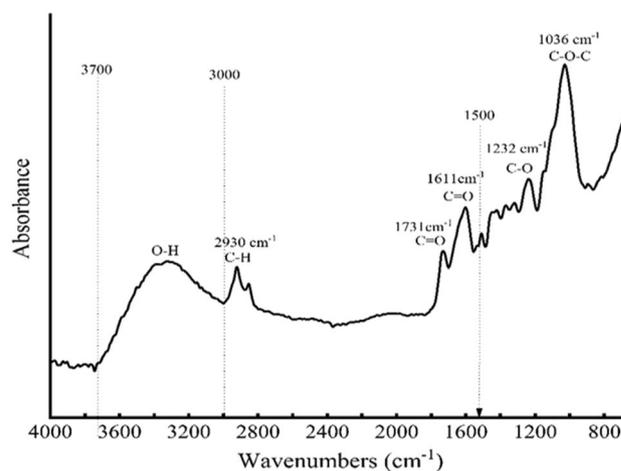


Fig. 2 ATR-FTIR spectra of shoot vine waste

shows the amount of lignocellulosic biomass with particle sizes less than 125 μm .

According to Fig. 1, the sample contains a large part of particles with size in the range (7–100 μm). The black line indicates the amount of lignocellulosic biomass with particle size less than 500 μm . A large amount of the particles have sizes between 80 and 500 μm . Moreover, the amount of lignocellulosic biomass which must undergo further grinding corresponds to the blue line.

3.1.1 ATR-FTIR analysis

The ATR-FTIR spectroscopy was used to determine the molecular structure present in the vine shoot's waste by identifying the functional groups; the corresponding spectra are illustrated in Fig. 2.

The wide band observed in the region (3700–3000 cm^{-1}) is commonly attributed to the O–H stretching vibrations;

furthermore, this band could also be associated to the structure of cellulose molecules as well as to aromatic and aliphatic hydroxyl groups. In addition, the O–H bending appears at the same band which characterizes the adsorbed water, accounting for the hydrophilic tendency of the fibers, while the peak position at 2930 cm^{-1} indicates the C–H stretching vibration [29, 45]. On the other hand, the broad band at 1036 cm^{-1} can be attributed to the cellulose, present in the spectrum with high intensity, associated with C–O–C asymmetric bridge stretching [26, 46]. The small band centered at 1232 cm^{-1} responds to the C–O stretching, and is characteristic of the hemicellulosic and lignin fractions. The small peak at 1500 cm^{-1} can be due to proteins [47], while that at 1731 cm^{-1} is related to the carbonyl ester group C=O bond stretching present in hemicellulose [48]; the peak at 1611 cm^{-1} attributed the stretching of C=O group of hemicellulose contents [49].

3.1.2 Biomass composition analysis

The biomass composition is given in Table 3. The sample was oven-dried at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, cooled in a desiccator so that the biomass does not absorb moisture. The moisture content is one of the preliminary signs of the rate of cellulose because of its adsorption factor. The extractable level represents the soluble materials in organic solvents. In our case, it is a mixture of ethanol/hexane, and hence, the extracted compounds are the following: flavonoids, terpenes, stilbenes, and tannins, which give the color and the smell of wood.

According to the chemical characterization of the biomass, the holocellulose content was 66.96% of the dry weight. It is the addition of the cellulose and hemicellulose fractions, showing the richness of the biomass in cellulose and hence in reducing sugars and an average level of lignin, which is in favor of a detoxification with the charcoal

powder. It can also be noted that there is richness of the biomass in protein, with a yield of 5.62%. The reducing sugars obtained from lignocellulosic biomass are usually used in the fermentation under aerobic conditions using micro-organisms for the biofuel production; these micro-organisms need a source of carbon (reducing sugar), nitrogen (protein), vitamins, and minerals for their growth. This composition of cardinal vine shoot waste can lead to produce the bioethanol as fuel for the transport sector.

The Klason lignin content was comparable to that of some agricultural residues, such as palm kernel shells 45%, palm mesocarp fiber 32%, Arecanut husk 31.6%, eucalyptus 27%, rice straw 26.30%, Douglas fir 25.3%, rice husk 23%, and bagasse 22.8% [15, 26, 50, 51].

The lignocellulosic biomass from cardinal vine shoot waste was compared with those reported in the literature; the sample is the vine shoot waste with grape variety Hondarridi Zuri supplied by the local winery Aldako Bodega, S.L. (Oiartzun, Bsqe Country, Spain) characterized by a particle size of $\sim 0.4\text{ cm}$, 27% hemicellulose, 26% of ash, and 3.1% of extractable. To our knowledge, the chemical composition of this biomass is different with our lignocellulosic biomass due to the nature of the soil, meteorological conditions, and also the nature of the variety [26].

3.1.3 X-ray diffraction analysis

The XRD analysis of the shoot vine waste is displayed in Fig. 3, and the pattern is based on the literature data and the use of International Centre for Diffraction Data ICDD.

As observed, the shoot vine waste has an amorphous portion at Bragg angle (2θ) between 5 and 14° due mainly to lignin and hemicellulose, as well as to other compounds, which give a disordered structure, rice to border, and less defined peak, respectively. Furthermore, shoot vine waste

Table 3 Biomass composition of shoot vines waste

	Biomass	Content (%)
	Moisture	11.7 ± 0.46
Holocellulose (%)	Alpha-cellulose	43.38 ± 0.60
$66.96\% \pm 0.75$	Hemicellulose	23.58 ± 0.67
	Fat	0.81 ± 0.14
Extractive (%)	Total sugar	0.56 ± 0.11
3.67%	Extractive (hexane-ethanol)	2.3 ± 0.46
XRF analysis	Calcium oxide	61.5
Minerals content or ash (%)	Potassium oxide	21.5
$2.5\% \pm 0.22$	Silica	7.43
	Phosphorus pentoxide	5.80
	Sulfur trioxide	3.42
Crude protein		$5.62\% \pm 0.19$
Klason lignin		$21.22\% \pm 0.71$

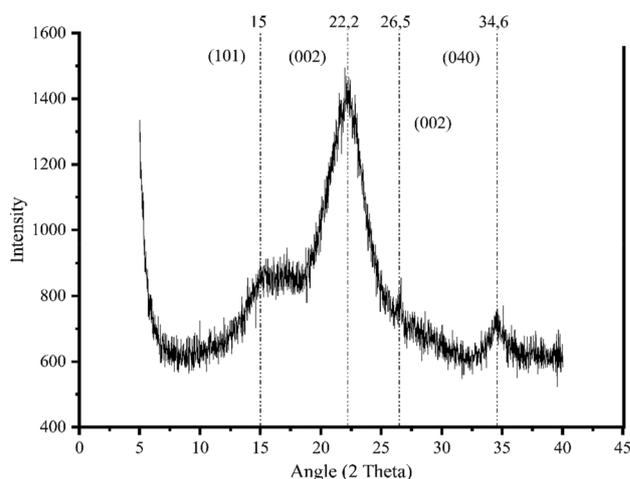


Fig. 3 X-ray diffraction patterns of shoot vines waste

has peaks related to the crystallographic plans of cellulose in accordance with the 2θ angle at 15° , 22.2° , 26.5° , and 34.6° , which can be ascribed to the crystallographic planes (101), (002), (002), and (040), respectively, due to the perfect regular arrangement of the molecules in an equatorial plane, giving its rigidity [52]. This gives information on the presence of alpha-cellulose, a regular periodic structure, which is responsible for the crystallinity of the biomass [53].

The CrI of the non-treated lignocellulosic biomass from cardinal vine shoot waste (33.59%) with a particle size less than 1 mm was compared with another sample of vine shoot waste (CrI in the raw state without pretreatment was 65.29%, with hydrothermally pretreated was 43.60%, particle size was 0.4 cm). The same sample was compared with the chemical composition section, and it can be concluded that the lignocellulosic biomass from cardinal vine shoot waste is better than Hondarridi Zuri shoot vine waste supplied by a local winery Aldako Bodega. S.L. (Oiartzun, Basque Country, Spain) in terms of crystallinity index [26].

3.1.4 Simultaneous thermal analysis

In the present study, simultaneous thermal analysis was used to examine the thermal decomposition of shoot vines waste in the range (25–550 °C). Analysis of the TG/DSC spectra shows four stages (Fig. 4).

The first one is at 100 °C: a small and endothermic band corresponding to weight loss accounting for 5% is observed at 53 °C ascribed to the loss of absorbed water by the cellulosic fibers and represents the evaporation of the moisture adsorbed into the sample [54]. In the second stage, the

thermal degradation begins at ~ 240 °C and represents the degradation of extractible, lipid, protein, and other components. In addition, the first exothermic peak and the maximum rates of weight loss are observed from 250 to 380 °C corresponding to the decomposition of polymers (cellulose, hemicellulose, and lignin) to generate volatile compounds [55]. This means that the glycosidic bond chains are broken down, leading to the dissolution of the amorphous phase. In the third stage, between 400 and 500 °C, a sharp exothermic peak occurs and a major peak is observed from 400 to 480 °C corresponding to the total decomposition of the cellulose and to the generation of volatile compounds, indicating the destruction and total carbonization of the sample. The remaining residues above 500 °C in the end product were mainly ash derived from the biomass.

3.1.5 X-ray fluorescence spectroscopy

According to the results of the fluorescence (Table 3), the lignocellulosic biomass has an overall mineral composition of 2.5%, which constitute the nutrients of cell growth, such as calcium in the form of CaO which represents a major component of the biomass, namely 61.5% of the minerals. It has an importance in the plant physiology and a role in the cohesion of cell walls. Phosphorus pentoxide (P_2O_5) is a phosphate fertilizer, crucial for the roots and shoot growth of the vine; potash fertilizer is added in the form of K_2O as a nutrient for the cell development. The presence of silica is a sign that the biomass was not well-irrigated; silica is adsorbed by the plant in the form of silicic acid.

Fig. 4 TG-DSC analysis of the shoot vine waste

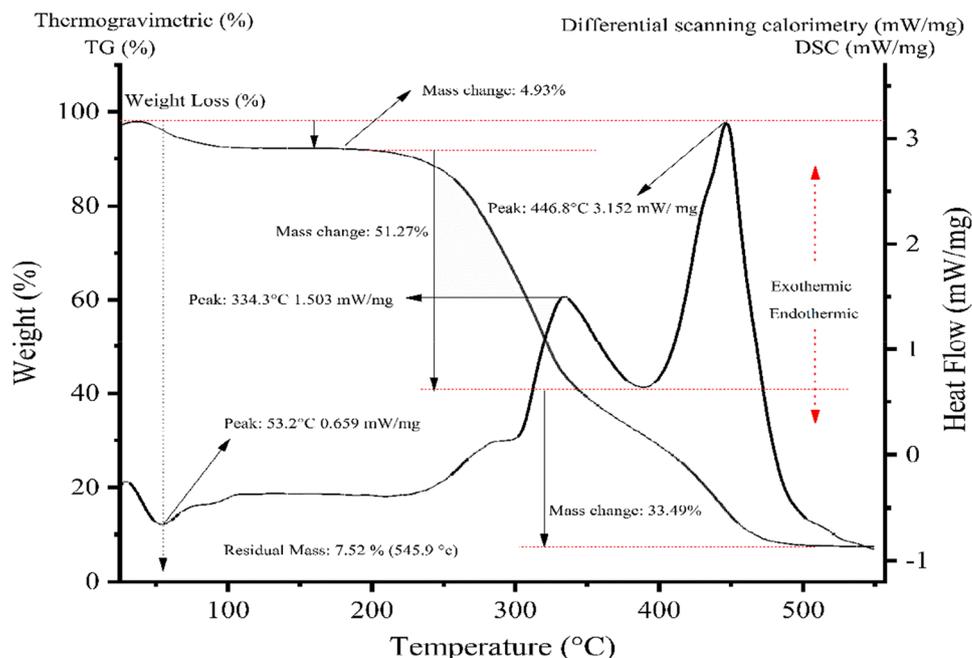


Table 4 The Plackett–Burman design of the shoot vine waste and experimental values of response variables

Run	Process parameters						Y
	Agitation speed (rpm)	Temperature (°C)	Time (min)	Concentration (%)	Size (µm)	Ratio (g/mL)	Sugar extraction (%)
1	750	100	180	1	125	1	0.1769
2	500	60	180	1	500	5	0.1938
3	500	100	20	1	500	1	0.0223
4	500	100	20	10	500	5	0.4896
5	500	60	180	1	125	5	0.1063
6	750	60	180	10	500	1	0.2192
7	750	60	20	1	500	1	0.0144
8	750	60	20	10	125	5	0.2037
9	750	100	20	1	125	5	0.3479
10	500	60	20	10	125	1	0.0108
11	500	100	180	10	125	1	0.2354
12	750	100	180	10	500	5	1.0033

3.2 Design of experiments

3.2.1 Screening of the significant factors using Plackett–Burman design

In this study, six variables were selected for the screening using the Plackett–Burman design. The experimental conditions to be verified were selected on the basis of the highest desirability. In total, 12 experimental runs for reducing sugar production with combination with the two levels of each variable were performed as shown in Table 4.

The impact of the six factors considered in this study on the reducing sugar yield from shoot vine waste was statistically analyzed. The aim of this screening is to evaluate the factors which have a significant effect on reducing sugar yield for further optimization study using Box Behnken design. Reducing sugar yields from the shoot vine waste range from 0.01 to 1 g/l; it is a wide variation in the sugar extraction (Table 4). The coefficient of determination R^2 of the Plackett–Burman model is 0.90, while the adjusted R^2 is 0.81. This shows that the predicted R^2 values are close to the adjusted R^2 , indicating the accuracy of the model. The

analysis of variance of Plackett–Burman model is given in Table 5.

The regression model (ANOVA) is highly significant to represent the dependence of the reducing sugar yield on the components studied. If the P-value is < 0.05 , the respective terms were said to be significant. On the other side, a P-value greater than 0.05 indicates an insignificant term. In our case, three factors were considered the most significant factors namely the liquid/solid ratio with P-value 0.01107 (very low), the temperature with P-value 0.01549, and the TFA concentration with P-value 0.02785, while the three others, namely the agitation speed (rpm), the extraction time, and the particle size, showed insignificant effects on the reducing sugar yield (Table 6).

The model of the first-order polynomial equation was applied to determine the relationship between the factors and the response as shown in the following equations (Table 7):

$$Y = (\text{sugar extraction yield}) = 0.4494 + 0.0756 X_1 + 0.1084 X_2 + 0.1273 X_3 + 0.3123 X_4 + 0.0479 X_5 + 0.0705 X_6.$$

Table 5 Regression analysis (ANOVA) of Plackett–Burman design experimental results on sugar extraction from shoot vine waste by acid extraction

Source	Sum of squares	DF	Mean squares	F-value	P-value	Significance
Model	0.7565	6	0.1261	8.4220	0.0168	Significant
X_1	0.0686	1	0.0686	4.5804	0.0853	Insignificant
X_2	0.1409	1	0.1409	9.4118	0.0279	Significant
X_3	0.1943	1	0.1943	12.9817	0.0155	Significant
X_4	0.2312	1	0.2312	15.4424	0.0111	Significant
X_5	0.0618	1	0.0618	4.1316	0.0978	Insignificant
X_6	0.0596	1	0.0596	3.9840	0.1025	Insignificant
Residual	0.0748	5	0.0150			
Cor total	0.8313	11				

Table 6 Estimated coefficient, calculated t-value, P-value, and std error of Plackett–Burman experimental design

Term	Coefficient	Std error	T ratio	Prob> t
Intercept	0.4494	0.0578	7.7814	0.0006
Agitation speed	0.0756	0.0353	2.1402	0.0853
TFA concentration	0.1084	0.0353	3.0679	0.0279
Temperature	0.1273	0.0353	3.6030	0.0155
Solid/liquid ratio	0.3123	0.0795	3.9297	0.0111
Particle size	0.0479	0.0235	2.0326	0.0978
Extraction time	0.0705	0.0353	1.9960	0.1025

The optimal reaction in the experimental screening was achieved when the solid/liquid ratio was set at 5, temperature at 100 °C, agitation speed at 750 rpm, TFA concentration 10%, granular size 500 um, and an extraction time of 180 min. (Table 4).

3.2.2 Optimization using Box Behnken design

The most puzzling part of this study is the optimization process for obtaining the maximum of reducing sugar. The Box Behnken design is used to optimize the number of experiments to be executed by determining the feasible interactions between the parameters studied and their effects on the reducing sugar yield from the shoot vine waste. In total, 15 experimental runs and three central points were designed and performed according to the conditions, which were applied in each run (Table 7). The optimization of the experimental conditions was determined by setting targets for targeting the desire for responses. These conditions were

based on the Plackett–Burman design, summarized as follows: agitation speed and particle size remained unchanged, namely 750 rpm and 125 μm respectively, according to the screening plan, which seem to be insignificant these (Table 5). Although the temperature is a significant factor, it was fixed at 100 °C, due to our equipment and was the maximum allowed on our assembly. Furthermore, exposure time was variable. The significant factors were optimized based on the objective of having the less corrosive environment and rich in reducing sugars. Experimental results and those of the optimization according to the Box Behnken design are illustrated in Table 7. The results of the Box Behnken design showed that the best amount of extraction was obtained in the experimental run No:8 giving 2.53 g/L of reducing sugar, while the lowest total sugar release (50 mg/L) was achieved in run No:11 (Table 7). In the optimization study, the yield of reducing sugar in vine shoot waste has increased by 150% compared to that of screening. The highest amounts of extraction were 2.53 g/L (Table 7) and 1.0 g/L (Table 4) in the optimization and screening, respectively. The second-order polynomial model was applied to determine the relationship between the yield of reducing sugar and the tested parameters (Table 8).

$$\begin{aligned}
 Y = & 0.7188 + 0.0775 X_1 + 0.4601 X_2 \\
 & + 0.3701 X_3 + 0.0526 X_1 X_2 \\
 & - 0.0709 X_1 X_3 + 0.4499 X_2 X_3 \\
 & - 0.4147 X_1^2 + 0.1467 X_2^2 + 0.1717 X_3^2
 \end{aligned}$$

where the coefficients for the linear, quadratic, and interaction effects of the variables are coded as X1, the

Table 7 Box Behnken design of the shoot vine waste and experimental values of response variables

Exp Order	Process parameters			Sugar extraction (Y)	
	Time (min)	Ratio (g/mL)	Concentration (%)	Experiment (%)	Predicted (%)
1	100	1	10	0.0993	-0.0244
2	100	3	5.5	0.7188	0.7188
3	100	5	1	0.6970	0.7208
4	180	1	5.5	0.5092	0.3122
5	180	3	10	0.7567	0.8575
6	180	3	1	0.7081	0.7942
7	100	3	5.5	0.7188	0.7188
8	180	5	5.5	2.5321	2.1222
9	20	3	10	0.3852	0.3991
10	100	5	10	0.9219	1.1110
11	20	3	1	0.0531	0.0323
12	20	5	5.5	0.6654	0.6624
13	20	1	5.5	0.4420	0.5520
14	100	1	1	0.0848	-0.0643
15	100	3	5.5	0.7188	0.7188

Table 8 Parameter estimates for linear, quadratic, and interaction effects of the variable on reducing sugar yield

Term	Coefficient	Std error	T ratio	Prob > t
Intercept	0.7188	0.1119	6.4256	0.0014
X ₁	0.0775	0.0685	1.1315	0.3092
X ₂	0.4601	0.0685	6.7167	0.0011
X ₃	0.3701	0.0685	5.4019	0.0029
X ₁ * X ₂	0.0526	0.0969	0.5429	0.6105
X ₁ * X ₃	-0.0709	0.0969	-0.7315	0.4973
X ₂ * X ₃	0.4499	0.0969	4.6436	0.0056
X ₁ ²	-0.4147	0.1008	-4.1128	0.0092
X ₂ ²	0.1467	0.1008	1.4545	0.2056
X ₃ ²	0.1717	0.1008	1.7026	0.1494

concentration of TFA acid; X₂, the solid/liquid ratio; and X₃, the extraction time on the reducing sugar yield.

The positive sign of the coefficients in the equation indicates a synergistic effect, whereas a negative sign symbolizes an antagonistic effect on the response. In this study of Box Behnken design, the predicted values are in agreement with the experimental data (Table 7). The R² value close to 1 indicates that the model is the best fit and denotes a better correlation between observed and predicted values. The coefficient of determination R² of the Box Behnken model was 0.96 and the adjusted R² 0.89. This shows that the predicted R² values were close to the adjusted R², indicating the accuracy of the model. The ANOVA results for the quadratic model are given in Table 9. The P-value < 5% indicates that the model terms are significant at 95% confidence level. The P-value and F-value were applied to determine the significance of the coefficient and the interaction strength of combined factors. The factors are significant for low P-value and high F-value. This analysis showed that

the overall model was significant (F-value = 13.5177), with very low probability value (P-value = 0.0052) (Table 9). In addition, the interaction effect between the solid/liquid ratio and the extraction time (X₂ * X₃) was significant (Table 9), as well as between (X₁ * X₂), concentration of TFA acid and solid/liquid ratio, with P-value = 0.0056. Thus, (X₁ * X₃) concentration of TFA acid and time extraction were insignificant at 95% confidence level, with P-value = 0.6105 and P-value = 0.4973, respectively (Table 9). On the other hand, linear effect (X₂), (X₃), and quadratic effect (X₁²) were identified as significant which are also evident from P value = 0.0011, P value = 0.0019, and P value = 0.0092, respectively. However, all the others were insignificant (P-value > 0.05) (Table 9).

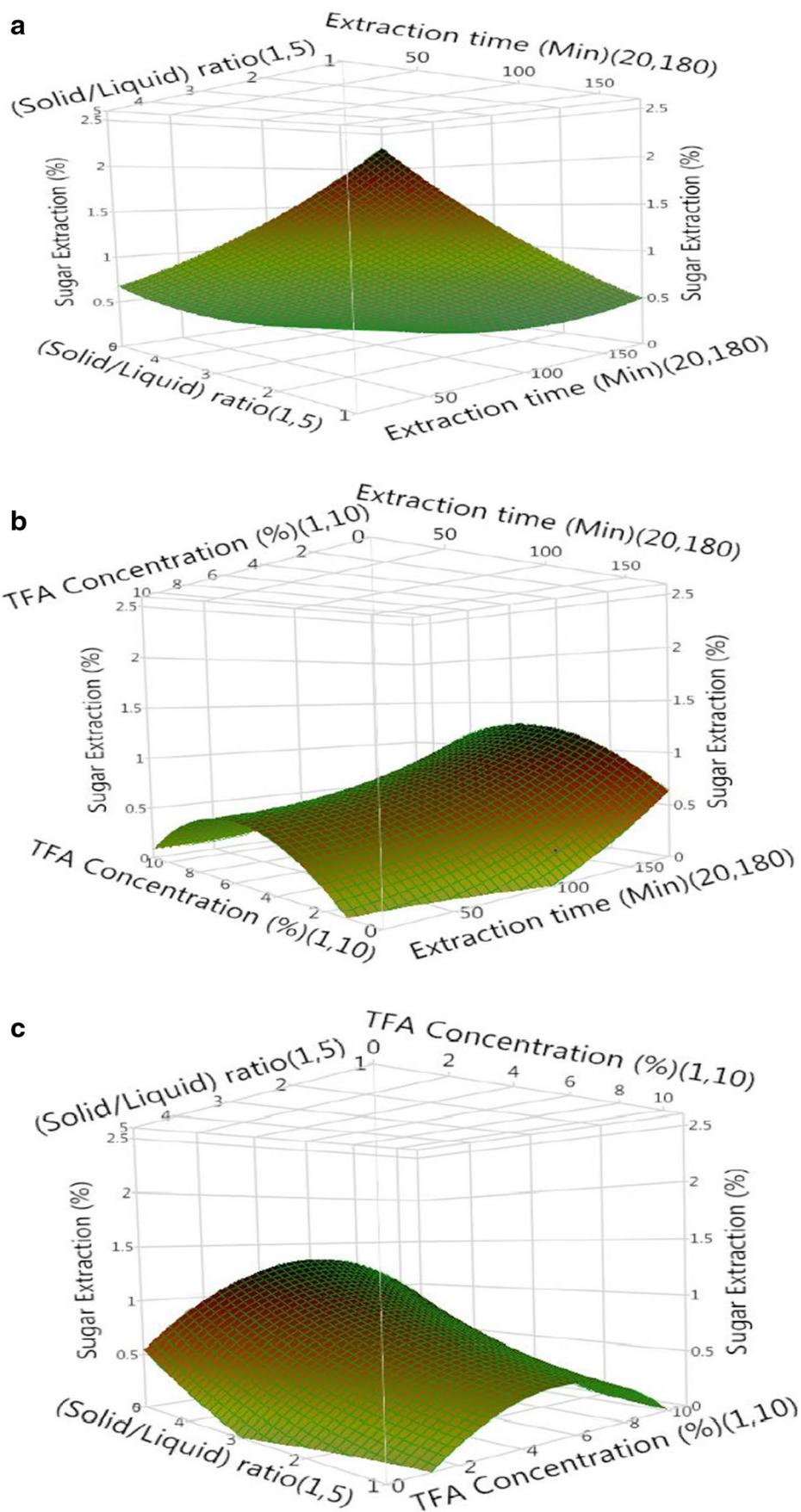
The three-dimensional response surface plots (Fig. 5) show the interaction effect between various parameters and used to predict the optimum levels of each factor to obtain the maximum response. Figure 5a shows the interaction effect of extraction time and solid/liquid ratio on the reducing sugar yield. Both the extraction time and solid/liquid ratio have a positive impact on the reducing sugar yield, when they increase from the middle to a higher level. The regular and spherical shape of the contour plot confirmed a significant interaction effect on the reducing sugar yield, in agreement with the P-value = 0.0056 (Table 9). However, no significant change in the reducing sugar yield was observed due to change in concentration of TFA acid; thus, there was no interaction between concentration of TFA acid and extraction time on the reducing sugar yield (Fig. 5b), in accordance with the P-value, 0.4973 (Table 9 and Fig. 5c). In addition, there is no interaction between the TFA concentration and the solid/liquid ratio on the reducing sugar yield (Fig. 5c), in accordance with the P-value, 0.6105 (Table 9).

The lack of fit is the variation of the data around the fitted model. The probability value of the lack of fit was

Table 9 ANOVA of Box Behnken design experimental results on sugar extraction from shoot vine waste by acid extraction

	Source	Sum of squares	DF	Mean squares	F-value	P-value	Significance
	Model	4.5674	09	0.5075	13.5177	0.0052	Significant
Linear	X ₁	0.0481	01	0.0418	1.2803	0.3092	
	X ₂	1.6937	01	1.6937	45.1145	0.0011	Significant
	X ₃	1.0955	01	1.0955	29.1810	0.0029	Significant
	X ₁ * X ₂	0.0111	01	0.0111	0.2948	0.6105	
Interaction	X ₁ * X ₃	0.0201	01	0.0201	0.5351	0.4973	
	X ₂ * X ₃	0.8095	01	0.8095	21.5633	0.0056	Significant
	X ₁ ²	0.6350	01	0.6350	16.9147	0.0092	Significant
Quadratic	X ₂ ²	0.0794	01	0.0794	2.1156	0.2056	
	X ₃ ²	0.1088	01	0.1088	2.8989	0.1494	
	Residual	0.1877	05	0.0375			
	Lack of fit	0.1877	03	0.0626			
	Pure error	0.0000	02	0.0000			
	Cor total	4.7551	14				

Fig. 5 Response surface plots showing the effects of concentration of TFA acid, extraction time, and ratio (solid–liquid) on reducing sugar yield



insignificant, which illustrated that the quadratic model was valid for this study, as well as relatively to the pure error. Optimum conditions according to the Box Behnken model were therefore as follows: temperature 100 °C, agitation speed 750 rpm, (V/V) TFA acid 5.5%, particle size 125 µm, liquid–solid ratio (5 g/100 mL), and extraction time 180 min, leading to a maximum reducing sugar yield of 2.53 g/L.

4 Conclusions

The primary goal of this study was the valorization of the lignocellulosic biomass from cardinal vine shoot waste into added-value compounds and to achieve maximum reducing sugar amount. Additionally, the results obtained from physical and chemical characterizations demonstrated that cardinal vine shoot waste is an excellent source of bioactive compounds and can be used as potential feedstock to produce biochemical, not only in Algeria, but also worldwide. The Plackett–Burman and Box Behnken designs were effective approaches to screen and to optimize the extraction parameters of reducing sugars to obtain maximum yield. In the screening step, the Plackett–Burman design was employed to determine important factors influencing the sugar extraction; six factors were selected (particle size, concentration, temperature, solid–liquid ratio, extraction time, and agitation speed). Among these factors, the Plackett–Burman design allowed to identify the temperature, concentration, and solid–liquid ratio as the significant factors influencing the sugar extraction. The optimal conditions in the screening were as follows: 500 µm, 10% (V/V), 100 °C, 5 g/100 mL, 180 min, and 750 rpm. In the optimization step, the Box Behnken design was successfully applied to optimize the process conditions and to evaluate the effect of the selected variables in the screening step; three factors were optimized (extraction time, concentration, and solid–liquid ratio). In this step, the extraction of the reducing sugar was increased from 1 to 2.53 g/L, with a yield of 150%. The optimized conditions according to the Box Behnken model were the following: 125 µm, 5.5% (V/V), 100 °C, 5 g/100 mL, 180 min, and 750 rpm. The polynomial model fitted accurately the experimental data and optimum conditions; and hence, the model was therefore experimentally validated. The chemical composition of the cardinal vine shoot waste was as follows: 43.38% cellulose, 23.58% hemicellulose, 21.22% lignin, 2.53% ash, 5.82% crude protein, and 11.7% moisture, and extractives 0.81% fat, 0.56% total sugars, and 2.3% extractive (hexane-ethanol).

Author contribution Didaoui Amine: Writing—original draft, methodology, conceptualization, software, data curation, validation, investigation, and formal analysis.

Amrane Abdeltif: Conceptualization, visualization, supervision, and writing—review and editing.

Aksil Tounsia: Software, validation, supervision, writing—review and editing, and project administration.

Boudieb Naima: Methodology, visualization, supervision, writing—original draft, and project administration.

References

- Patel M, Patel HM, Dave S (2020) Determination of bioethanol production potential from lignocellulosic biomass using novel Cel-5m isolated from cow rumen metagenome. *International Journal of Biological Macromolecules* 153:1099–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.240>
- Mishra RK, Mohanty K (2018) Characterization of non-edible lignocellulosic biomass in terms of their candidacy towards alternative renewable fuels. *Biomass Conv Bioref* 8:799–812. <https://doi.org/10.1007/s13399-018-0332-8>
- Indira D, Jayabalan R (2020) Saccharification of lignocellulosic biomass using seawater and halotolerant cellulase with potential application in second-generation bioethanol production. *Biomass Conv Bioref* 10:639–650. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00468-4>
- Rocha-Meneses L, Raud M, Orupöld K, Kikas T (2019) Potential of bioethanol production waste for methane recovery. *Energy* 173:133–139. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.02.073>
- Ip C, R. S, (2020) Characterization of a new natural cellulosic fiber extracted from *Derris scandens* stem. *International Journal of Biological Macromolecules* 165:2303–2313. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.086>
- Sabarinathan P, Rajkumar K, Annamalai VE, Vishal K (2020) Characterization on chemical and mechanical properties of silane treated fish tail palm fibres. *International Journal of Biological Macromolecules* 163:2457–2464. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.159>
- Messaoudi Y, Smichi N, Bouachir F, Gargouri M (2019) Fractionation and biotransformation of lignocelluloses-based wastes for bioethanol, xylose and vanillin production. *Waste Biomass Valor* 10:357–367. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0062-3>
- Ehman NV, Lourenço AF, McDonagh BH et al (2020) Influence of initial chemical composition and characteristics of pulps on the production and properties of lignocellulosic nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules* 143:453–461. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.165>
- Nuchdang S, Thongtut V, Khemkhao M et al (2020) Enhanced production of reducing sugars from paragrass using microwave-assisted alkaline pretreatment. *Biomass Conv Bioref*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00624-1>
- Sewsynker-Sukai Y, Gueguim Kana EB (2018) Simultaneous saccharification and bioethanol production from corn cobs: process optimization and kinetic studies. *Bioresour Technol* 262:32–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.056>
- Dutra ED, Santos FA, Alencar BRA et al (2018) Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of lignocellulosic biomass: status and perspectives. *Biomass Conv Bioref* 8:225–234. <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0277-3>
- De S, Mishra S, Poonguzhali E et al (2020) Fractionation and characterization of lignin from waste rice straw: biomass surface chemical composition analysis. *International Journal of Biological Macromolecules* 145:795–803. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.068>
- Raja Sathendra E, Baskar G, Praveenkumar R, Gnansounou E (2019) Bioethanol production from palm wood using *Trichoderma*

- reesei and *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology* 271:345–352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.134>
14. Azzouz Z, Bettache A, Djinni I et al (2020) Biotechnological production and statistical optimization of fungal xylanase by bioconversion of the lignocellulosic biomass residues in solid-state fermentation. *Biomass Conv Bioref*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01018-z>
 15. Cunha M, Romani A, Carvalho M, Domingues L (2018) Boosting bioethanol production from Eucalyptus wood by whey incorporation. *Bioresource Technology* 250:256–264. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.023>
 16. Sarawan C, Suinyuy TN, Sewsynker-Sukai Y, Gueguim Kana EB (2019) Optimized activated charcoal detoxification of acid-pretreated lignocellulosic substrate and assessment for bioethanol production. *Bioresource Technology* 286:121403. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121403>
 17. Nguyen TVT, Unpaprom Y, Manmai N et al (2020) Impact and significance of pretreatment on the fermentable sugar production from low-grade longan fruit wastes for bioethanol production. *Biomass Conv Bioref*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00977-7>
 18. Harini K, Ramya K, Sukumar M (2018) Extraction of nano cellulose fibers from the banana peel and bract for production of acetyl and lauroyl cellulose. *Carbohydrate Polymers* 201:329–339. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.081>
 19. Ibarra-Díaz N, Castañón-Rodríguez JF, Gómez-Rodríguez J, Aguilar-Uscanga MG (2020) Optimization of peroxide-alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of barley straw (*Hordeum vulgare* L.) to produce fermentable sugars using a Box–Behnken design. *Biomass Conv Bioref*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00853-4>
 20. Manmai N, Unpaprom Y, Ramaraj R (2020) Bioethanol production from sunflower stalk: application of chemical and biological pretreatments by response surface methodology (RSM). *Biomass Conv Bioref*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00602-7>
 21. Wang B, Song Q, Zhao F et al (2019) Production optimization, partial characterization and properties of an exopolysaccharide from *Lactobacillus sakei* L3. *International Journal of Biological Macromolecules* 141:21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.241>
 22. Saleh AK, Soliman NA, Farrag AA et al (2020) Statistical optimization and characterization of a biocellulose produced by local Egyptian isolate *Komagataeibacter hansenii* AS.5. *International Journal of Biological Macromolecules* 144:198–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.103>
 23. Silva TP, Ferreira AN, de Albuquerque FS et al (2021) Box–Behnken experimental design for the optimization of enzymatic saccharification of wheat bran. *Biomass Conv Bioref*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01378-0>
 24. John I, Pola J, Appusamy A (2019) Optimization of ultrasonic assisted saccharification of sweet lime peel for bioethanol production using Box–Behnken method. *Waste Biomass Valor* 10:441–453. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0072-1>
 25. Chan YT, Tan MC, Chin NL (2019) Application of Box–Behnken design in optimization of ultrasound effect on apple pectin as sugar replacer. *LWT* 115:108449. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108449>
 26. Dávila I, Remón J, Gullón P et al (2019) Production and characterization of lignin and cellulose fractions obtained from pretreated vine shoots by microwave assisted alkali treatment. *Bioresource Technology* 289:121726. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121726>
 27. Moreira MM, Barroso MF, Porto JV et al (2018) Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. *Science of The Total Environment* 634:831–842. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.035>
 28. Troilo M, Difonzo G, Paradiso VM et al (2021) Bioactive compounds from vine shoots, grape stalks, and wine lees: their potential use in agro-food chains. *Foods* 10:342. <https://doi.org/10.3390/foods10020342>
 29. El Achaby M, El Miri N, Hannache H et al (2018) Production of cellulose nanocrystals from vine shoots and their use for the development of nanocomposite materials. *International Journal of Biological Macromolecules* 117:592–600. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.201>
 30. Dávila I, Gullón P, Labidi J (2021) Influence of the heating mechanism during the aqueous processing of vine shoots for the obtaining of hemicellulosic oligosaccharides. *Waste Management* 120:146–155. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.11.014>
 31. Garita-Cambronero J, Paniagua-García AI, Hijosa-Valsero H, Díez-Antolínez R (2021) Biobutanol production from pruned vine shoots. *Renewable Energy* S0960148121007758. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.05.093>
 32. Senila L, Kovacs E, Scurtu DA et al (2020) Bioethanol production from vineyard waste by autohydrolysis pretreatment and chlorite delignification via simultaneous saccharification and fermentation. *Molecules* 25:2606. <https://doi.org/10.3390/molecules25112606>
 33. Pachón ER, Mandade P, Gnansounou E (2020) Conversion of vine shoots into bioethanol and chemicals: Prospective LCA of biorefinery concept. *Bioresource Technology* 303:122946. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122946>
 34. Benito-González I, Jaén-Cano CM, López-Rubio A et al (2020) Valorisation of vine shoots for the development of cellulose-based biocomposite films with improved performance and bioactivity. *International Journal of Biological Macromolecules* 165:1540–1551. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.240>
 35. Moisture in pulp, paper and paperboard, Test Method TAPPI/ANSI T 412 om-16
 36. T. Tappi, Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525 C, TAPPI Test Methods T 211, 1993.
 37. Solvent Extractives of wood and pulp, Test Method T 204 cm-17
 38. Acid-insoluble lignin in wood and pulp, Test Method T 222 om-15
 39. Candelier K Caractérisation des transformations physico-chimiques intervenant lors de la thermodégradation du bois. Influence de l'intensité de traitement, de l'essence et de l'atmosphère. 141
 40. Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp, Test Method T 203 cm-09
 41. Bicsak RC, Collaborators: Boles R, et al (1993) Comparison of Kjeldahl method for determination of crude protein in cereal grains and oilseeds with generic combustion method: collaborative study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 76:780–786. <https://doi.org/10.1093/jaoac/76.4.780>
 42. Nam S, French AD, Condon BD, Concha M (2016) Segal crystallinity index revisited by the simulation of X-ray diffraction patterns of cotton cellulose I β and cellulose II. *Carbohydrate Polymers* 135:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.035>
 43. Thangavelu SK, Rajkumar T, Pandi DK et al (2019) Microwave assisted acid hydrolysis for bioethanol fuel production from sago pith waste. *Waste Management* 86:80–86. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.01.035>
 44. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 31:426–428
 45. Rastogi A, Banerjee R (2019) Production and characterization of cellulose from *Leifsonia* sp. *Process Biochemistry* 85:35–42. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.008>
 46. Xu A-R, Chen L, Guo X et al (2018) Biodegradable lignocellulosic porous materials: fabrication, characterization and its application in water processing. *International Journal of Biological Macromolecules* 115:846–852. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.133>

47. Jiang F, Hsieh Y-L (2015) Cellulose nanocrystal isolation from tomato peels and assembled nanofibers. *Carbohydrate Polymers* 122:60–68. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.064>
48. Belouadah Z, Toubal L, Belhaneche-Bensemra N, Ati A (2021) Characterization of ligno-cellulosic fiber extracted from *Atriplex halimus* L. plant. *International Journal of Biological Macromolecules* 168:806–815. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.142>
49. Moshi AAM, Ravindran D, Bharathi SRS et al (2020) Characterization of a new cellulosic natural fiber extracted from the root of *Ficus religiosa* tree. *International Journal of Biological Macromolecules* 142:212–221. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.094>
50. Alotaibi MD, Alshammari BA, Saba N et al (2019) Characterization of natural fiber obtained from different parts of date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Biological Macromolecules* 135:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.102>
51. Jc CS, George N, Narayanankutty SK (2016) Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from arecanut husk fibre. *Carbohydrate Polymers* 142:158–166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.015>
52. Vijay R, Lenin Singaravelu D, Vinod A et al (2019) Characterization of raw and alkali treated new natural cellulosic fibers from *Tridax procumbens*. *International Journal of Biological Macromolecules* 125:99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.056>
53. Segal L, Creely JJ, Martin AE, Conrad CM (1959) An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal* 29:786–794. <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>
54. Jabihulla Shariff Md SCK (2020) Characterization of novel natural cellulosic fiber extracted from the stem of *Cissus vitiginea* plant. *International Journal of Biological Macromolecules* 161:1358–1370. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.230>
55. Ganapathy T, Sathiskumar R, Senthamaraikannan P et al (2019) Characterization of raw and alkali treated new natural cellulosic fibres extracted from the aerial roots of banyan tree. *International Journal of Biological Macromolecules* 138:573–581. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.136>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Terms and Conditions

Springer Nature journal content, brought to you courtesy of Springer Nature Customer Service Center GmbH (“Springer Nature”).

Springer Nature supports a reasonable amount of sharing of research papers by authors, subscribers and authorised users (“Users”), for small-scale personal, non-commercial use provided that all copyright, trade and service marks and other proprietary notices are maintained. By accessing, sharing, receiving or otherwise using the Springer Nature journal content you agree to these terms of use (“Terms”). For these purposes, Springer Nature considers academic use (by researchers and students) to be non-commercial.

These Terms are supplementary and will apply in addition to any applicable website terms and conditions, a relevant site licence or a personal subscription. These Terms will prevail over any conflict or ambiguity with regards to the relevant terms, a site licence or a personal subscription (to the extent of the conflict or ambiguity only). For Creative Commons-licensed articles, the terms of the Creative Commons license used will apply.

We collect and use personal data to provide access to the Springer Nature journal content. We may also use these personal data internally within ResearchGate and Springer Nature and as agreed share it, in an anonymised way, for purposes of tracking, analysis and reporting. We will not otherwise disclose your personal data outside the ResearchGate or the Springer Nature group of companies unless we have your permission as detailed in the Privacy Policy.

While Users may use the Springer Nature journal content for small scale, personal non-commercial use, it is important to note that Users may not:

1. use such content for the purpose of providing other users with access on a regular or large scale basis or as a means to circumvent access control;
2. use such content where to do so would be considered a criminal or statutory offence in any jurisdiction, or gives rise to civil liability, or is otherwise unlawful;
3. falsely or misleadingly imply or suggest endorsement, approval, sponsorship, or association unless explicitly agreed to by Springer Nature in writing;
4. use bots or other automated methods to access the content or redirect messages
5. override any security feature or exclusionary protocol; or
6. share the content in order to create substitute for Springer Nature products or services or a systematic database of Springer Nature journal content.

In line with the restriction against commercial use, Springer Nature does not permit the creation of a product or service that creates revenue, royalties, rent or income from our content or its inclusion as part of a paid for service or for other commercial gain. Springer Nature journal content cannot be used for inter-library loans and librarians may not upload Springer Nature journal content on a large scale into their, or any other, institutional repository.

These terms of use are reviewed regularly and may be amended at any time. Springer Nature is not obligated to publish any information or content on this website and may remove it or features or functionality at our sole discretion, at any time with or without notice. Springer Nature may revoke this licence to you at any time and remove access to any copies of the Springer Nature journal content which have been saved.

To the fullest extent permitted by law, Springer Nature makes no warranties, representations or guarantees to Users, either express or implied with respect to the Springer nature journal content and all parties disclaim and waive any implied warranties or warranties imposed by law, including merchantability or fitness for any particular purpose.

Please note that these rights do not automatically extend to content, data or other material published by Springer Nature that may be licensed from third parties.

If you would like to use or distribute our Springer Nature journal content to a wider audience or on a regular basis or in any other manner not expressly permitted by these Terms, please contact Springer Nature at

onlineservice@springernature.com