

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITÉ de BLIDA 1**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie des Procédés**



# **Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES ET GENIE DE  
L'ENVIRONNEMENT**

**Spécialité :** Gestion Durable des Déchets et Procédés de Traitement

Intitulé du mémoire

**Étude comparative entre l'hydrolyse  
chimique et le prétraitement assisté aux  
ultrasons de la biomasse lignocellulosique  
pour la production du bioéthanol**

Présenté par :  
M. Boumenir Billel  
M. Zebar Aissa

Encadré par :  
Dr. Boutemak Khalida  
Co-promoteur  
M. Djeddou Sohaib

Année universitaire 2018/2019

## **Remerciements**

*Au terme de ce travail, on remercie Dieu « Tout Puissant » pour ce qu'il nous a donné comme force pour effectuer ce travail.*

*On adresse nos profonds remerciements à Madame Khalida BOUTEMAK pour nous avoir permis de réaliser ce travail et nous avoir encadré avec efficacité. On vous remercie sincèrement et de tout notre cœur. Merci pour votre patience inébranlable, votre aide sans limites et votre disponibilité sans relâche sans lesquelles ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Vous nous avez soutenus jusqu'à la dernière minute, un soutien et une attention qu'on n'oublierait jamais. On vous exprime ici toute notre gratitude et notre reconnaissance envers tout ce que vous avez fait pour finaliser ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à notre Co-promoteur M. Djeddou Sohaib qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger cette étude, et qui a fait preuve d'une grande patience. Ses conseils, ses orientations ainsi que, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour notre sujet de recherche nous ont permis de mener à terme ce projet.*

*Nos remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par leurs propositions.*

*On tient à remercier le laboratoire de recherche analyse fonctionnelle au Département De Génies Des Procédés de l'Université de Blida 1 et en premier lieu Monsieur Ali OUABED de nous avoir permis de mener cette étude au sein du laboratoire.*

*On remercie également toutes les personnes du laboratoire et plus particulièrement Madame Linda BELHADJI pour ses nombreux conseils et pour son aide précieuse.*

*Nos plus vifs remerciements sont également adressés à l'ensemble d'enseignants du Département De Génies Des Procédés de l'Université de Blida 1*

*On adresse aussi un grand merci à tous nos chères amis(e) et à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail*

*Enfin, ce travail n'aurait pas été mené à terme sans les encouragements de nos parents et de tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail, auxquels nous disons tout simplement merci.*

*Billel BOUMENIR*

*Aissa ZEBAR*

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

### Liste des figures

- Figure I.1 : Structure de la lignocellulose
- Figure I.2 : Structure de la cellulose
- Figure I.3 : Réseau de liaison hydrogène dans la cellulose
- Figure 1.4 : Structure de l'hémicellulose
- Figure I.5 : Structure de la lignine
- Figure I.6 : Effet du prétraitement sur les fibres de la lignocellulose
- Figure I.7 : Structure de *Punica granatum*
- Figure I.8 : Répartition géographique du grenadier en Afrique
- Figure II.1 : Utilisation potentielle du bioéthanol
- Figure II.2 : production mondiale de bioéthanol (2018)
- Figure III 1 : les écorces de grenade broyée et tamiser a 0.8.
- Figure III.2 : Schéma descriptive de la production du bioéthanol par SSF
- Figure III.3 : Réaction de réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide 3-amino- 5-nitrosalicylique
- Figure III.4 : Schéma descriptive représente les étapes de la production de bioéthanol par l'hydrolyse acide et ultrason.
- Figure IV.1 : Spectre des écorces de grenade avant prétraitement
- Figure IV .2 : Spectre des écorces de grenade après prétraitement par les ondes à ultrason
- Figure IV.3 : Spectre des écorces de grenade après prétraitement acide.
- Figure IV.4 : Cinétique de pH
- Figure IV.5 : Cinétique des sucres totaux.
- Figure IV.6 : Cinétique des sucres réducteurs.
- Figure IV.7 : Cinétique de l'éthanol.
- Figure IV.8 : Chromatogramme de l'éthanol 96%.
- Figure IV.9 : Chromatogramme de bioéthanol par l'hydrolyse acide dilué
- Figure IV.10 : Chromatogramme de bioéthanol par ultrasons

### Liste des tableaux

- Tableau II.1 : Différentes générations de biocarburants et les procédés de transformation pour chaque génération
- Tableau II.2 : Propriétés physico-chimiques de l'éthanol

Tableau II.3 : Évolution des rendements des ressources agricoles

Tableau II.4 : Avantages et les inconvénients du bioéthanol

Tableau III.1 : Réactifs utilisés

Tableau IV .1 : Les résultats de la caractérisation de la biomasse

Tableau IV.2 Concentration des sucres réducteurs après prétraitement

Tableau IV.3 : Groupements fonctionnelles présent dans les écorces de grenade avant et après prétraitement

Tableau IV.4 : Densité et viscosité du bioéthanol

Tableau IV.5 : Concentration volumiques du bioéthanol.

Tableau IV.6 : Temps de rétention de HA-SSF et de US-SSF.

Tableau IV.7 : Comparaison des deux procédés avec les écorces de grenade.

## Liste des abréviations et symboles

C5	sucre à 5 carbones
C6 :	sucre à 6 carbones
HFS	Hydrolyse et Fermentation Séparée
pH	Potentiel d'hydrogène
UV	Ultra-violet
SSF	Saccharification et Fermentation Simultanée
CPG	La chromatographie en phase gazeuse
T	Température
mg	milligramme
ITRF	Infrarouge a Transformée de Fourier
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
MEB	Microscope électronique a balayage
GES	Gaz à effet de serre

## ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تجميع نفايات الأغذية الزراعية من الكتلة الحيوية الليجينية (الرمان) لإنتاج ودراسة الخصائص المتعلقة بالجيل الثاني من الإيثانول الحيوي. تمت معالجة هذه الكتلة الحيوية مسبقا بطريقتين: المعالجة بحمض الكبريت والمعالجة بالموجات فوق الصوتية لإزالة بلمرة البنية السلوليغينية. تمت عملية إنتاج الإيثانول الحيوي من خلال عملية التخمير والتخثر المتزامن باستخدام خميرة الخبز والإنزيمات (السليلاز والهيمسولولاز) في وسط لاهوائي في درجة حرارة تعادل 30 درجة مئوية، درجة حموضة 4.8 وسرعة دوران تعادل 250 دورة في الدقيقة ، وخلال التخمير ، تابعا تطور العديد من المتغيرات مثل: درجة الحموضة ، و مستوى السكر وتركيز الإيثانول. في النهاية ، لاحظنا ان أفضل تركيز للإيثانول هو الذي تم الحصول عليه بنسبة 5.9 غ/ل للكتلة الحيوية المعالجة بواسطة التحلل الحمضي المخفف يليه عملية التخمير والتخثر المتزامن.

**الكلمات المفتاحية:** نفايات الأغذية الزراعية ، المعالجة المسبقة ، الكتلة الحيوية السلوليغينية. ، الرمان ، الإيثانول (الحيوي) ، خميرة الخبزة. التخمير والتخثر المتزامن.

## Abstract

The objective of this study is the valorization of agro-food waste from lignocellulosic biomass (*Punica granatum*) for the production and characterization of second-generation bioethanol. This biomass was pretreated by two methods: pretreatment with sulfuric acid and ultrasound pretreatment, in order to depolymerize the lignocellulosic structure. Production of bioethanol was carried out by the Saccharification and Simultaneous Fermentation (SSF) process using *Saccharomyces cerevisiae* and the two enzymes (cellulase and hemicellulase) under anaerobic conditions (pH=4.8, 30°C and 250 rpm). During fermentation, we followed the evolution of several parameters such as : the hydrogen potential, Total and reducing sugars and bioethanol concentration. At the end, the best concentration of bioethanol obtained was 5.9 g/L for the biomass pretreated by dilute acid hydrolysis followed by SSF (HA-SSF).

**Keywords:** agro-food waste, pretreatment, lignocellulosic biomass, *Punica granatum*, bioethanol, (SSF), *Saccharomyces cerevisiae*.

## Résumé

L'objectif de cette étude est la valorisation des déchets agroalimentaires de la biomasse lignocellulosique (*Punica granatum*) pour la production et la caractérisation du bioéthanol de seconde génération. Cette biomasse a été prétraitée par deux méthodes :

prétraitement par l'acide sulfurique et prétraitement par la sonde ultrasoniques afin de dépolymériser la structure lignocellulosique. La deuxième étape a été réalisée par le procédé de la Saccharification et fermentation simultanée (SSF), en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les deux enzymes (la cellulase et l'hémicellulase) sous conditions anaérobiques (pH=4,8, 30°C et une vitesse d'agitation 250 tr/min). Durant la fermentation, nous avons suivi l'évolution de plusieurs paramètres à savoir: le potentiel hydrogène, le taux des sucres totaux et réducteurs et la concentration de bioéthanol. A la fin la meilleure concentration de bioéthanol obtenue est de 5,9 g/L pour la biomasse prétraité par l'hydrolyse acide diluée suivi par SSF (HA-SSF).

**Mots clés :** déchets agroalimentaires, prétraitement, biomasse lignocellulosique, *Punica granatum*, bioéthanol, (SSF), *Saccharomyces cerevisiae*.

## TABLES DES MATIERES

### CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA BIOMASSE

Intoduction.....	1
------------------	---

I.1 Définition de la biomasse.....	3
I.2 Biomasse lignocellulosique.....	3
I.2.1 Cellulose.....	4
I.2.2 Hémicelluloses.....	5
I.2.3 Lignine .....	6
I.3 Prétraitement de la biomasse lignocellulosique .....	7
I.3.1 Hydrolyse acide .....	8
I.3.1.1 Hydrolyse à l'acide dilué.. .....	8
I.3.1.2 Hydrolyse à l'acide concentré.....	8
I.3.2 Hydrolyse par Ultrasons .....	9
I.3.3 Hydrolyse enzymatique .....	9
I.3.4 Hydrolyse et fermentation séparée (HSF) .....	9
I.4 Saccharification et Fermentation Simultanée (SSF).....	9
I.5 La fermentation .....	10

## CHAPITRE II : DIFFERENTES BIOENERGIES

II.1 Biogaz .....	11
II.2 Biocarburant .....	11
II.3 Biodiesel .....	11
II.4 Bioéthanol .....	12
II.4.1 Générations de bioéthanol .....	13
II.4.1.1 Bioéthanol de première génération .....	13
II.4.1.2 Bioéthanol de deuxième génération .....	14
II.4.1.2.1 Bioéthanol issus des résidus agricoles .....	14
II.4.1.3 Bioéthanol de troisième génération .....	15
II.4.2 Avantages et les inconvénients du bioéthanol .....	15
II.4.3 Domaines d'utilisation du bioéthanol .....	16
II.4.4 Production de bioéthanol .....	17
II.4.4.1 Production de bioéthanol à l'échelle mondiale .....	17
II.4.4.2 Production de bioéthanol à l'échelle nationale .....	18

## CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

III.1 Matière première .....	19
------------------------------	----

III.2 Réactifs .....	19
III.3 Caractérisation de la matière première .....	21
III.3.1 Taux d'humidité .....	21
III.3.2 Taux de cendre .....	21
III.3.3 Teneur de la cellulose et l'hémicellulose .....	22
III.3.4 Teneur de la lignine .....	22
III.3.5 Teneur en lipides .....	23
III.3.6 Teneur en protéines .....	23
III.4 Production du bioéthanol .....	24
III.4.1 Prétraitement .....	24
III.4.1.1 Hydrolyse acide diluée .....	24
III.4.1.2 Prétraitement assisté aux ondes ultrasons .....	24
III.4.2 Correction du pH .....	24
III.4.3 Saccharification et Fermentation Simultanée(SSF) .....	25
III.4.3.1 Mesure du pH .....	26
III.4.3.2 Mesure des sucres totaux par la méthode de Dubois .....	26
III.4.3.3 Mesure des sucres réducteurs par la méthode de Miller .....	26
III.4.3.4 Mesure de la concentration de l'éthanol .....	27
III.4.4 Distillation .....	28
III.4.5 Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformé de Fourier .....	27
III.5 Caractérisation de bioéthanol .....	29
III.5.1 Mesure de la densité et de la viscosité .....	29
III.5.2 Analyse qualitative de bioéthanol par chromatographie en phase gazeuse (CPG)...	29
III.5.3 Analyse quantitative du bioéthanol par densimètre .....	29
III.5.4 Détermination du rendement en éthanol .....	29

## CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1 Caractérisation de la biomasse étudiée .....	31
IV.2 Résultats du prétraitement par ultrasons .....	31
IV.3 Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformé de Fourier .....	32
IV.4 Résultats des paramètres suivis lors de procédé de production de bioéthanol .....	33
IV.4.1 Evolution du pH au cours de la fermentation alcoolique, par l'hydrolyse acide diluée et ultrasons suivi par SSF.....	35

IV.4.2 Cinétique des sucres totaux pour le procédé du prétraitement par l'hydrolyse acide diluée et ultrasons suivi par SSF .....	36
IV.4.3 Cinétique des sucres réducteurs pour le procédé du prétraitement par l'hydrolyse acide diluée et ultrasons suivi par SSF .....	37
IV.4.4 Dosage de l'éthanol .....	38
IV.4.5 Mesure de la densité et de la viscosité .....	38
IV.4.6 Concentrations volumiques du bioéthanol obtenue durant les 48h de la fermentation et après bidistillation .....	39
IV.4.7 Analyse qualitative du bioéthanol par CPG .....	39
IV.5 Comparaison du rendement et de la productivité de l'éthanol obtenue avec les deux procédés HA-SSF et US-SSF.....	41
Conclusion.....	42

## INTRODUCTION GENERALE

La demande mondiale en énergie ne fait qu'augmenter mais elle est majoritairement dépendante des énergies fossiles qui présente de plus en plus des problèmes liés à la disponibilité des ressources qui est en diminution continue, vu leur nature non renouvelable et leurs coûts d'extraction et d'exploitation. En plus, les énergies fossiles engendre des problèmes liés à l'environnement, essentiellement l'émission de gaz à effet de serre (GES) notamment le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Ces gaz sont à l'origine du réchauffement de la planète qui est devenu une préoccupation mondiale poussant à trouver d'autres alternatives.

Les biocarburants sont bien placés pour répondre aux soucis énergétiques, ces derniers sont issus des sources de biomasse diversifiée tel que : les plantes saccharifères comme la betterave, les plantes amylacées comme les céréales, dit de première génération. Les plantes lignocellulosiques comme le bois, les déchets agroalimentaires, dit de seconde génération.

Le bioéthanol représente une source d'énergie très prometteuse. Il peut être produit par des ressources naturelles renouvelables comme les végétaux contenant du saccharose (betterave, canne à sucre...) ou de l'amidon (blé, maïs, pomme de terre...). Cependant, des pays comme les États Unis ou le Brésil consacrent des cultures pour la production de l'éthanol, ce qui est en compétition avec leurs utilisations pour l'alimentation humaine et animale. La recherche scientifique attire une attention spéciale pour la production du bioéthanol à partir des autres ressources qui ne sont pas utilisées à des fins de consommation humaine ou animale.

Les déchets des issus de l'agriculture et des industries agroalimentaires offre cette opportunité. Ces derniers attirent l'attention sur la production d'éthanol en raison de leur abondance, de leur disponibilité, de leur biodégradabilité, de leur richesse en carbone et de leur contenu nutritif, et aussi, pour gérer les problèmes de déchets de l'industrie sur le plan économique et environnemental.

L'objectif de ce travail est la production du bioéthanol à partir d'un déchet des écorces de (*Punica granatum*) en étudiant l'impact du prétraitement de la biomasse lignocellulosique sur l'évolution des sucres au cours de la fermentation et sur la production du bioéthanol de seconde génération pouvant être utilisé comme biocarburant et dans d'autres applications.

Ce travail présente deux parties principales :

La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle le premier chapitre présentera des généralités sur la biomasse. Le deuxième chapitre est consacré au bioéthanol et ses différentes générations et quelques procédés de production.

La seconde partie détaille les matériels et les méthodes utilisés dans cette étude : la préparation de la biomasse, les prétraitements et le procédé utilisé, ainsi que la méthode de caractérisation qualitative et quantitative de l'éthanol.

A partir de l'interprétation des résultats expérimentaux, nous terminerons notre travail par une conclusion générale.

# CHAPITRE I

## GENERALITES SUR LA BIOMASSE

Pendant longtemps la biomasse, fut la source d'énergie la plus exploitée par l'homme.

Qu'est-ce que la biomasse ?

Comment produit-on de l'énergie à partir de la biomasse ?

### **I.1 Définition de la biomasse**

C'est l'ensemble de la matière d'origine vivante. Mais les textes donnent différentes définitions qui peuvent varier sur des points de détails.

Selon L'article 29 de la loi **française** 2005-781 de programmation fixant les orientations de la politique énergétique dite " POPE", du 13 juillet 2005, définit la biomasse est définie comme :

"La fraction biodégradable des produits, des déchets et des résidus provenant de l'agriculture, y compris les substances végétales et animales, de la sylviculture et des industries connexes, ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et ménagers"[1].

On peut également définir la biomasse comme un ensemble de la matière organique d'origine végétale ou animale, qui englobe des végétaux provenant de cultures et des déchets. Les cultures énergétiques recouvrent des plantes très diverses telles que les oléagineux, les graminées comme le maïs et la canne à sucre (plantes riches en carbone), le bois.... Les déchets peuvent être soit solides (industries agro-alimentaires, papetières, de transformation du bois, agricoles déchets verts ou ménagers), soit liquides (les boues de stations d'épuration, déjections animales) [2].

### **I.2 Biomasse lignocellulosique**

Face à l'épuisement des ressources pétrolières, un grand intérêt s'est porté sur l'utilisation de la biomasse comme matière première. Parmi la biomasse, la biomasse lignocellulosique représente la source de carbone renouvelable la plus abondante de la planète est particulièrement étudiée, elle est produite chaque année dans le monde à l'échelle de 180 milliards de tonnes. Ce carbone renouvelable peu coûteux à la source, peut alors être utilisé en substitution du carbone fossile.

Les sources de lignocellulose sont diverses et variées : résidus agricoles et forestiers, déchets issus de la transformation du bois, plantes aquatiques et algues ou encore cultures dédiées de plantes ligneuses (arbres et plantes robustes), et herbacées (tiges tendres). La lignocellulose possède une structure fibreuse, constituée de trois éléments majeurs qui sont : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Ces trois macromolécules intimement liées, forment un réseau tridimensionnel complexe. Les hémicelluloses sont reliées entre elles et avec la cellulose par des liaisons hydrogènes. La lignine est liée de façon covalente avec les hémicelluloses. (Figure I.1 ) [3] .

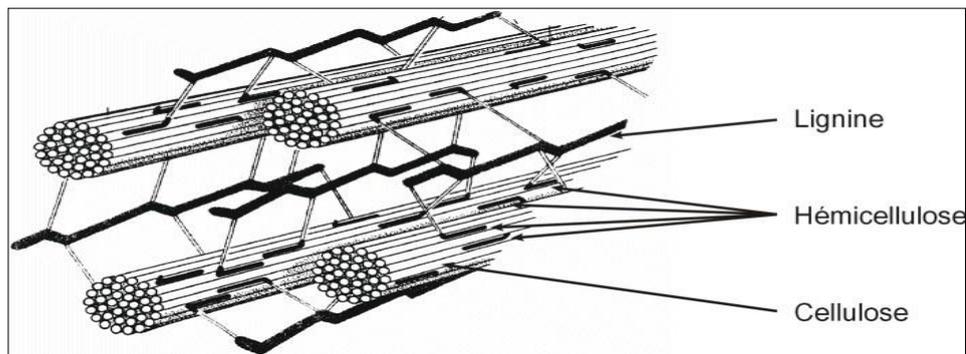


Figure I.1 : Structure de la lignocellulose [3].

La valorisation de la lignocellulose débute par une étape de fractionnement qui a pour but de séparer les trois constituants et pouvoir ainsi les utiliser séparément [3].

### I.2.1 Cellulose

La cellulose est un homopolymère constitué de chaînes linéaires issues de l'assemblage de monomères de D-glucose liés par des liaisons  $\beta$ -1-4 glycosuriques (Figure I.2). Elle possède un nombre variable d'unités de D-anhydroglucopyranose, qui présentent trois groupements hydroxyles libres, respectivement sur les atomes de carbone C2, C3 et C6.

La cellulose possède également aussi, à l'une des extrémités, un hydroxyle libre sur l'atome de carbone C4 et, à l'autre extrémité, un hydroxyle libre sur l'atome de carbone C1. Le groupement hydroxyle de l'atome de carbone anomérique (C1) étant libre, l'extrémité est appelée réductrice. Il y a, en effet, un équilibre entre la forme hémiacétal cyclique et la forme ouverte avec la présence d'une fonction aldéhyde.

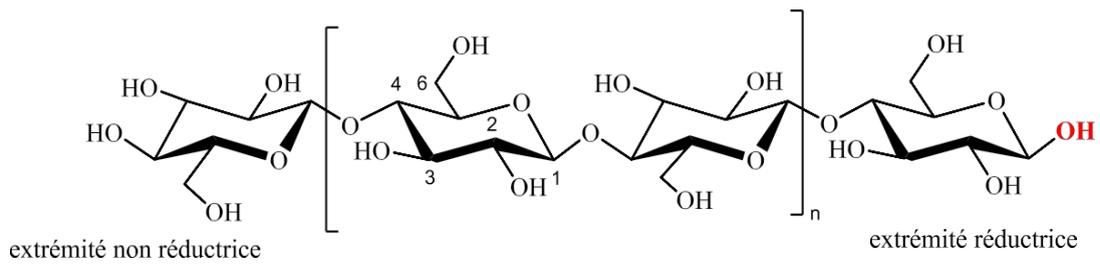


Figure I.2 : Structure de la cellulose [4].

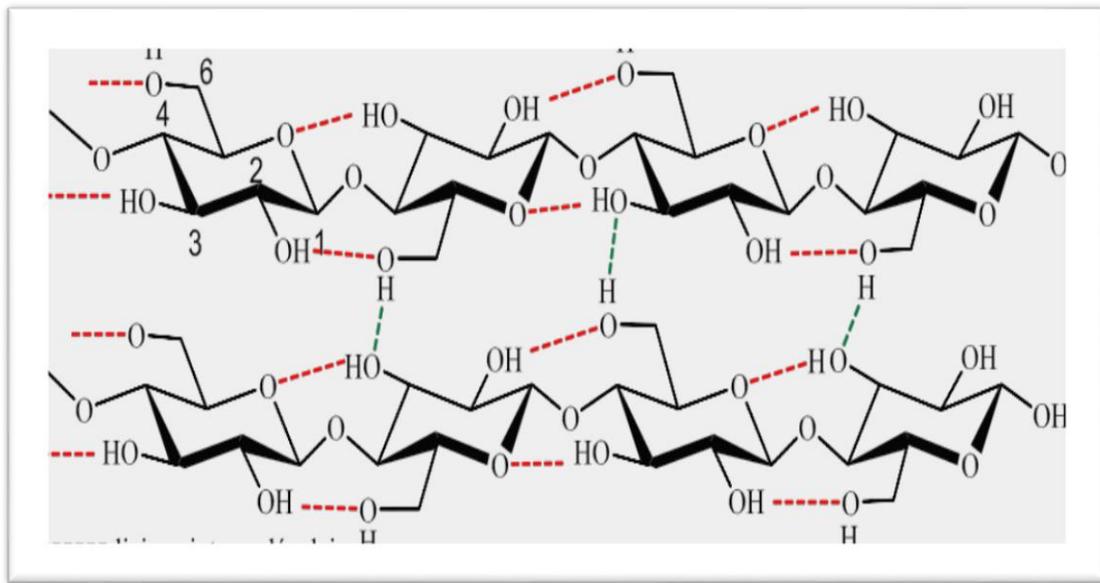


Figure I.3 : Réseau de liaison hydrogène dans la cellulose [3].

### **I.2.2 Hémicelluloses**

Les hémicelluloses sont une famille de composés hétéropolysaccharidiques composées de sucres à cinq (principalement arabinose et xylose) ou six carbones (glucose, mannose et galactose). La structure chimique exacte de la fraction hémicellulosique varie d'une espèce à une autre. Néanmoins, les hémicelluloses les plus courantes dans la biomasse lignocellulosique sont issues de la famille des xylanes, des mannanes et des galactanes. Les xylanes possèdent une structure  $\beta$ -1,4-xylose qui contient des motifs arabinose et des motifs acide glucuronique. Les mannanes possèdent quant à elles une structure  $\beta$ -1,4-mannose. Enfin, les galactanes sont composées d'une structure  $\beta$ -1,4-galactose hautement substituée par des motifs xylose, galactose, arabinose ou encore fructose. Les hémicelluloses ont comme caractéristique d'être facilement hydrolysable au contraire de la cellulose [5].

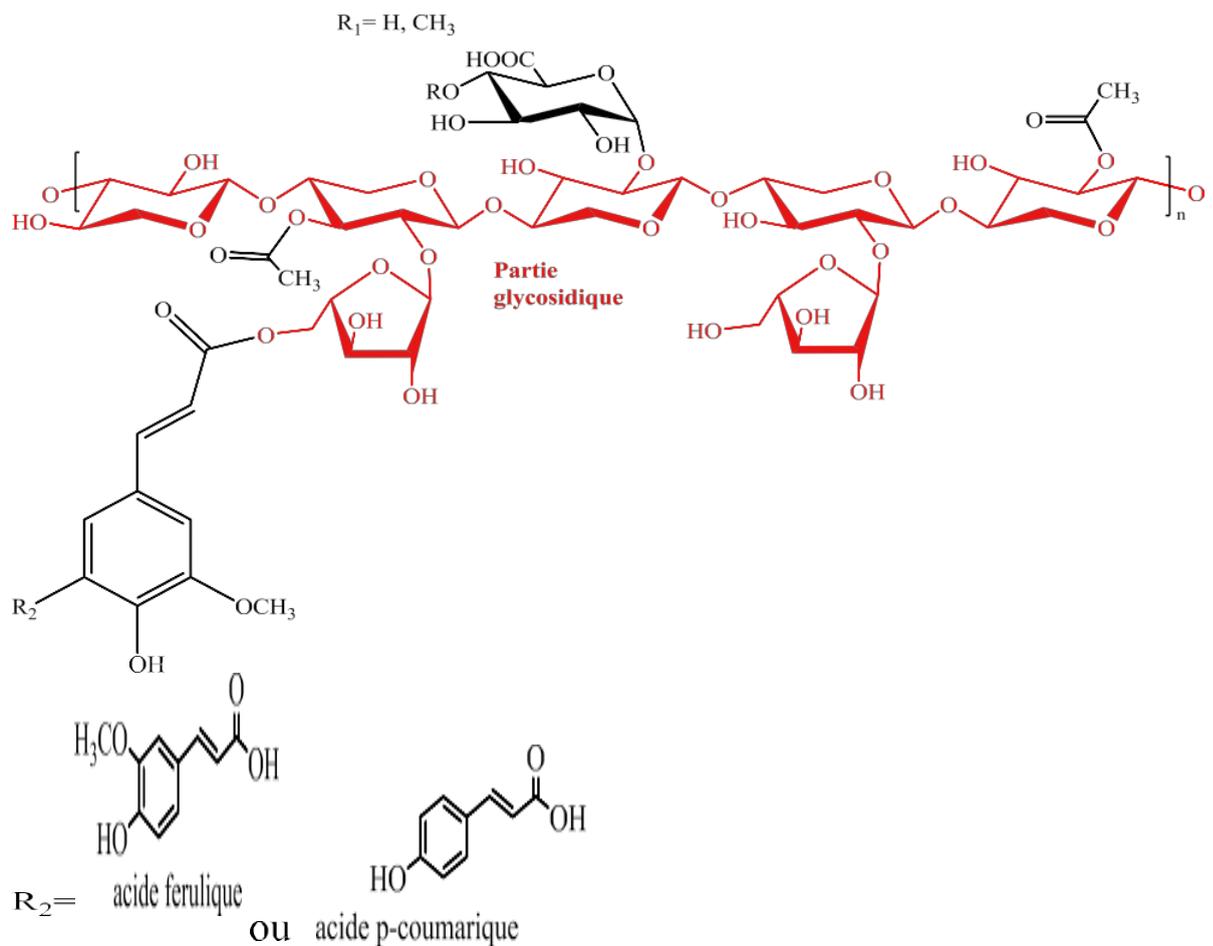


Figure I.4 : Structure de l'hémicellulose [3].

### I.2.3 Lignine

La lignine est constituée de polymères aromatiques hyperbranchés qui forment un réseau tridimensionnel amorphe (Figure I.5). La lignine est issue majoritairement de trois monomères : l'alcool paracoumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique. Ces monomères sont liés par différentes liaisons : alkyle-aryle, alkyle-alkyle et éther. La lignine est responsable de la rigidité des plantes. Elle est ainsi présente en grande proportion dans les tissus responsables du port de la plante. La lignine est très résistante aux attaques biologiques grâce aux liaisons éther. Seuls quelques champignons spécifiques sont capables de la dégrader. La lignine est liée de façon covalente aux hémicelluloses par des liaisons éther et ester [6].

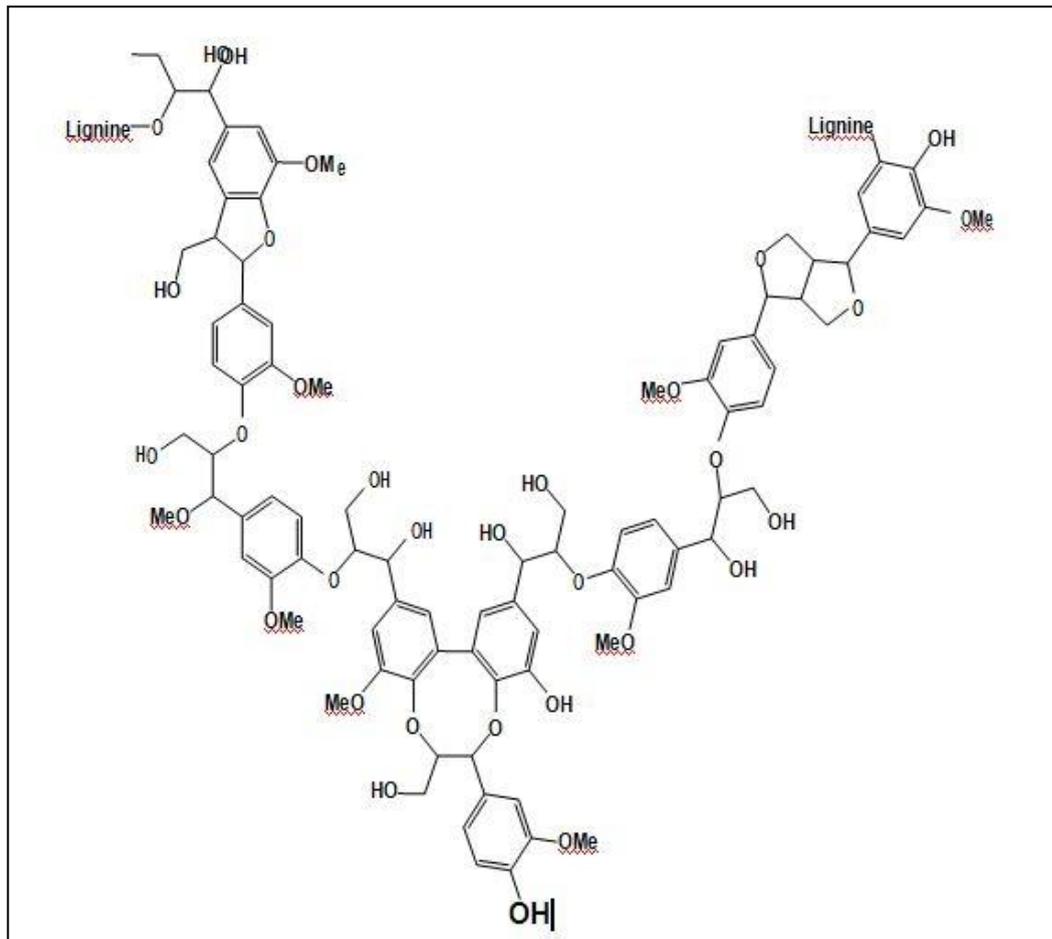


Figure I.5 : Structure de la lignine [6].

### I.3 Prétraitement de la biomasse lignocellulosique

Le prétraitement a un double rôle : fractionner les trois biopolymères de la lignocellulose et augmenter la réactivité de la cellulose. L'objectif en fractionnant cette matière est de pouvoir séparer les différents constituants, afin de les valoriser individuellement [3].

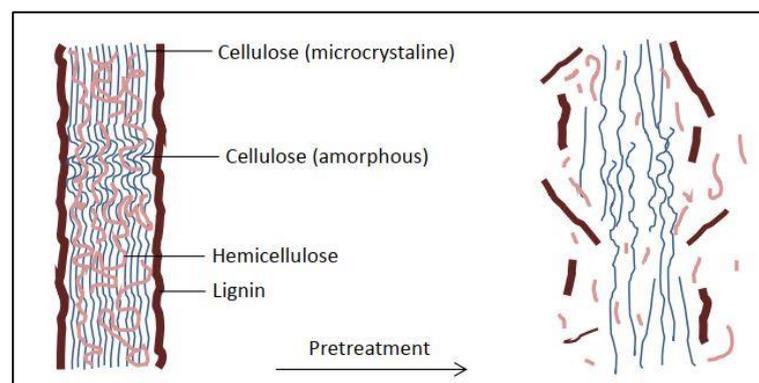


Figure I.6 : Effet du prétraitement sur les fibres de la lignocellulose [7].

### **I.3.1 Hydrolyse acide**

#### **I.3.1.1 Hydrolyse à l'acide dilué**

Le prétraitement à l'acide dilué est l'une des méthodes de prétraitement les plus efficaces [8,9] Deux types de procédés de prétraitement à l'acide dilué sont habituellement utilisés :

- Un procédé à haute température ( $T > 160^{\circ}\text{C}$ ) à flux continu pour des charges en solides basses (concentration en substrat de 5-10% en poids).
- Un procédé batch à basse température ( $T < 160^{\circ}\text{C}$ ) pour des charges en solides élevées (concentration en substrat de 10-40% en poids).

L'acide dilué est mélangé avec le matériau lignocellulosique et le mélange est maintenu à la température appropriée pour de courtes périodes de temps allant jusqu'à quelques minutes [10]. L'hydrolyse des hémicelluloses se produit alors, libérant des sucres monomères et des oligomères solubles des parois cellulaires. L'élimination des hémicelluloses augmente la porosité et accroît la digestibilité enzymatique [10].

Le prétraitement offre une bonne performance en termes de récupération des sucres issus des hémicelluloses mais à certaines importantes limitations parmi lesquelles la corrosion qui demande un matériel adapté de construction souvent onéreux [9,11]. L'acide doit être neutralisé avant que les sucres ne soient pas amenés à la fermentation. De plus, la formation de produits de dégradation et de la libération d'inhibiteurs (furfural et hydroxyméthylfurfural) de la fermentation sont parmi les inconvénients du prétraitement acide [9,11].

#### **I.3.1.2 Hydrolyse à l'acide concentré**

Les acides concentrés (principalement acide sulfurique et acide chlorhydrique) ont aussi été employés pour traiter les matériaux lignocellulosiques, car ce sont des agents puissants d'hydrolyse de la cellulose sans la nécessité d'utilisation d'enzyme après l'hydrolyse acide [12]. Cependant, les acides concentrés sont toxiques, corrosifs, dangereux et requièrent des réacteurs qui résistent à la corrosion. De plus, l'acide concentré doit être récupéré après hydrolyse, pour rendre le procédé économiquement viable. Les avantages de l'hydrolyse à l'acide concentré sont la flexibilité en termes de choix des matières premières, un haut rendement en sucre monomère, ainsi que des conditions de température douce [12].

### **I.3.2 Hydrolyse par Ultrasons**

Par définition, les ultrasons sont des ondes énergétiques dont la fréquence se situe généralement entre 20 kHz et 1 MHz, ce qui est bien supérieur aux fréquences audibles par l'œil humaine. Cette gamme de fréquences est divisée en sous catégories : les basses fréquences (20 à 100 kHz) et les hautes fréquences (100 à 1000 kHz) [13].

La propagation des ultrasons à travers un fluide se fait via de cycles de compression et décompression. Les molécules présentes dans le milieu (l'eau est le milieu le plus couramment utilisé) sont déplacées de leur position normale jusqu'à provoquer la formation de bulle lorsque suffisamment d'énergie est apportée au milieu. Ces bulles sont appelées bulles de cavitation ultrasoniques et sont la base de tous les effets visibles et mesurables des ultrasons [14].

### **I.3.3 Hydrolyse enzymatique**

L'hydrolyse enzymatique des polysaccharides est la transformation biochimique de la cellulose et des hémicelluloses en sucres simples par des enzymes sécrétées par des microorganismes (bactéries et champignons) [15]. Des enzymes hautement spécifiques favorisent à 100% la transformation de la cellulose en glucose sans formation de produits indésirables (inhibiteurs), ce qui rend ce procédé très attractif par rapport à l'hydrolyse chimique [15]. De plus, les travaux de recherche ont montré que l'hydrolyse enzymatique n'entraîne pas de problème de corrosion des installations [16,17,18].

### **I.3.4 Hydrolyse et fermentation séparée (HSF)**

Dans ce procédé, les réactions d'hydrolyse et de fermentation sont effectuées dans deux réacteurs distincts et en deux temps [19]. Ce procédé a l'avantage de proposer des conditions optimales de travail pour l'hydrolyse et pour la fermentation. En effet, les températures optimales pour les deux étapes sont différentes, elle est de 45 à 50°C pour la cellulase (hydrolyse) et de 30 à 37°C pour les microorganismes qui produisent l'éthanol (fermentation) [19]. Mais ce procédé présente aussi des inconvénients, comme, l'inhibition de la cellulose par la cellulase et le glucose [19,20].

### **I.4 Saccharification et Fermentation Simultanée (SSF)**

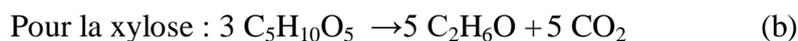
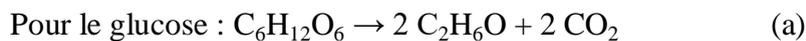
Ce procédé est le plus utilisé. Il consiste à effectuer les deux étapes d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, dans un même réacteur et en même temps. Il

présente plusieurs avantages, coûts d'investissement moindre par rapport au précédent présenté (un seul réacteur), les sucres sont fermentés immédiatement après leur production, les risques d'inhibition des enzymes par les produits terminaux d'hydrolyse (glucose et cellobiose) ainsi que les risques de contamination sont donc réduits [21].

L'Hydrolyse et la Fermentation Séparée (HSF) et Saccharification et Fermentation Simultanée (SSF) sont les deux configurations principales des procédés pour la production de bioéthanol à partir de la biomasse lignocellulosique. Globalement, le procédé de saccharification et fermentation simultanée est réputé être meilleur que le procédé d'hydrolyse et fermentation séparé tant pour le rendement que pour la concentration en éthanol obtenue. En 2014, Kim, R. S. et al. [22] ont aussi comparé ces deux procédés en utilisant deux substrats différents et ont conclu que quels que soient les conditions et le substrat, le rendement en éthanol est meilleur pour le procédé SSF par rapport au procédé HSF.

### **I.5 La fermentation**

La fermentation est un processus biologique catalysé par des enzymes sécrétées par des microorganismes qui transforment les sucres simples en molécules plus petites telles que les acides et alcools [23]. La fermentation en éthanol des deux sucres les plus répandus se fait selon les deux réactions suivantes :



Il existe un grand nombre de bactéries et de levures qui sont capables de fermenter ces sucres qui sont nécessaires à leurs métabolismes et leur reproduction. *Saccharomyces cerevisiae* et *Zymomonas mobilis* sont les deux espèces actuellement utilisées à l'échelle industrielle pour la production d'éthanol [23].

*Saccharomyces cerevisiae* est l'espèce la plus utilisée et étudiée pour la production du bioéthanol, car elle est adaptée à la fermentation du glucose issu de l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique. Cependant, elle n'est pas capable de fermenter les pentoses issus de l'hydrolyse des hémicelluloses, leur fermentation nécessite donc d'autres microorganismes fermentaires [23]. D'autre part, des paramètres physicochimiques tels que le pH et la température influent sur la fermentation [24]. Ainsi, la température optimale de production d'éthanol pour *Saccharomyces cerevisiae* est de 33°C [25], à un pH situé entre 4,0 et 4,8 [26].

## **CHAPITRE II**

### **GENERALITES SUR LES BIOENERGIES**

Les bioénergies peuvent jouer un rôle important et constructif dans la réalisation de développement durable et aussi font partie d'une bio économie plus vaste[27]. Pour réduire les émissions de gaz à effet de serre et notre dépendance au pétrole, il est impératif de trouver une énergie alternative. Les biocarburants sont une solution déjà utilisée mais qui doit encore évoluer [28]. On distingue deux types de bioénergies qui sont :

#### **II.1 Biogaz**

C'est un mélange de méthane combustible et de gaz carbonique ; il est issu de la fermentation anaérobie de la matière organique contenue dans les déchets. Le biogaz peut être produit spontanément, dans des conditions naturelles (décharges d'ordures ménagères) ou bien, dans des installations spécifiques appelées digesteurs [29].

#### **II.2 Biocarburant**

C'est un combustible liquide ou gazeux utilisé pour le transport et produit à partir de biomasse. [27]. Les biocarburants peuvent être divisés en deux groupes :

#### **II.3 Biodiesel**

Le biodiesel représente 27% des biocarburants dans le monde, mais plus de 77% en Europe, où il s'est fortement développé [30]. Le biodiesel est produit à partir d'huile de friture utilisée (triglycérides) par une réaction chimique de transestérification avec un alcool (méthanol ou éthanol) et en présence d'un catalyseur (hydroxyde de sodium ou de potassium) [31].

Le tableau suivant regroupe les différentes générations de biocarburants et les procédés de transformation pour chaque génération.

Tableau II.1. Différentes générations de biocarburants et les procédés de transformation pour chaque génération [32].

Génération	Première génération	Deuxième Génération	Troisième génération
Origine des substrats	grains de blé, colza, tournesol	déchets organiques, (les dattes, la betterave sucrière...)	micro algues
Procédés mis en œuvre	fermentation, tans-estérification	gazéification, hydrolyse enzymatique, méthanisation	méthanisation, gazéification, fermentation
Produit final	bioéthanol, biodiesel	bio méthane, bioéthanol, biodiesel, bio hydrogène	bio méthane, bioéthanol, biodiesel,
Rendement énergétique mtep/ha/an	1 à 4	3,5 à 5	20 à 40
Stade de maturité technologique	Industriel	industrialisation à court terme	recherche pilote

#### **II.4 Bioéthanol**

Le bioéthanol, est une ressource renouvelable issue d'une biomasse, considérée comme une alternative aux combustibles fossiles qui s'épuisent. La production traditionnelle de bioéthanol provient principalement de sucre. Cependant, cela entraîne une concurrence entre les sources d'énergie alimentaire et la biomasse. Par conséquent, les matériaux lignocellulosiques sont progressivement considérés comme des ressources renouvelables plus attrayantes pour la production d'éthanol en raison de leur disponibilité et de leur coût relativement faible [33]. Le bioéthanol est produit par fermentation du sucre provenant des cultures sucrières (canne à sucre, betteraves, blé), ou provenant des cultures contenant de l'amidon (graines).

Le Tableau II.2 exprime quelques caractéristiques physico-chimiques de l'éthanol.

Tableau II.2 : Propriétés physico-chimiques de l'éthanol [34].

Paramètre	Unité	Bioéthanol
Formule	/	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O
Masse moléculaire	g/mol	46,069
Apparence	/	Liquide incolore
Densité	kg/litre	0,79
Indice d'octane (RON)	/	102-103
Indice d'octane (MON)	/	89-96
Chaleur latente de vaporization	kJ/kg	842-930
Pression de vapeur	kPa	15-17
Température d'allumage	°C	420
Température de fusion	°C	-144,4
Température de vaporization	°C	78,4
Point d'éclair	°C	12,8
Solubilité dans l'eau	% en volume	100

#### **II.4.1 Générations de bioéthanol**

La production de bioéthanol à base de la biomasse est plus durable et largement distribuée. À l'heure actuelle, il existe trois générations de bioéthanol qui ont été fondées sur différentes matières premières [35].

##### **II.4.1.1 Bioéthanol de première génération**

Le bioéthanol de première génération est obtenu par fermentation alcoolique de sucres fermentescibles (glucose, saccharose, etc.) [35]. Ces sucres sont soit directement présents dans la plante (canne à sucre, betterave sucrière), soit obtenus après hydrolyse enzymatique de l'amidon contenu dans les grains de blé ou de maïs [36]. Cependant, le principal inconvénient du bioéthanol de première génération est la menace de limitation de l'approvisionnement alimentaire qui peut affecter la population mondiale humaine car les matières premières sont dérivées de sources alimentaires. En outre, l'utilisation des ressources alimentaires pour le carburant peut entraîner une augmentation des prix des denrées alimentaires. D'un autre côté, il est important de préciser que la première génération de bioéthanol est économiquement déraisonnable, car les teneurs en carbone des plantes sont principalement perdues au cours du processus de conversion [37].

### **II.4.1.2 Bioéthanol de deuxième génération**

La production d'éthanol cellulosique fait actuellement l'objet de nombreuses recherches. Elle reste une voie d'avenir due à la disponibilité de la matière première, ainsi que la possibilité de fermenter l'ensemble de la plante simultanément [38]. En effet, les sucres contenus dans les plantes peuvent être transformés par des microorganismes en différents composés comme l'acide lactique, l'acide succinique, le dioxyde de carbone ou encore de l'éthanol. Aujourd'hui le micro-organisme le plus utilisé est une espèce de levures, *Saccharomyces cerevisiae*, à la fois pour ses performances fermentaires mais aussi pour sa valorisation en tant que coproduit [37].

#### **II.4.1.2.1 Bioéthanol issus des résidus agricoles**

Les résidus de biomasse agricole est une source qui nécessite beaucoup d'énergie pour le prétraitement, ce qui fait que cette source soit onéreuse [39]. Le Tableau II.3 décrit la principale biomasse agricole (UE) dont les résidus peuvent être valorisés en bioénergies.

Tableau II.3 : Évolution des rendements des ressources agricoles [39].

t/ha	2010	2020	2030	2040	2050
Betterave	96,0	101,7	107,3	113,0	118,6
Grains de maïs	9,3	10,4	11,6	12,8	14
Blé tendre	7,5	7,7	8	8,2	8,4
Triticale	5,2	5,7	6,1	6,6	7
Colza	3,3	3,5	3,7	3,8	4
Switchgrass	12	12	12	12	12
Miscanthus	14	14	14	14	14

#### **II.4.1.2.2 Bioéthanol de la deuxième génération à partir de la biomasse lignocellulosique**

L'éthanol peut aussi être produit à partir de la matière lignocellulosique, comme le bois, la paille, les herbacées, etc. Contrairement à l'amidon ou au saccharose qui servent de réserves d'énergie pour la plante en vue d'une utilisation ultérieure, la matière lignocellulosique sert de structure pour les plantes [37]. Elle est le constituant principal de la paroi cellulaire des plantes. Elle est aussi la source de carbone renouvelable la plus abondante de la planète [40]. Il s'agit donc d'une matière stable et résistante aux

agents extérieurs et donc plus difficile à dégrader [40].

Comme pour l'amidon, la cellulose et les hémicelluloses doivent être hydrolysées avant utilisation. Les procédés d'hydrolyse ressemblent à ceux employés pour l'amidon, ils emploient soit un traitement acide ou ultrasonique, soit un traitement enzymatique. Le premier est certes peu coûteux, mais il produit des inhibiteurs de fermentation et a un faible rendement d'hydrolyse. Le traitement enzymatique à l'inverse, est onéreux à cause du coût de l'enzyme mais il est performant et ne produit pas d'inhibiteurs [37]. Les méthodes de prétraitement répondant à ces objectifs sont le prétraitement à l'acide dilué, l'explosion à la vapeur et la thermo-hydrolyse puisqu'elles permettent de satisfaire les objectifs fixés tout en minimisant la formation de composés de dégradation des sucres. Des recherches doivent encore porter sur l'amélioration de l'activité des enzymes, les cellulases, afin de réduire le coût de l'hydrolyse enzymatique. Un autre procédé concerne la fermentation alcoolique des pentoses qui n'est toujours pas vraiment applicable à l'échelle industrielle. Ce dernier point impose de développer de nouvelles souches capables de démontrer des performances voisines de celles démontrées sur glucose par « *Saccharomyces cerevisiae* » [41].

#### **II.4.1.3 Bioéthanol de troisième génération**

Les algues sont considérées comme la 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 de facteurs tels que la technologie et l'environnement marin[42].

#### **II.4.2 Avantages et les inconvénients du bioéthanol**

Le bioéthanol présente de nombreuses dualités, sa formule chimique étant  $C_2H_5OH$ , il est qualifié de carburant oxygéné, il peut améliorer, dans le cas d'un mélange, les performances de l'essence en diminuant les problèmes de combustion à hauts régimes. L'oxygène contenu dans l'éthanol améliore la combustion du carburant, en diminuant la production de monoxyde de carbone, les quantités d'hydrocarbures non brûlés qui participent à la formation de l'ozone dans les couches inférieures de l'atmosphère et les particules émises responsables de nombreux troubles respiratoires et du noircissement des bâtiments [37].

Le tableau II.4 exprime quelques avantages et inconvénients du bioéthanol.

Tableau II.4 : Avantages et inconvénients du bioéthanol [37].

Avantages	Inconvénients
Diminution des émissions de dioxyde de carbone et meilleur rendement énergétique des moteurs à explosion	Les véhicules utilisant l'E85 produisent des émissions plus élevées d'oxyde d'azote, d'éthylène et d'acétaldéhyde que les véhicules à essence
Indice d'octane élevé permettant une meilleure efficacité des moteurs à explosions	Indice d'octane faible ne permettant pas son utilisation dans les moteurs à combustion interne sans l'ajout d'un accélérateur d'ignition
Diminution des émissions de particules, de soufre, de benzène et de butadiène 1-3	Augmentation des émissions d'hydrocarbures par évaporation nécessitant un réglage de la pression de vapeur du carburant
Risque moins élevé de formation d'ozone que l'essence et le diesel	Emission d'acide acétique en cas de réaction entre le catalyseur et le carburant résiduel à l'échappement
Biodégradable	Corrosion des pièces en contact avec l'éthanol
Capacité énergétique inférieure à celle de l'essence (21285 kJ kg <sup>-1</sup> pour l'éthanol contre 32020 kJ kg <sup>-1</sup> pour l'essence)	Augmentation de la consommation volumique de carburant
Diminution de la dépendance au pays producteurs de pétrole	Prix encore élevé
Stimulation du milieu rural	Concurrence entre alimentation et énergie

### **II.4.3 Domaines d'utilisation du bioéthanol**

Le bioéthanol peut être utilisé, sous certaines conditions, comme carburant dans les moteurs à essence, soit de 5 à 20% dans les moteurs à essence sans modification et/ou de 85 à 100% dans des moteurs à essence spécifiquement adaptés. En outre, l'éthanol peut être converti en divers produits de base de l'industrie chimique tels que, l'éthylène, l'éther et l'éthyle tertio butyle (ETBE), conventionnellement, produits à partir du pétrole (Figure II.1).

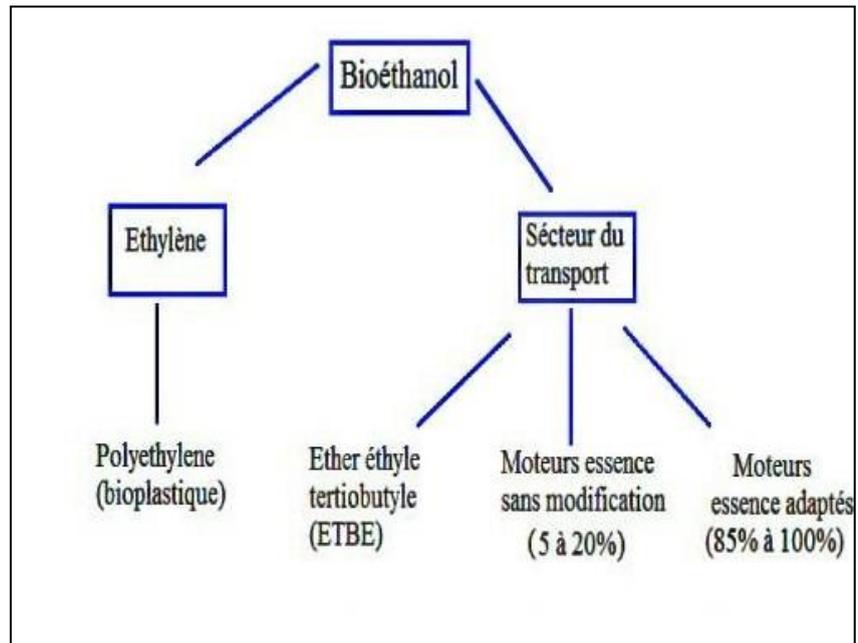


Figure II.1 : Utilisation potentielle du bioéthanol [43].

Il est à signaler que le plastique résulte de la polymérisation de l'éthylène et de l'ETBE mélangé à raison de 15% à l'essence, permet d'augmenter l'indice d'octane du carburant, contrairement à l'éthanol, il ne favorise pas l'évaporation des carburants et n'absorbe pas l'humidité de l'air [43].

## **II.4.4 Production de bioéthanol**

### **II.4.4.1 Production de bioéthanol à l'échelle mondiale**

Actuellement, les plus grands producteurs mondiaux de bioéthanol se concentrent dans trois régions. En tête : les Etats Unis avec une part de 56% de la production mondiale de biocarburants (bioéthanol) ; le Brésil avec 28% ; l'Union Européenne avec 5% (2018). Ces trois régions produisent, à elles seules, plus de 89 % de la production mondiale des biocarburants (Figure 2.2) [44].

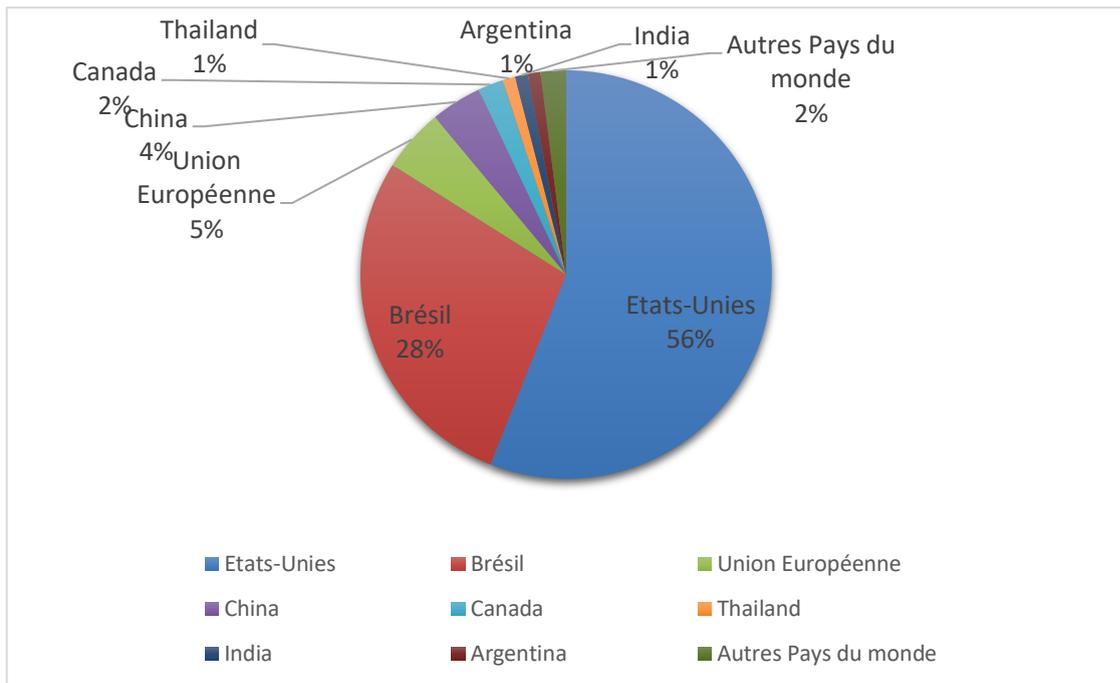


Figure II.2 : production mondiale de bioéthanol (2018) [43].

#### **II.4.4.2 Production de bioéthanol à l'échelle nationale**

Aujourd'hui, des programmes industriels intégrés ont été développés par des pays américains et européens pour la production de l'éthanol à partir de la biomasse végétale. L'Algérie, qui, possédant un potentiel considérable en déchets et sous-produits de dattes pourrait lancer un tel programme pour la production de l'éthanol. En effet, la production d'éthanol à partir des déchets de dattes constitue une solution intéressante sur le plan économique. Cet alcool peut remplacer avantageusement celui obtenu par voie chimique à partir des produits pétroliers et peut remplacer le pétrole léger comme carburant [45]. En outre, l'intérêt de produire de l'éthanol vient du fait que c'est une substance énergétique et son utilisation couvre un champ étendu d'activités industrielles: fabrication d'intermédiaires chimiques (produits de beauté, parfums, cosmétiques, produits pharmaceutiques, de solvants, de détergents, etc. Enfin, il est utile de signaler, selon la Régie des Alcools, que notre pays importe entre 30 000 et 50 000 hectolitres d'alcool éthylique par an afin de couvrir ses différents besoins. En considérant les conditions climatiques, la disponibilité de la matière première, les exigences technologiques et la demande nationale en alcool, un programme expérimental au niveau des laboratoires et à l'échelle pilote a été entrepris et les résultats obtenus ont démontré la faisabilité du procédé aussi bien sur le plan technique qu'économique [45].

## CHAPITRE III

### MATERIELS ET METHODES

L'objectif de ce travail consiste à valoriser énergétiquement un déchet organique issu d'une biomasse lignocellulosique dans le but de la production du bioéthanol de deuxième génération.

#### **III.1 Matière première**

La biomasse utilisée lors de cette étude est composée uniquement des écorces de *Punica granatum* (grenade)(figure III 1), L'espèce a été récoltée en automne 2018. Les écorces ont été séchées à l'air ambiant, ensuite ils ont été broyé à l'aide d'un broyeur électrique puis tamiser à une taille de 0,8  $\mu\text{m}$  afin d'obtenir des particules de tailles relativement moyennes. Finalement la matière a été stockée dans une température de 4°C.



Figure III 1 : les écorces de grenade broyée et tamiser.

#### **III.2 Réactifs**

Les réactifs utilisés dans le procédé de la production du bioéthanol sont représentés dans le tableau suivant

Tableau III.1 : Réactifs utilisés

Réactifs	Origine
NaOH	Panreac, Espagne
méthanol	Sigma Aldrich, France
Chloroforme	Biochem, France
Phénol	Sigma Aldrich, France
Tartrate de sodium et de Potassium	Panreac, Espagne
Ethanol 96 %	Panreac, Espagne
Acétone	Prolabo ,USA
Acideacétique	Sigma Aldrich, France
Toluène	Panreac, Espagne
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Biochem, France
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Prolabo, USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Biochem, France
CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich, France
Cellulase	Sigma Aldrich, France
Hémicellulase	Sigma Aldrich, France
Extrait de levure	Biochem, France
Extrait de malt	Biochem, France
Levure <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	Saf-instant (Lesaffre)
D(+) glucose	TM Media India
Acide 3,5-dinitrosalicylique	Panerac, Espagne
Dichromate de potassium K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Biochem, France

### **III.3 Caractérisation de la matière première**

#### **III.3.1 Taux d'humidité**

Le Taux d'humidité correspond à la quantité d'eau perdue par une substance, lors d'un chauffage à une température de 105°C pendant certain temps. Il s'exprime généralement en pourcentage pondéral. Il a été déterminé selon la norme (NF M 03-002) [46].

#### **Mode opératoire**

Une masse de 5g ( $m_0$ ), de la biomasse a été introduite dans un verre de montre, ensuite placé dans une étuve à 105 °C jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Le taux d'humidité est donné par la relation suivante:

$$H(\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_1} \times 100$$

Avec:

$m_0$  : masse initial de la biomasse (g) ;

$m_1$  : masse final de la biomasse (g).

#### **III.3.2 Taux de cendre**

Le taux de cendres est une indication de la teneur de la matière organique qui rentre dans la composition de déchet organique. Le taux de cendre a été déterminé selon la norme (NF M 03-002) [46].

#### **Mode opératoire**

Une masse de 5g de déchet est séchée dans l'étuve pendant 12 heures puis placé dans un creuset en céramique. Ce creuset est mis par la suite dans un four réglé à 550°C pendant 45 min. Une fois la carbonisation est terminée, le creuset est ensuite retiré du four, refroidi à l'air libre puis pesé. Le taux de cendre est calculé par la formule suivante:

$$C(\%) = \frac{p_0 - p_1}{p_0} \times 100 \quad (\text{Eq2})$$

Avec :

$P_0$  : Le poids du creuset remplis avant carbonisation en(g).

$P_1$  : Le poids du creuset remplis après carbonisation en(g).

### **III.3.3 Teneur de la cellulose et de l'hémicellulose**

Ce procédé permet de déterminer la quantité de cellulose et de l'hémicellulose dans la biomasse.

#### **Mode opératoire**

Dans un bécher de 500 ml, une masse de 5 g de la matière sèche a été introduite dans un volume de 100 ml d'une solution de l'hydroxyde sodium NaOH (4%), Ensuite le mélange a été ensuite agité pendant 14 heures. Après filtration, le filtrat obtenu a été récupéré et noté (filtrat 1). L'opération a été répétée une deuxième fois sur le résidu obtenu et le filtrat récupéré a été noté (filtrat 2). Après cette deuxième opération, le résidu a été rincé avec de l'eau distillée quatre fois, et avec l'acétone une seule fois, ensuite il a été séché dans une étuve à une température de 60°C pendant une nuit. La masse obtenue représente la teneur en cellulose dans 5 g de la matière sèche.

Les deux filtrats (1 et 2) obtenus précédemment ont été neutralisés par l'acide acétique concentré, puis mélangés avec de l'éthanol avec un rapport de 1/3(v/v) et laissé pendant une nuit. La solution obtenue est placée dans la centrifugeuse pendant 30 min à une vitesse d'agitation de 10000 tr/min. Le précipité obtenu a été rincé avec de l'eau distillée quatre fois et avec l'acétone une seule fois. Après, il a été séché dans une étuve à une température de 60°C pendant une nuit. La masse obtenue est la teneur en hémicellulose dans 5 g de la matière sèche [47].

### **III.3.4 Teneur de la lignine**

Ce procédé permet de déterminer le taux de la lignine dans la biomasse. il est possible de réaliser l'extraction de la lignine par la méthode de Klason qui repose sur deux étapes essentielles, extraction des extractibles au soxhlet suivi d'un traitement par l'acide sulfurique. [48]

#### **Mode opératoire**

Une masse de 20 g de la matière sèche a été traitée avec un mélange de l'ordre de 66,7 % de toluène et 33,3 % d'éthanol. La durée de cette étape nécessite un temps minimal de quatre heures avec un procédé à reflux en continu. Les solvants solubilisent les extractibles contenus dans la matière organique et ceux-ci sont finalement concentrés dans le ballon de récupération. Le résidu récupéré a été séché à l'étuve à une température constante [48], puis il a été traité par l'acide sulfurique 72% avec un volume de 20 ml sous agitation constante, afin de séparer l'hémicellulose de la lignine. A la fin une solution gélatineuse de couleur noire a été obtenue. Ensuite, la réaction a été complétée par un

chauffage à reflux pendant quatre heures avec de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) dilué à 3% [48]. Après filtration de la solution, le résidu a été lavé par de l'eau chaude jusqu'à neutralisation, puis placé dans une étuve à 60°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. A la fin, la masse finale obtenue est pesée pour déterminer le taux en la lignine [48].

### **III.3.5 Teneur en lipides**

Ce procédé permet de déterminer la teneur en lipides dans la biomasse.

#### **Mode opératoire**

Une masse de 20 g de matière sèche a été traitée avec un mélange de (chloroforme, méthanol et d'eau), avec des rapports de (1: 2: 0,8)(v/v), puis placé sous agitation à 250tr/min pendant 24 heures. La solution par la suite a été mise dans une ampoule à décanter pour séparer le chloroforme du méthanol. La solution de chloroforme récupérée a été évaporée à 60°C. A la fin, la masse de l'extrait obtenue a été pesée pour déterminer la teneur en lipides. [49]

### **III.3.6 Teneur en protéines**

Le taux des protéines a été déterminé par la méthode de kjeldahl, qui est basée sur le taux de l'azote total présent dans l'échantillon, le matériel essentiel utilisé est le matras de Kjeldahl ainsi que les deux unités de minéralisation avec système de récupération de fumées et l'unité d'entraînement à la vapeur. Durant ce procédé, deux acides ont été utilisés (acide Sulfurique et Borique) avec l'ajout de l'hydroxyde de sodium et un catalyseur de minéralisation. [50]

#### **Mode opératoire**

##### **Minéralisation**

Une masse de 1g a été introduite dans 100 ml d'échantillon dans un matras Kjeldahl. Avec 1 g de catalyseur et 10 ml d'acide sulfurique concentré, le mélange a été placé dans un bloc de minéralisation sous un système d'extraction. Puis il a été laissé jusqu'à ébullition et évaporation lors d'apparition des fumées blanches. [50]

##### **Distillation**

Le matras Kjeldahl a été placé dans système d'entraînement à la vapeur avec 50 ml d'hydroxyde de sodium à 400 g/L. Pour recueillir le distillat, un erlenmeyer de 250 ml contenant 10 ml d'acide borique à 10 g/L a été placé à la sortie de l'appareillage.[50]

## **Dosage**

Dans l'erenmeyer où il a été recueilli le distillat, 2 à 3 gouttes de l'indicateur mixte on été ajoutés, puis titrer avec une solution d'acide sulfurique à 0,05 mol/L.

Le taux des protéines a été déterminé en multipliant le taux de l'azote total par 6,25. [50]

## **III.4 Production du bioéthanol**

La production de bioéthanol a été réalisée en adoptant différents prétraitement de la biomasse étudiée selon les étapes suivantes :

### **III.4.1 Prétraitement**

Deux méthodes différentes de prétraitement ont été effectuées séparément : le traitement par l'acide dilué et le traitement assisté aux ondes ultrasoniques.

#### **III.4.1.1 Hydrolyse acide diluée**

Dans cette étape, une masse de 50g d'écorces de *Punica granatum* (grenade) a été rincée préalablement et introduite dans une solution de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) (0,5M). Ensuite, la solution a été placée dans un Montage à reflux à une température de 130 ° C pendant 60 min. Après refroidissement à l'air libre pendant 15 minutes, la solution a été rincée avec de l'eau trois fois et par l'eau distillée deux fois, ensuite le substrat a été récupéré par filtration [51,52], suivi par une étape de saccharification et fermentation simultanée (SSF).

#### **III.4.1.2 Prétraitement assisté aux ondes ultrasons**

Les écorces de *Punica granatum* (10% ( w/v)) a été traité avec les ondes ultrasonores en utilisant un sonificateur de type (VCX 750, Sonics and material Inc,USA) avec une puissance de 750W et une fréquence de 20kHz sous les conditions opératoires réglées suivantes : amplitude (30%), température (30 °C), temps ( 5,10, 12 et 15 min)[53].

### **III.4.2 Correction du pH**

Après l'étape du prétraitement, le pH a été corrigé avec une solution de NaOH (1M) jusqu'à atteindre un pH égale à 4,8 afin d'éliminer les inhibiteurs de la fermentation comme le furfural et l'hydroxyméthylfurfural. [54]

### III.4.3 Saccharification et Fermentation Simultanée(SSF)

Les deux étapes d'hydrolyse enzymatique et de la fermentation ont été effectuées en une seule fois dans un réacteur stérilisé. Deux enzymes ont été utilisés à la fois dans cette étape : la cellulase et l'hémicellulase avec un rapport de 0,42%. Une souche industrielle de *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée dans cette étape, cultivée dans des boîtes de pétri à une température de 35°C pendant 48 heures, utilisant un milieu de culture contenant : 0,6% d'extrait de levure, 0,6% extrait de malt, 1% de peptone, 4% d'Agar-Agar et 2% de glucose. Après 48 heures. Une boule d'une boîte de pétri a été transférer dans un milieu de fermentation composé de : 0,5 g extrait de levure, 20 g extrait de malt, 2g ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 6g de  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,5 g de  $KH_2PO_4$  et 0,1g  $CaCl_2$  cultivé sous agitation de 150 tr/min pendant une durée de 18 heures. Cette dernière solution a été transférer dans le réacteur stérile pour effectuer la saccharification et la fermentation simultanée réalisée sous les conditions opératoires suivantes : une température de 37°C, un pH de 4,8 et une vitesse d'agitation de 250 tr/min pendant une durée de 48 heures [55,56].

Les paramètres suivis au cours de la fermentation sont:

- Le pH
- La teneur des sucres totaux.
- La teneur des sucres réducteurs.
- La concentration de l'éthanol.

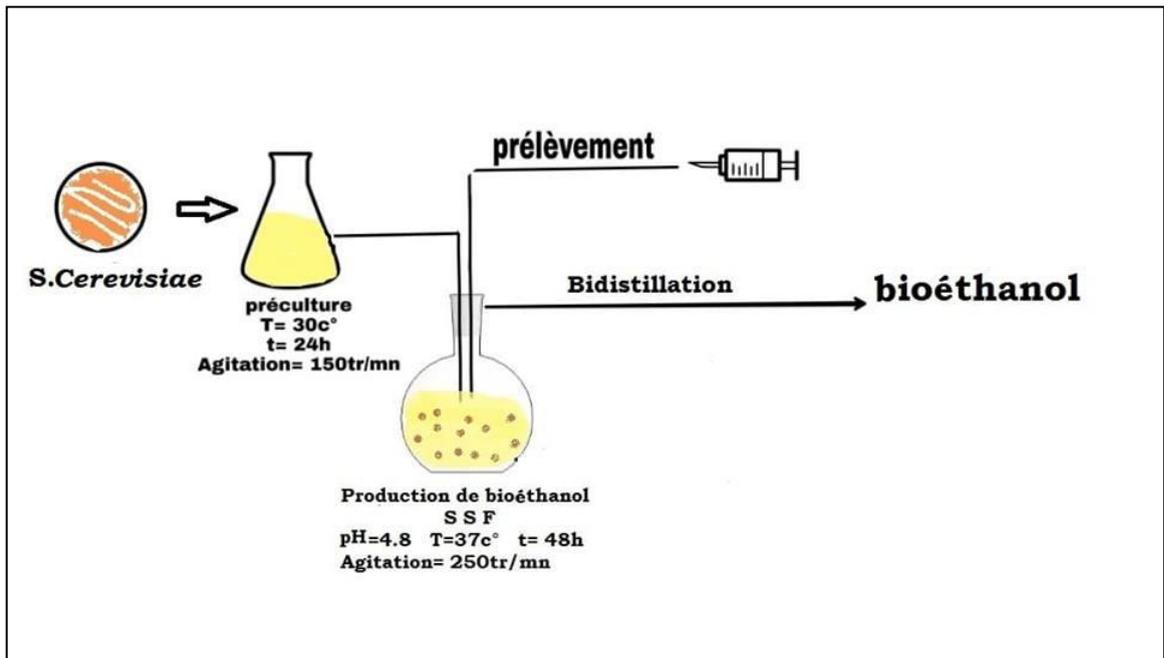


Figure III.2 : Schéma descriptive de la production du bioéthanol par SSF.

### **III.4.3.1 Mesure du pH**

La détermination du pH est essentielle pour le contrôle du milieu, avant et au cours de la fermentation. Sa variation montre l'activité métabolique de la levure au cours de la transformation des sucres en éthanol.

#### **Mode opératoire**

Le pH a été mesuré par une lecture directe de la valeur indiquée sur le pH-mètre de la marque (HANNA HI 2210) après chaque prélèvement au cours de la fermentation. Un volume de 20 ml du milieu de fermentation a été prélevé, ensuite centrifugé à une vitesse de 10000tr/min pendant 15 min afin de séparer la phase liquide de la phase solide.

### **III.4.3.2 Mesure des sucres totaux par la méthode de Dubois**

La méthode de Dubois peut détecter les quantités des sucres totaux dans le milieu réactionnel au cours de la fermentation.

#### **Principe**

En effet, en milieu acide et à chaud, les oses neutres donnent des dérivés du furfural (l'hydroxyméthylfurfural dans le cas d'un hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose), ces dérivés se condensent avec le phénol pour donner un complexe de couleur jaune brun. Les termes « Sucres totaux » ou « oses neutres » sont utilisés pour désigner les monosaccharides neutres entrant dans la composition des polysaccharides. La couleur varie selon le taux des sucres totaux présentés dans le milieu de réaction. L'absorbance est lue à la longueur d'onde 490 nm par un spectrophotomètre [57,58].

#### **Mode opératoire**

Dans une série de tube à essai, un volume de 0.5 ml de milieu de fermentation a été introduit après chaque prélèvement. Un volume de 0.5 ml de phénol 5% a été rajoutée, ensuite 2.5 ml d'acide sulfurique concentré a été rajoutée aussi. Les tubes ont été laissés au repos pendant 10 minutes, ensuite ils ont été placés dans un bain-marie à une température de 30°C pendant 20 minutes. Enfin les tubes ont été agités pendant 10 à 20 min. L'absorbance est lue à la longueur d'onde 490 nm par un spectrophotomètre UV de type (HITACHI U5100, Japon).

### **III.4.3.3 Mesure des sucres réducteurs par la méthode de Miller**

La méthode de Miller peut détecter les quantités des sucres réducteurs (glucose) dans le milieu réactionnel au cours de la fermentation.

## Principe

On utilise les propriétés réductrices du glucose. À chaud et en milieu alcalin, il y a réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique ou DNSA (aussi appelé acide 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoïque) qui joue le rôle d'oxydant, le glucose étant le réducteur. L'acide 3-amino-5-nitrosalicylique est un composé rouge orange. L'absorbance est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre [59,60].

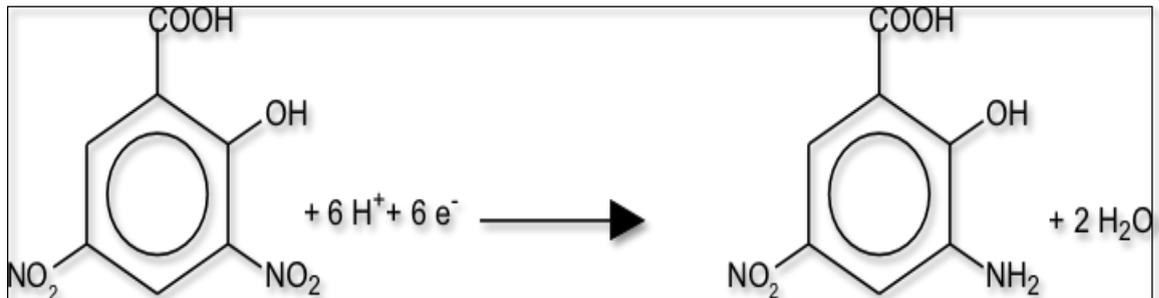


Figure III.3 : Réaction de réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide 3-amino-5-nitrosalicylique.

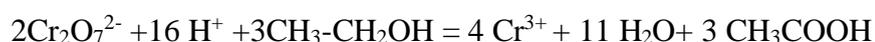
## Mode opératoire

Dans une série de tube à essai, un volume de 1 ml de milieu de fermentation a été introduit après chaque prélèvement. Par la suite un volume de 1 ml de réactif (DNSA) a été rajouté à cette solution. Les tubes sont chauffés dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes. Après chauffage, les tubes sont directement placés dans la glace fondante pour désactiver la réaction entre les sucres et le DNSA. L'absorbance est lue à la longueur d'onde de 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et la concentration a été déterminer à partir de la courbe d'étalonnage [59, 60].

### III.4.3.4 Mesure de la concentration de l'éthanol

#### Principe

Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation de l'éthanol en acide éthanoïque et la réduction des ions dichromate selon la formule suivante :



## Mode opératoire

Un volume de 1 ml dilué de chaque prélèvement a été mélangé avec 2 ml d'une solution de dichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ ) de concentration 0,115 M. Les tubes ont été agités et placés dans un bain mari bouillant en même temps pendant 10 min. Ils ont été refroidis immédiatement dans un bain d'eau glacée afin de stopper la réaction entre le dichromate et l'éthanol. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre [61].

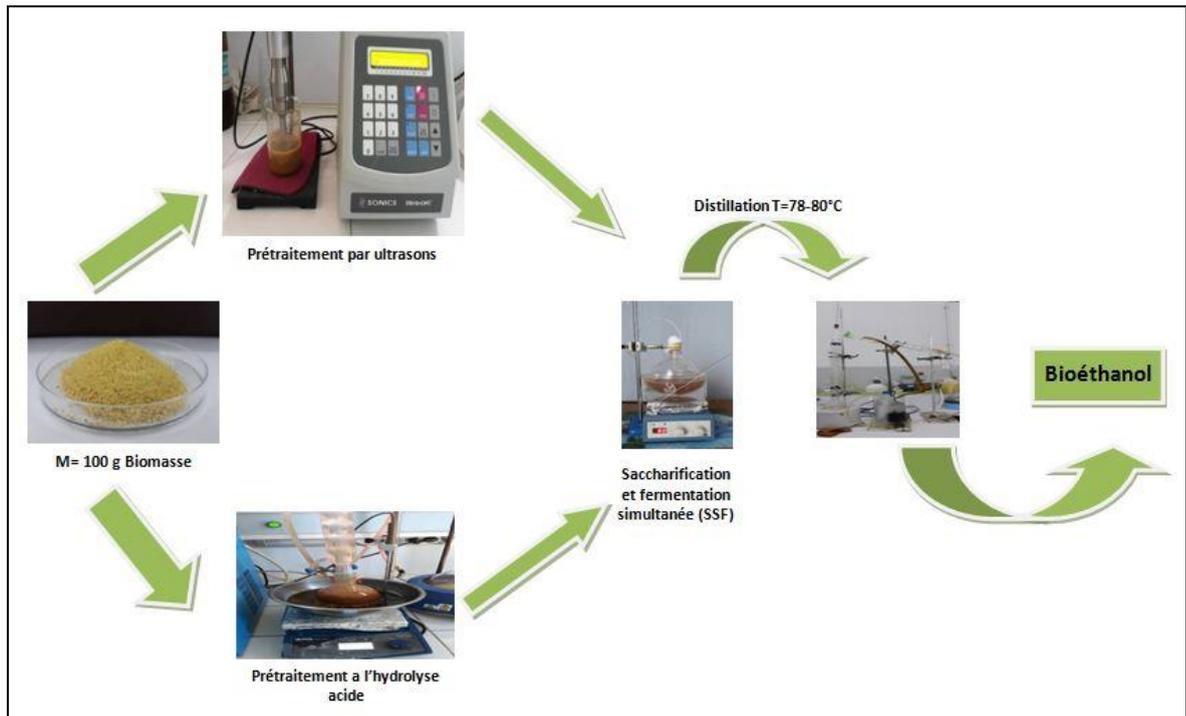


Figure III.4 : Schéma descriptive représente les étapes de la production de bioéthanol par l'hydrolyse acide et ultrason.

### III.4.4 Distillation

A la fin de la fermentation, l'éthanol est récupéré par deux distillations. La température de distillation a été comprise entre 78 à 80°C.

### III.4.5 Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformer de Fourier (FTIR)

#### Principe

L'analyse infrarouge à transformée de Fournier utilise un interféromètre (au lieu d'un monochromateur en spectroscopie infrarouge conventionnelle (dispersive)) qui enregistre la quantité d'énergie absorbée lorsque la fréquence de lumière infrarouge varie. Le signal obtenu est un interférogramme qui est transformé mathématiquement selon

Fourier de façon à obtenir un spectre identique à celui obtenu par une spectroscopie infrarouge conventionnelle. Cette technique à Transformée de Fourier est moins onéreuse et plus rapide [62].

### **Mode opératoire**

Les spectres ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre à transformée de Fourier de type Bruker. Le domaine spectral étudié s'étend de  $4000\text{cm}^{-1}$  à  $400\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de  $2\text{cm}^{-1}$ . Les échantillons ont été analysés sous forme poudre fines séchés et laissés préalablement à un dessiccateur jusqu'à l'analyse.

## **III.5 Caractérisation de bioéthanol**

### **III.5.1 Mesure de la densité et de la viscosité**

La densité de l'éthanol est le rapport de la masse volumique de cet éthanol par la masse volumique de l'eau. Cette mesure a été faite à l'aide d'un densimètre électronique de type (METTLER TOLEDO30PX). La viscosité a été mesurée par un rhéomètre de type (MCR 302, Anton Paar Physica, GmbH, Germany).

### **III.5.2 Analyse qualitative de bioéthanol par chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

L'analyse qualitative de bioéthanol a été réalisée à l'aide d'un Chromatographe de type "SHIMADZU GC-17A" muni d'un lecteur "SHIMADZU C-R8A". La colonne utilisée est de type OV17 capillaire et un détecteur FID. Les conditions opératoires maintenues sont : une pression de 54mPa, un débit de 12ml/min, température de l'injecteur 200°C, température de la colonne 85°C et la température détecteur 220°C.

### **III.5.3 Analyse quantitative du bioéthanol par densimètre**

Cette analyse permet de déterminer La concentration de bioéthanol (fraction massique et fraction molaire) à l'aide d'un densimètre électronique. La concentration a été mesurée dans le mélange eau-bioéthanol après bidistillation[63].

### **III.5.4 Détermination du rendement en éthanol**

Le rendement maximal théorique de l'éthanol a été calculé selon l'équation, comme elle est décrite par (Kim and Lee 2005)[64].

$$\text{Rendement maximal théorique de l'éthanol (\%)} = \frac{\text{Ethanol (g)}}{(\text{Sucres réducteurs initiaux (g)} * 0,511)} * 100$$

avec 0,0511, le rendement maximum théorique par unité de sucres.

La productivité de l'éthanol  $Q_p$  a été déterminée selon l'équation suivante décrite par (Evcan and Tari 2015)[65].

$$Q_p = \frac{\text{Ethanol } (\frac{g}{L})}{h}$$

Avec:

h : le temps (heures)

Le rendement en éthanol ( $Y_{P/S}$ ) a été déterminé selon l'équation suivante décrite par (Günan Yücel and Aksu 2015)[66].

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Ethanol max } (\frac{g}{L})}{\text{sucres réducteurs consommés } (\frac{g}{L})}$$

## CHAPITRE IV

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### **IV.1 Caractérisation de la biomasse étudiée**

Les résultats de la caractérisation de la biomasse sont représentés dans le tableau ci-dessus :

Tableau IV .1 : Les résultats de la caractérisation de la biomasse

Paramètre	C (g/100g) %
Humidité	12,5±3,3
Cendre	4,7±0,3
Cellulose	23,4±1,5
Hémicellulose	11,7±0,2
Lignine	19,2±2,0
Sucres totaux	25,0±0,0
Lipides	3,4±0,8
Protéines	3,1±0,0

Les résultats du tableau montrent que la cellulose présente la valeur la plus élevée comparativement à l'hémicellulose et la lignine. Ces valeurs sont proches de celles de (Hasnaoui et al 2014), et (Telakar et al. 2018).

Les lipides sont présentés avec des concentrations de 3,4%, proches de celles de (Telakar et al. 2018) 5,3%, par contre le taux des protéines est pratiquement le même de celle de (Rowayshed et al. 2013) [67,70].

#### **IV.2 Résultats du prétraitement par ultrasons**

Les sucres réducteurs ont été mesurés après chaque prétraitement par les ondes ultrasonores.

Le tableau suivant exprime le taux des sucres réducteurs après prétraitement.

Tableau IV.2 Concentration des sucres réducteurs après prétraitement

		Taille ( $\mu\text{m}$ )	
		0,6	0,8
Concentration g/L	Temps (minutes)		
	5	25,92	33,52
	10	36,32	37,72
	12	30,12	40,72
	15	48,92	51,92

Les résultats obtenus ont montrés qu'il y'a une libération importante des sucres réducteurs pour la biomasse de taille 0,8  $\mu\text{m}$  après une durée de 15 minutes [53].

### **IV.3 Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformer de Fourier**

L'analyse Infra-Rouge (IR-TF) a permis de révéler la présence des groupes fonctionnels caractéristiques de la biomasse lignocellulosique des écorces de grenade sans prétraitement, et avec prétraitement par hydrolyse acide diluée et soumises aux ondes ultrasonores. La bande ( $1900-4000\text{cm}^{-1}$ ) correspond aux vibrations d'élongation des bandes CH .

compris majoritairement deux pics d'intensité  $3549\text{ cm}^{-1}$ (HA) et  $3338\text{ cm}^{-1}$  (US) présentés par les groupements acides et alcools O-H et une bande de groupement C-H alkyl d'une intensité  $2921\text{ cm}^{-1}$ (HA) et  $2920\text{ cm}^{-1}$ (US). La région ( $1697-1026\text{ cm}^{-1}$ ) comprend la bande C-O d'une intensité  $1026\text{ cm}^{-1}$  de la cellulose, et  $1697\text{ cm}^{-1}$  présentée par la fonction cétone (C=O) des hémicelluloses libérés au cours du prétraitement. L'intensité de  $3188\text{ cm}^{-1}$  représente les liaisons OH libres et l'intensité maximale a eu une augmentation après le prétraitement indiquant que les liaisons entre la cellulose et les hémicelluloses et la cellulose et la lignine ont été perturbés ainsi que les liaisons OH sont devenus exposés sous forme d'état libre [70]

Les pics des zones ( $1800-900\text{ cm}^{-1}$ ) du prétraitement acide sont complexes et résultent de divers modes de vibration des glucides et de la lignine [70]. Le pic à  $1715\text{ cm}^{-1}$  représente les groupes ester acétyliques et uroniques reliés aux chaînes ramifiées de l'hémicellulose et a disparu après le prétraitement par l'acide [70].

Les attributions des fonctions observées en infrarouge sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau IV.3 : Groupements fonctionnelles présent dans les écorces de grenade avant et après prétraitement.

L'intensité (cm <sup>-1</sup> )	Liaison	Fonction
3549	O-H	Acide, alcool
3188,25	O-H	
2921,91	C-H	Alkyl, aliphatique
2110,49	C≡C	Alcynes
1697,87	C=O	Cétone
1616,16	C=C	Squelette aromatique
1509,62	C=O	Cétone
1445,89	O-CH <sub>3</sub>	Méthoxyl
1329,89	C=O	Cétone
1195,35	C-O	Alcool
1105,6	C-O	Alcool
1026,39	C-O	Ether
881,04	C-H	Hydrogène aromatique
753,44	C-H	
518,24	C-C	

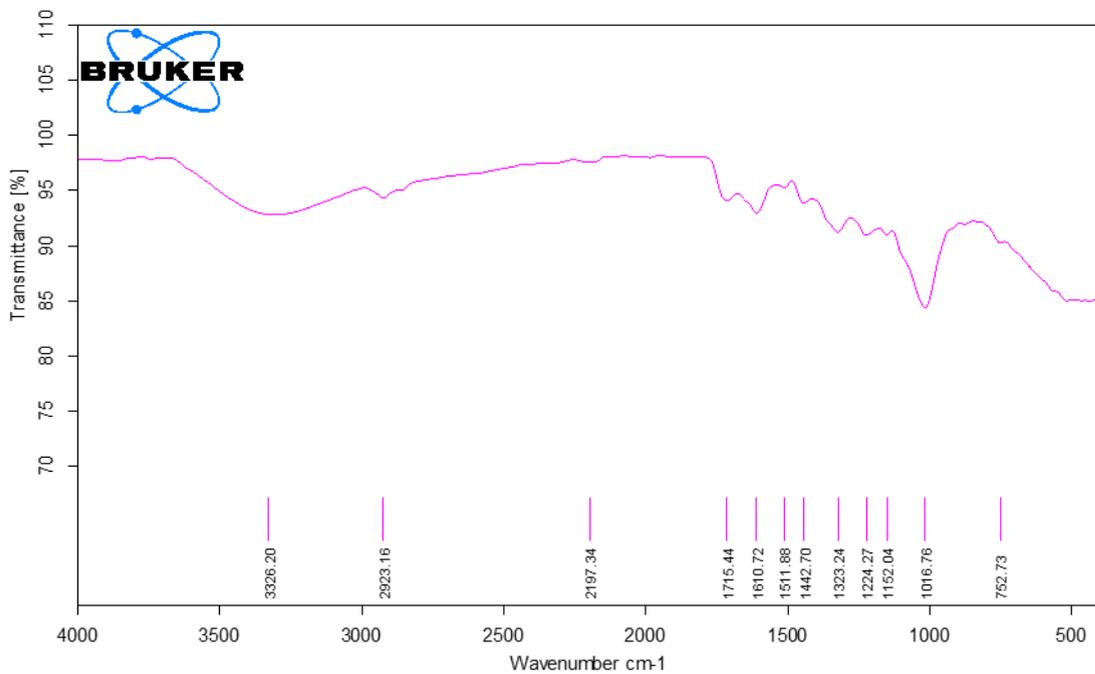


Figure IV.1 : Spectre des écorces de grenade avant prétraitement.

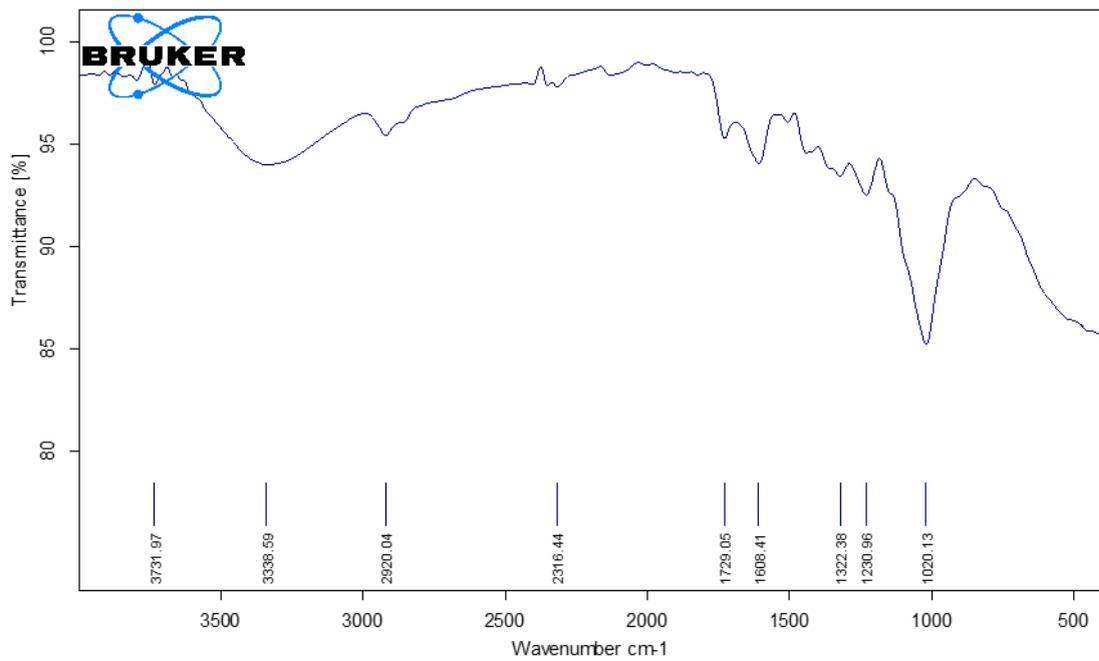


Figure IV .2 : Spectre des écorces de grenade après prétraitement par les ondes à ultrason.

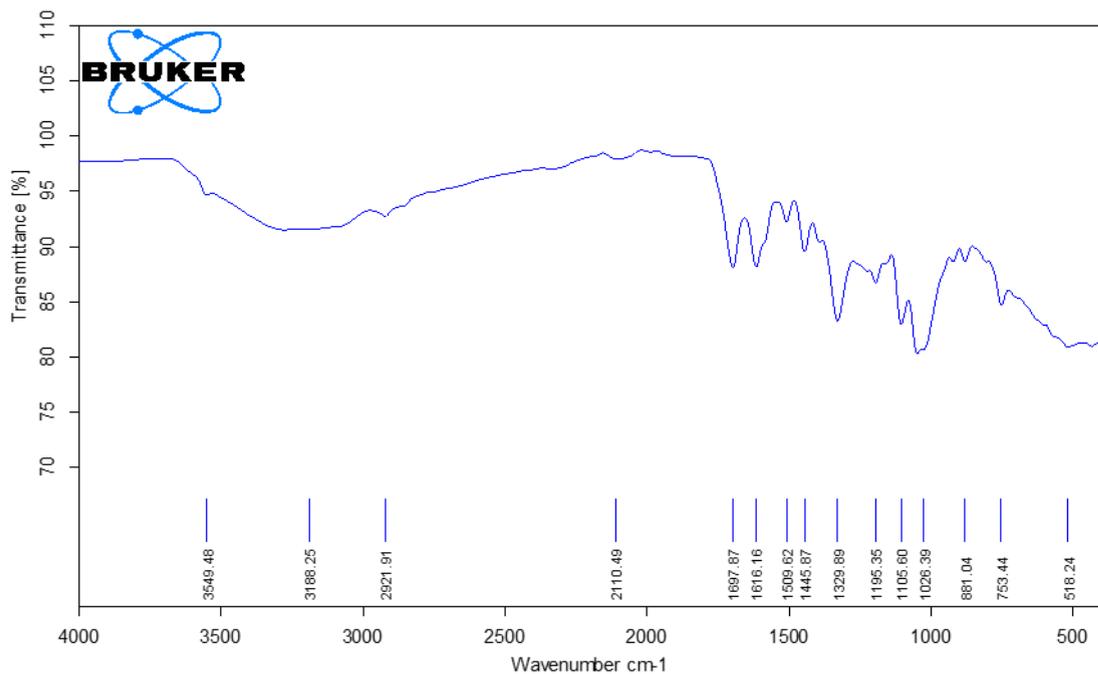


Figure IV.3 : Spectre des écorces de grenade après prétraitement acide.

#### **IV.4 Résultats des paramètres suivis lors du procédé de production de bioéthanol**

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet du prétraitement de la biomasse (L'hydrolyse enzymatique, l'effet de l'ultrason et l'effet du prétraitement enzymatique en utilisant les enzymes cellulase et hémicellulase) sur la récupération du bioéthanol d'une part et sur l'évolution du pH, les sucres totaux et réducteurs au cours de la fermentation d'autre part.

#### IV.4.1 Evolution du pH au cours de la fermentation alcoolique, par l'hydrolyse acide diluée et ultrasons suivi par SSF

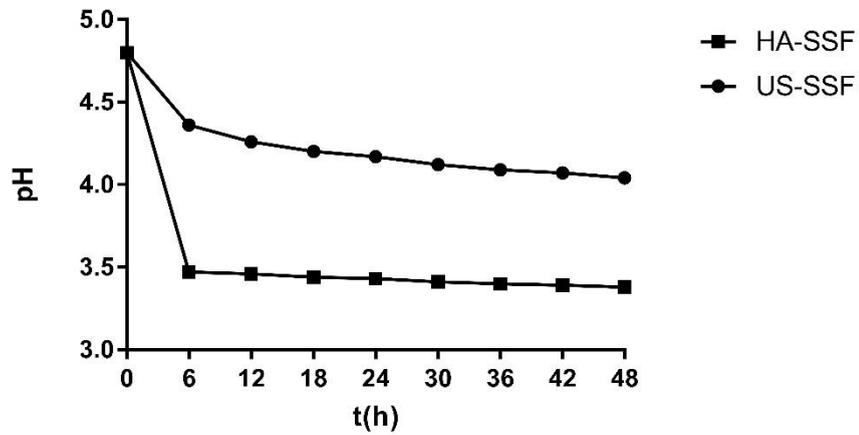


Figure IV.4 : Cinétique de pH.

Le pH est un indicateur important au cours de la fermentation des sucres. Au bout des premiers six heures de fermentation, nous avons remarqué qu'il y'a eu une importante diminution du potentiel d'hydrogène de 4,8 à 4,36 pour le prétraitement par les ondes à ultrasons, et 3,47 pour le prétraitement par l'hydrolyse acide. Après 48 heures de fermentation, le pH a été diminué jusqu'à 4,04 pour le prétraitement par les ondes à ultrason et 3,38 pour l'hydrolyse acide. Cette diminution due à l'activité métabolique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par le dégagement de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) au cours de la fermentation suivie par la production de l'éthanol [71].

#### IV.4.2 Cinétique des sucres totaux pour le procédé du prétraitement par l'hydrolyse acide diluée et ultrasons suivi par SSF

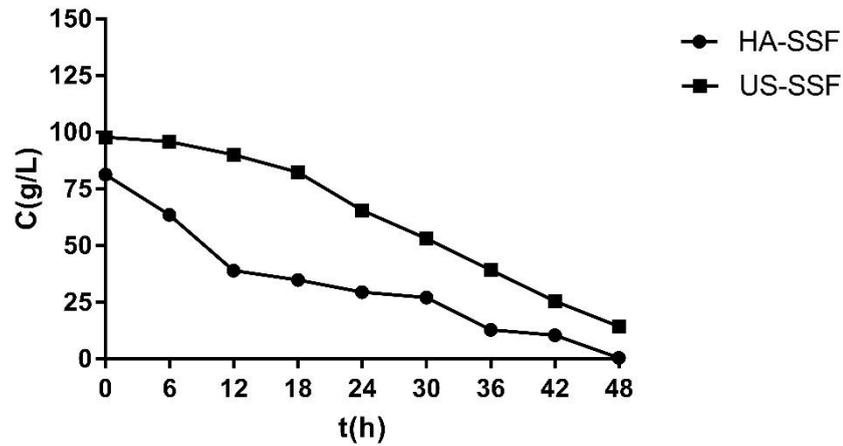


Figure IV.5 : Cinétique des sucres totaux.

Les courbes des sucres totaux des deux procédés ont montré qu'il a eu une importante diminution des sucres au cours de la fermentation. La concentration a été diminuée de 97,76 g/L jusqu'à 14,36 g/L pour le procédé US-SSF, et 81,36 g/L à 4,78 g/L pour le procédé HA-SSF. Au bout des premiers 24 heures, le rendement en consommation des sucres était de 33%. A la fin de la fermentation, le rendement des sucres était de 85,32% pour le procédé US-SSF. Pour le procédé de HA-SSA et en plein milieu de la fermentation (24 heures), le rendement en sucres était de 64% et après 48 heures de fermentation, il a atteint 94%. Cette diminution est due aux conditions optimales du procédé SSF (pH et température) qui ont permis à une bonne consommation des sucres par la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme une source de carbone pour produire de l'éthanol [71].

#### IV.4.3 Cinétique des sucres réducteurs pour le procédé du prétraitement par l'hydrolyse acide diluée et ultrasons suivi par SSF

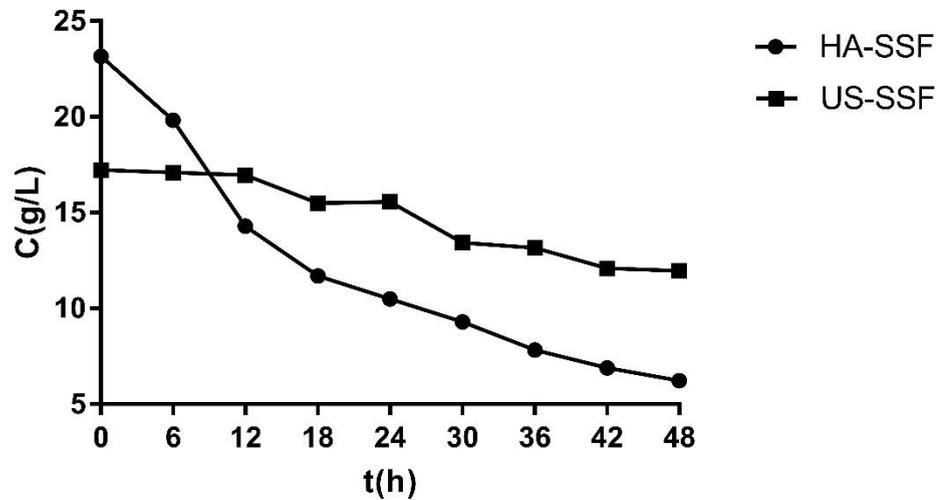


Figure IV.6 : Cinétique des sucres réducteurs.

L'examen de la figure montre que les sucres réducteurs ont connus une importante dégradation durant les 48 heures de la SSF. La concentration des sucres a été diminuée de 17,23 g/L jusqu'à 11,96 g/L pour le procédé de US-SSF, et de 23,16 g/L à 6,22 g/L pour HA-SSF. Le rendement en sucres réducteurs après 24 heures était respectivement de 9,7% et de 54,7% pour US-SSF et HA-SSF. Au bout de la fermentation, le rendement était respectivement de 30,5% et de 73% pour US-SSF et HA-SSF. On remarque que cette consommation des sucres libérer à partir de la biomasse lignocellulosique des écorces de grenade au cours du prétraitement par l'acide (23,16g/L) était plus grande que le prétraitement par les ondes à ultrasons (17,23g/L). Cette diminution due à la consommation du glucose et les autres sucres (hexoses C6) par la levure *Sacchramoyces cerevisiae*. Les sucres réducteurs qui n'ont pas été transformé (11,96 g/L et 6,22g/L) en éthanol sont pratiquement des sucres de types C5 (pentoses)[72].

#### IV.4.4 Dosage de l'éthanol

L'examen de la figure montre qu'il y'a une importante production de l'éthanol durant les premiers 24 heures de la saccharification et la fermentation simultanée pour les deux types de prétraitements. On remarque qu'après 24 heures, la concentration a été évoluée jusqu'à 1,52 et 0,61 g/L pour le procédé de HA-SSF et US-SSF respectivement. La plus grande concentration a été obtenue après 48 heures de fermentation (2,94 et 1,17 g/L). La concentration la plus élevée était avec le procédé de HA-SSF (2,94g/L) à partir une concentration de 50 g/L de la biomasse. Les conditions opératoires de l'étape de l'hydrolyse acide, ainsi que la saccharification et la fermentation simultanée par la cellulase et l'hémicellulase ont permis de libérés une quantité importante de sucres fermentescibles de types C6 (hexoses)[73] .

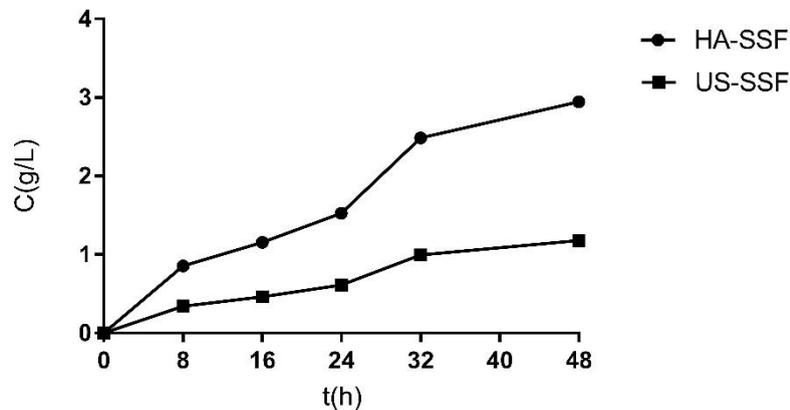


Figure IV.7 : Cinétique de l'éthanol.

#### IV.4.5 Mesure de la densité et de la viscosité

Les résultats de la densité sont présentés dans les tableaux suivant :

Tableau IV.4 : Densité et viscosité du bioéthanol.

Procédé	Densité de Bioéthanol obtenu a (T=20°C)	Viscosité (Pa.s)
Prétraitement par hydrolyse acide diluée et SSF	0,841	0,002±0,0
Prétraitement par les ondes à ultrasons et SSF	0,878	0,002±0,0
Ethanol 96%	0,820	0,120±0,17

Une diminution de la densité au cours de la fermentation, peut être expliquée par la transformation du glucose en alcool et la perte de masse sous forme de CO<sub>2</sub> [74].

Les résultats de la densité du bioéthanol obtenus (0,841 et 0,878) à partir des procédés (HA-SSF) et (US-SSF) sont proches de la densité de l'éthanol 96% (d= 0,820).

Pour la viscosité, l'examen des résultats obtenus des deux procédés sont proches de celles de l'éthanol 96%.

#### **IV.4.6 Concentrations volumiques du bioéthanol obtenue durant les 48h de la fermentation et après bidistillation**

Les résultats de la concentration de bioéthanol obtenue sont représentés dans le tableau ci-dessus :

Tableau IV.5 : Concentration volumiques du bioéthanol.

Temps (h)	18	36	48	Bioéthanol bidistillé
Concentration %				
Prétraitement par hydrolyse acide diluée et SSF	2,5	4,8	11,2	57,6
Prétraitement par les ondes à ultrasons et SSF	1,8	5,7	8,1	36,9

#### **IV.4.7 Analyse qualitative du bioethanol par Chromatographie en Phase Gazeuse CPG**

Les résultats de l'analyse chromatographique en phase gazeuse CPG de l'éthanol sont présentés dans les figures suivantes :

L'éthanol 96%

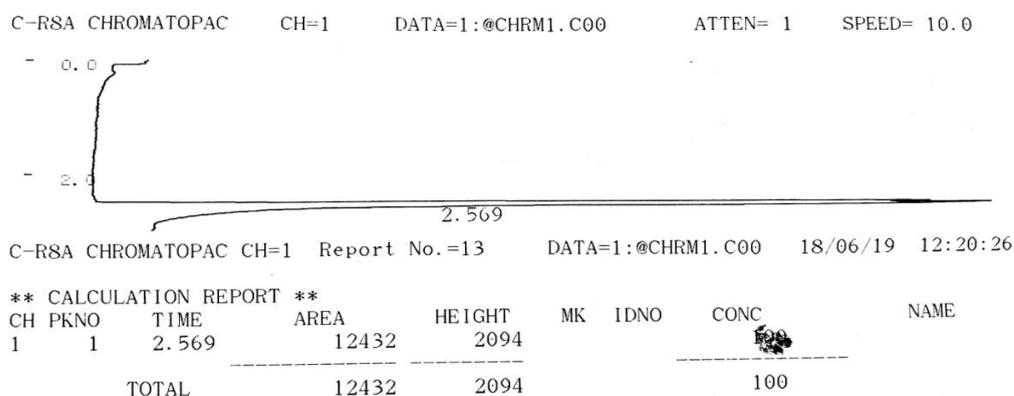


Figure IV.8 : Chromatogramme de l'éthanol 96%.

Bioéthanol des écorces de grenade par l'hydrolyse acide diluée

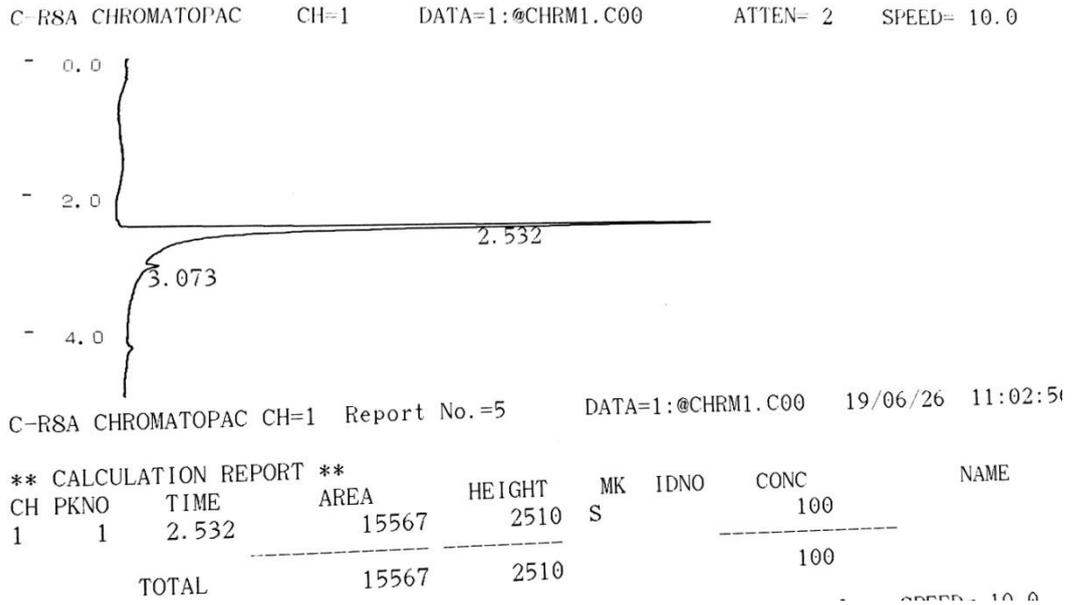


Figure IV.9 : Chromatogramme de bioéthanol par l'hydrolyse acide diluée.

Bioéthanol des écorces de grenade par ultrasons

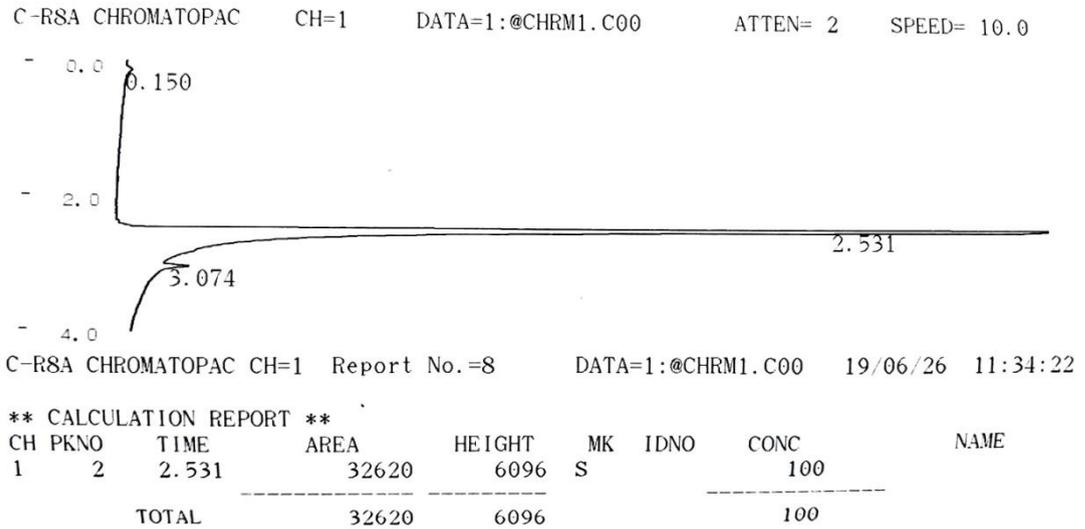


Figure IV.10 : Chromatogramme de bioéthanol par ultrasons .

Tableau IV.6 : Temps de rétention de HA-SSF et de US-SSF.

Procédés	HA-SSF	US-SSF	Ethanol 96%
Temps de rétention (min)	2,529±0,0	2,535±0,0	2,545±0,02

L'identification du bioéthanol s'effectue en comparant le temps de rétention du chromatogramme de l'éthanol pur (96%) dans les mêmes conditions d'analyse.

L'observation des chromatogrammes montre que le temps de rétention de l'éthanol pure (2,545±0,02) est quasi proche du bioéthanol synthétisé à partir des écorces de grenade par l'hydrolyse acide diluée (2,529±0,0) et par l'ultrason (2,535±0,0).

#### **IV.5 Comparaison du rendement et de la productivité de l'éthanol obtenue avec les deux procédés HA-SSF et US-SSF**

Les résultats du rendement de la productivité de l'éthanol sont représentés dans le tableau ci-dessus :

Tableau IV.7 : Comparaison des deux procédés avec les écorces de grenade.

Procédé	Bioethanol (g/L)	Rendement théorique (%)	Q <sub>p</sub> (g/L/h)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	Observation
HA-SSF	5,90	24,93	0,32	0,39	Nos résultats
US-SSF	2,36	13,40	0,18	0,27	Nos résultats
HA-HSF	5,58	-	0,46	0,43	(Demiray, Karatay and Dönmez (2018))

Nous remarquons d'après ces résultats obtenus, que les valeurs cinétiques optimums ont été obtenues par le procédé de l'hydrolyse acide et la saccharification et la fermentation simultanée. Comparant aux autres travaux réalisés par (Demiray, Karatay and Dönmez (2018)) [73] (C=5,58 g/l, Q<sub>p</sub>= 0,46 g/L/h et Y<sub>P/S</sub>=0,43), que la concentration obtenue du bioéthanol est plus grande.

## CONCLUSION GENERALE

Cette étude avait pour objectif la valorisation des déchets issus de la biomasse (écorces de *Punica granatum*), pour la production du bioéthanol de deuxième génération, l'étude de l'impact des différents prétraitements de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse acide diluée suivi par la Saccharification et Fermentation Simultanée (SSF) et l'hydrolyse par les ondes à ultrason suivi par (SSF), ont permis de séparer les différents composants de la matière lignocellulosique.

L'utilisation des enzymes telle que la cellulase et l'hémicellulase dans l'étape de la saccharification avait permis d'avoir une bonne libération des sucres réducteurs fermentescibles. Le procédé de fermentation a permis d'obtenir une bonne productivité en bioéthanol, car ce dernier a présenté des caractéristiques d'un alcool de bonne qualité (volatile, inflammable et possédant une odeur piquante).

Le meilleur rendement de libération des sucres réducteurs a été obtenu par le procédé de HA-SSF (73%) par rapport au procédé par les ondes à ultrason (30,5%). Cette libération a permis d'avoir une concentration de l'éthanol (2,94 g/L) après 48 heures de fermentation en utilisant la *Saccharomyces cerevisiae* dans des conditions opératoires optimales (pH=4,8 et T=37°C).

Le rendement maximal en éthanol a été obtenu avec un pourcentage de (24,93%) par le procédé de HA-SSF, une productivité en éthanol de (0,32%) et un rendement en éthanol de (0,39%).

Enfin, il serait intéressant d'étudier la possibilité de valoriser le résidu de la fermentation et confirmer son utilisation comme engrais chimique ou pour l'alimentation animale.

À la lumière de ces résultats, deux recommandations peuvent être développées :

- Faire une étude technico-commerciale afin d'évaluer les coûts de la production ainsi que son application dans le domaine de transport.
- Mettre en application industrielle la production du bioéthanol afin de permettre à l'Algérie de sortir de la dépendance des énergies fossiles.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] la valorisation de biomasse (Mars 2007) Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par Hugues DE CHERISEY – Consultant agronome, Bordeaux Claude ROY – Coordinateur (Contrat N°0701C0007)
- [2] « Origines et usages de la biomasse » syndicat des énergies renouvelables  
[http://www.enr.fr/userfiles/files/Kit%20de%20communication/2010102323\\_SERBiomasse\\_complet.pdf](http://www.enr.fr/userfiles/files/Kit%20de%20communication/2010102323_SERBiomasse_complet.pdf)
- [3] F. JÉRÔME, “PRODUCTION DE SYNTHONS BIOSOURCÉS PAR ACTIVATION DE LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE,” 2015.
- [4] F. Chambon and N. Essayem, “Transformation de la cellulose par catalyse hétérogène,” 2011.
- [5] P. L. Dhepe and R. Sahu, “A solid-acid-based process for the conversion of hemicellulose,” *Green Chem.*, vol. 12, no. 12, pp. 2153–2156, 2010
- [6] L. Jouanin and C. Lapierre, *Lignins: biosynthesis, biodegradation and bioengineering*, vol. 61. Academic Press, 2012.
- [7] Muhammad Saif Ur Rehman, Ilgook Kim, Yusuf Chisti, Jong-In Han “Use of ultrasound in the production of bioethanol from lignocellulosic biomass” *Energy Education Science and Technology*
- [8] P. KUMAR, D.M. BARRETT, M.J. DELWICHE and P. STROEVE, *Ind. Eng. Chem. Res.* **48**, 3713, 2009 disponible sur <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie801542g>
- [9] Z Liu and B. FEI *Characteristics of Moso Bamboo with Chemical Pretreatment*, 2013 disponible sur <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/44265.pdf>
- [10] Y. CHEN, R.R. SHARMA-SHIVAPPA, D. KESHWANI and C. CHEN, *Appl. Biochem. Biotechnol. Part A* **142**, 276, 2007 in <http://www.springerlink.com/content/a2542710357w3u12>
- [11] <https://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/molecule-hydrolyse-17292/>
- [12] Ashok Pandey, “Handbook of Plant-based Biofuels” CRC Press 2009, Vol 293 pages 13-184
- [13] Ashokkumar, M., Mason, T.I., "Sonochemistry" Standard Article, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Published Online: 19 OCT 2007, DOI:10.1002/0471238961.1915141519211912.a01.pub2
- [14] Mettin, R. , Cair6s, C., Troia, A. , 2015, "Sonochemistry and bubble dynamics", *Ultrasonics Sonochemistry*, 25: 24-30

- [15] D. Arapoglou, Th. Varzakas, A. Vlyssides, C. Israilides ‘ ‘ Ethanol production from potato peel waste (PPW)’ ’ Waste Management (May 2010) vol 5.
- [16] Andreus J., Azevedo H, et. Cavaco-Paulo A, « Effects of temperature on the cellulose binding ability of cellulase enzymes », J. Mol. Catal. B Enzym., vol. 7, no 1-4, p.233-239, sept. 1999.
- [17] Hasunuma T. et. Kondo A, « Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering », Biotechnol. Adv., vol. 30, no 6, p. 1207-1218, nov. 2012.
- [18] Balat M., « Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review », Energy Convers. Manag., vol. 52, no 2, p. 858-875, févr. 2011.
- [19] Hari Krishna S., Janardhan Reddy T, et. Chowdary G. V, « Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast », Bioresour. Technol., vol. 77, no 2, p. 193-196, avr. 2001.
- [20] Paulová L., Patáková P., Branská B, Rychtera M., et Melzoch K., « Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency », Biotechnol. Adv.
- [21] Ogier J. C, Leygue, J. P, Ballerini D, Pourquoi J., et. Rigal L, « Production d'éthanol a partir de biomasse lignocellulosique », Oil Gas Sci. Technol., vol. 54, no 1, p. 67-94, janv. 1999.
- [22]. Kim S. R., Lee K.-S., Choi J.-H., Ha S.-J., Kweon D.-H., Seo J.-H, et. Jin Y.-S , « Repeated-batch fermentations of xylose and glucose-xylose mixtures using a respiration deficient *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism », J. Biotechnol., vol. 150, no 3, p. 404-407, nov. 2010.
- [23] Gonçalves D. L., Matsushika A, de Sales B., Goshima T., Bon E. P. S., et Stambuk, B. U. « Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters », Enzyme Microb. Technol., vol. 63, p. 13-20, sept. 2014.
- [24] Dragone G., Silva D. P, et. de Almeida J. B e Silva, « Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing », LWT - Food Sci. Technol., vol. 37, no 7, p.797-802, nov. 2004.
- [25]. Aldiguié A. S., Alfenore S., Cameleyre X. Goma, G., Uribelarrea J. L., Guillouet S. E, et. Molina-Jouve C, « Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production », Bioprocess Biosyst. Eng., vol. 26, no 4, p. 217-222, juill. 2004.

- [26]. Buzás Z., Dallmann K, et. Szajáni B, « Influenc of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 34, no 6, p. 882-884, 1989.
- [27] IEA Bioenergy - Annual Report 2017
- [28] Dutriez C., watterlot F., 2014. Comparaison des procédés de production de bioéthanol à base d'amidon. Étude bibliographique, Ecole des mines Douai ,30pages.
- [29] Polleau J., 2002. Caractérisation des biogaz. INERIS DRC-02-27158-AIRE-n°316b Po, 31pages
- [30] Lorne D., 2011. Le point sur les biocarburants progression des marchés nationaux et internationaux. IFPEN.
- [31] Paillet F., Taillades G., 2013. Les biocarburants, recherche scientifique. Université Montpellier 2, France, 18pages
- [32] « Les biocarburants : de la 1ère à la 3ème génération » « culture sciences chimie » le 20/12/2012 <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/les-biocarburants-de-la-1%C3%A8re-%C3%A0-la-3%C3%A8me-g%C3%A9n%C3%A9ration>
- [33] Bayrakci A., Kaçar G., 2014. Second-generation of bioethanol production from waterhyacinth and duckweed in Izmir. *Study.Renewable and Sustainable Energy Reviews*, n0 30, 306-316 pages
- [34] BNDES/CGEE Coord., 2008, Bioéthanol de canne à sucre .livre énergie pour le développement durable, Rio de Janeiro, BNDES-CGEE.1ere édition ,316 pages
- [35] Demirbas M.F., 2009. Biorafinerie for biofuel up grading a critical review. *Appl.Energy*, no86, pages 151-161.
- [36] Lestari S. et al., 2009.Transforming triglycerides and fatty acids into biofuel. *ChemSusChem*, 2(12), pages 1109-1119.
- [37] Akbi A., 2013. Les implications du développement des biocarburants. Thèse de doctorat, Ecole doctorale 513 Droit Et Sciences Politiques, Économiques et de Gestion Nice, paris, 229 pages.
- [38] Riess J., 2012.intensification de la brique « fermentation alcoolique »des substrats betteraviers et autre substrats pour la production d'éthanol. Thèse de doctorat, Université de Toulouse. France ,177pages.
- [39] Hugues P., 2015. Stratégies technologique et réglementaire de déploiement des filières bioénergies françaises. Thèse de doctorat, École nationale supérieure des mines de paris, France ,265 pages

- [40] Saidi A., 2011. La biomasse lignocellulosique et la bioénergie. *Bio énergie et environnement*, no21, pages 4-5.
- [41] Ballerini D. ,2002. Production d'éthanol à partir de biomasse. *Revue L'actualité chimique*, n° 261, pages 83-87.
- [42] « Akbi A., 2013. Les implications du développement des biocarburants. Thèse de doctorat, Ecole doctorale 513 Droit Et Sciences Politiques, Économiques et de Gestion Nice, paris, 229 pages »
- [43] Kara Ali M., 2014. Isolement et caractérisation de souches levurienne des milieux arides productrices de l'éthanol sur différents substrats. Thèse de doctorat, Université Constantine 1, Algérie. 129 pages.
- [44] "POCKET GUIDE TO ETHANOL 2019" Renewable Fuels Association's (RFA) <https://EthanolRFA.org/resources/publications>
- [45] Touzi A., Azbbès N., 1998. Avant-projet de Réalisation d'Unité de Production de Bioalcool, Rapport Intern, Lab. Biotech, Dans les Wilayas de Biskra, Adrar et Ghardaïa, Algérie. 56pages.
- [46] MODECOM, (1993). « Méthode de caractérisation des ordures ménagères ». ADEME (Angers). Déchets ménagers et assimilés
- [47] El Zerey-Belaskri A Benhassaini H, Naimi W et Rahoui S, "Cellulosic and hemicellulosic fractions dosage of Pistacia atlantica Desf. subsp. atlantica leaves in western Algeria", *Natural Product Research* (2013)
- [48] Rémy L.,(1993) Mémoire présentée à l'université du Québec à Chicoutimi, Extraction Caractérisation Et biotransformations de la lignine de Klason extraite de l'épinette blanche PICEA GLAUCA (MOENCH) ,
- [49] E.G .Bligh and W.J. Dyer ,AUGUST 1959 ,"A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION" *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* , VOI 37 , N° 8
- [50] Jean Rodier ,Bernard Legube,, Nicole Merlet *et coll.* « L'ANALYSE DE L'EAU » 9e édition ,Dunod, Paris, 2009 , 1579 p ISBN 978-2-10-054179-9
- [51] Torget RW, Werdene P, Grohmann K (1990) Dilute acid pretreatment of two short rotation herbaceous crops. *Appl Biochem Biotechnol* 24(25):115–126
- [52] Esteghalian A, Hashimoto AG, Fenske JJ, Penner MH (1997) Modelling and optimization of dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stove, poplar and switchgrass.

Bioresour Technol 59:129–136

- [53] Muhammad Saif Ur Rehman, Ilgook Kim, Yusuf Chisti, Jong-In Han , 2013  
“Use of ultrasound in the production of bioethanol from lignocellulosic biomass” Volume  
(is 30: N° 1391-1410
- [54] Ohgren, K., Bura, R., Lesnicki, G., Saddler, J., Zacchi, G., 2007. A comparison  
between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and  
fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry* 42 ,834-839
- [55] M. Warzywoda, D. Ballerini et F. Monot, ‘*Procédé de Production d’Enzymes  
Cellulolytiques et Hémicellulolytiques Utilisant les Résidus de Distillation de Fermentation  
Ethanolique d’Hydrolysats Enzymatiques de Matériaux (Ligno-) cellulosiques*’,  
Fascicule de Brevet Européen 2011, 44, 5.
- [56] C.Cara, E Ruiz, M Ballesteros , P Manzanares , M Jose´ Negro ,E  
Castro.2008‘Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated Olive TREE  
pruning’*Fuel* 87 , 692–700.
- [57] XI. Xionggang, W. Xinlin, W. Yuanfeng, C. Qinjie and X. Jianbo, ‘Detemination of  
Tea Polysaccharides in Camellia Sinensis by a Modified Phenol-Sulfuric Acid  
Method’,*Archives of Biological Sciences, Belgrade*, Vol. 62, N°2, pp. 669 – 676, 2010.
- [58] Dubois.M., Gilles.A.K., Hamilton .J.K., Rebers .P.A. and Smith. F.,  
(1956)‘Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances’,  
*Analytical Chemistry*, Vol. 28, pp. 350 –356
- [59] Ye Sun, Jiayang Cheng., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol  
production: a review; *Bioresource Technology*, 83, (2002), pp.1-11.
- [60] M. Balat, « Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the  
biochemical pathway: A review », *Energy Convers. Manag.*, vol. 52, no 2, p. 858-875, févr.  
2011
- [61] Hyun-Beom Seo · Hyun-Joo Kim · Oh-Kyu Lee · Ji-Hye Ha · Hyeon-Yong Lee ·  
Kyung-Hwan Jung, 7 November 2008 ,” Measurement of ethanol concentration using  
solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production  
process” *J Ind Microbiol Biotechnol* vol36 N°285–292
- [62] J.Faerber. Microscopie électronique à balayage, Microanalyse X par sonde  
électronique (2004). P. 5.
- [63] Indulekha John· Jishnu Pola· Arunagiri Appusamy , “Optimization of Ultrasonic  
Assisted Saccharification of Sweet Lime Peel for Bioethanol Production Using Box–

Behnken Method". Department of Chemical Engineering, National Institute of Technology Tiruchirappalli, Tiruchirappalli, Tamil Nadu 620015, India 12/09/2017

[64] TAE HYUN KIM AND K K LEE ,2005, "Pretreatment of Corn Stover by Soaking in Aqueous Ammonia" , Department of Chemical Engineering, Auburn University Auburn , AL 36849-5127

[65] Ezgi Evcan, Canan Tari ,2015, "Production of bioethanol from apple pomace by using cocultures: Conversion of agro-industrial waste to value added product" Energy vol 1 p8

[66] Hande Gunan-Yucel, Zumriye Aksu, 2015 ," Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar 4 beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods

[67] Rowayshed, G., Salama, A., Abul-Fadl, M., Akila-Hamza, S. and Emad, A. Mohamed , 2013, "Nutritional and Chemical Evaluation for Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peel and Seeds Powders By Products" , Middle East Journal of Applied Sciences, vol 3 N° 4 pp 69-179

[68] S. C. Kushwaha, M. B. Bera and Pradyuman Kumar ,2013 , "Nutritional Composition of Detanninated and Fresh Pomegranate Peel Powder" , IOSR Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology , Volume 7, Issue 1, pp 38-42

[69] Nejib Hasnaoui, Bernard Wathelet, Ana Jiménez-Araujo, " Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: dietary fiber composition, antioxidant capacity and functional properties" Food chemistry, (March 2014).

[70] Haiping Yang a., Rong Yan b, Hanping Chen a, Dong Ho Lee b, Chuguang Zheng ,2007, "Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis" ,FUEL , vol 86 pp 1781–1788

[71] Assia Mansouri , Rachida Rihani , Aicha Nadia Laoufi , Melek Özkan ,2016, Production of "bioethanol from a mixture of agricultural feedstocks: Biofuels characterization", FUEL , vol 185pp 612–621

[72] Liang Zhang , Hai Zhao , Mingzhe Gan , Yanlin Jin , Xiaofeng Gao , Qian Chen , Jiafa Guan , Zhongyan Wang, 2011, "Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales" Bioresource Technology , vol 102 pp 4573–4579

[73] Ekin Demiray, Sevgi Ertuğrul Karatay, Gönül Dönmez, Evaluation of Pomegranate Peel in Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*, Energy (2018),

doi: 10.1016/j.energy.2018.06.200

[74] Boulal. A. Benbrahim. Z., Benali. B. et Ladjel. S, « Etude comparative de rendement de la production d'éthanol de deux variétés de dattes communes de faible valeur commerciale (Tinaceur et Aghmou) de Sud – Ouest de l'Algérie ». Revue des Energies Renouvelables Vol. 16 N°3 (2013).

## ANNEXE I : PREPARATION DE MILIEU DE FERMENTATION

Le milieu de fermentation a été préparé dans une fiole jaugée de 1000 ml, il est composé de : 20 g extrait de malt, 0,5 g extrait de levure, 2 g ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 6 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g  $\text{CaCl}_2$ , pour les épluchures de la pomme de terre seulement. Ensuite, le pH de cette solution a été corrigé à 5 par soit une solution de HCl (1M) ou NaOH (1M). Enfin cette solution a été stérilisée dans un autoclave réglé à une température de  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 min.

## ANNEXE II : DOSAGE DES SUCRES TOTAUX PAR LA METHODE DE DUBOIS

Une solution mère d'une concentration de 1 g/L de D-glucose a été préparée afin de tracer une courbe d'étalonnage des sucres totaux. Les solutions filles de concentrations de 200, 300, 400, 500, 700, 800, 900 mg/L ont été préparées dans des fioles jaugées de 20 ml. Dans une série tube à essai, un volume de 0,5 ml de chaque solution a été introduit. Un volume de 0,5 ml de phénol 5% a été rajouté par la suite, ensuite 2,5 ml d'acide sulfurique concentré a été introduit aussi. Les tubes ont été laissés au repos 10 minutes, puis ils ont été agités et placés pendant 10 à 20 minutes à une température de  $100^\circ\text{C}$ .

L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV.

La courbe d'étalonnage obtenue après l'analyse est représentée dans la figure ci-dessus :

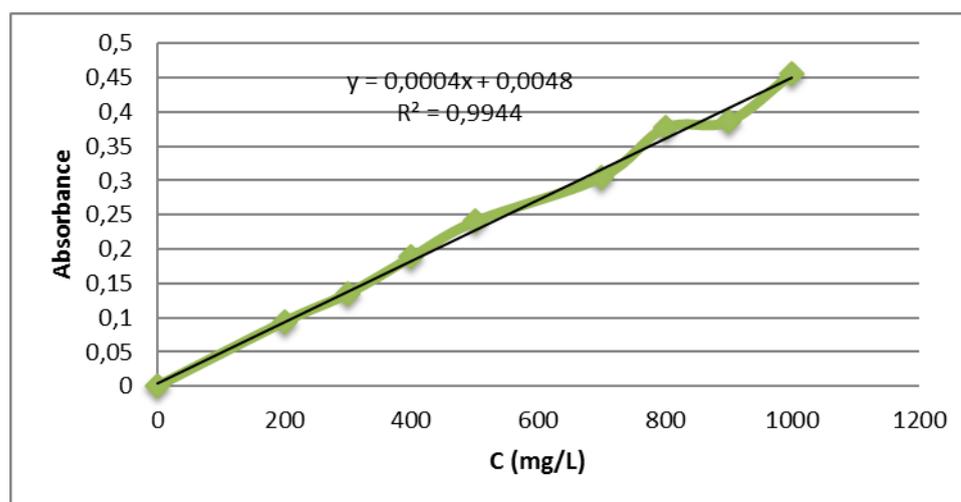


Figure : Courbe d'étalonnage des sucres totaux

### ANNEXE III : DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR LA METHODE DE MILLER

Une solution mère d'une concentration de 1 g/L de D-glucose a été préparée afin de tracer une courbe d'étalonnage des sucres réducteurs. Les solutions filles de concentrations 100, 300, 400, 500, 500, 700, 800 et 1000 mg/L ont été préparées dans des fioles jaugées de 20 ml. Le tableau suivant représente les différentes concentrations effectuées.

Dans une série de tube à essai, un volume de 1 ml de chaque solution a été introduit. Un volume de 1 ml de réactif de DNSA a été rajouté par la suite. Les tubes ont été agités et placés dans un bain mari bouillant en même temps pendant 5 min. Ils ont été refroidis immédiatement dans un bain d'eau glacée afin de stopper la réaction entre les sucres et le DNSA. Enfin un volume de 10 ml d'eau distillée a été ajouté et les tubes ont été placés sous agitations. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La courbe d'étalonnage obtenue après l'analyse est représentée dans la figure ci-dessus.

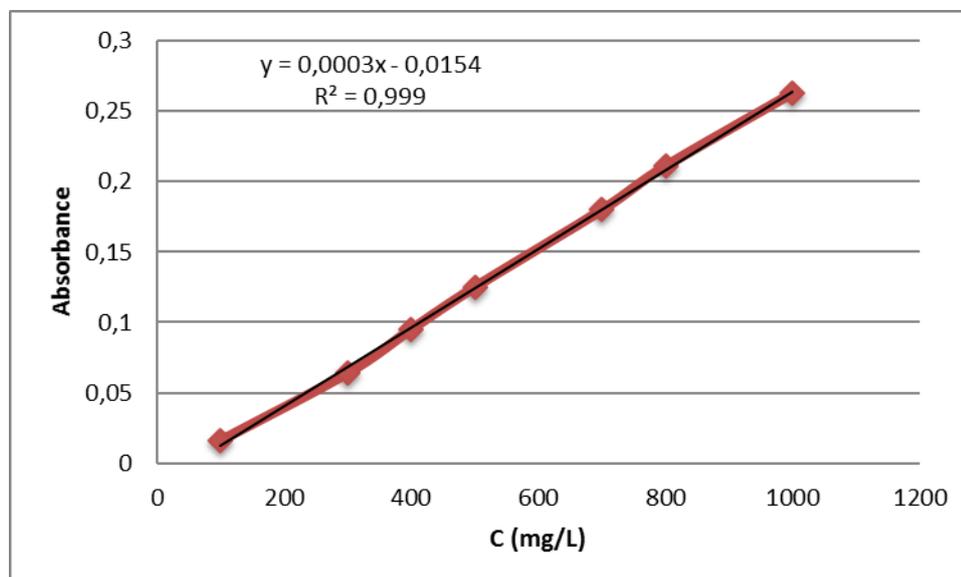


Figure : Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs.

### ANNEXE III : DOSAGE DE L'ETHANOL

Une solution mère d'une concentration de 50 g/l de d'éthanol pure à 96% a été préparée afin de tracer une courbe d'étalonnage de l'éthanol. Les solutions filles de concentrations 10, 15, 20, 25, 30 et 40 g/L ont été préparées dans des fioles jaugées de 10 ml. Le tableau suivant représente les différentes concentrations effectuées.

Dans une série de tube à essai, un volume de 1 ml de chaque solution a été introduit. Un volume de 1 ml de solution de dichromate de potassium  $K_2Cr_2O_7$  a été rajouté par la suite. Les tubes ont été agités et placés dans un bain mari bouillant en même temps pendant 10 min. Ils ont été refroidis immédiatement dans un bain d'eau glacée afin de stopper la réaction. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type (Hitachi U-5100, Japon).

La courbe d'étalonnage obtenue après l'analyse est représentée dans la figure ci-dessus.

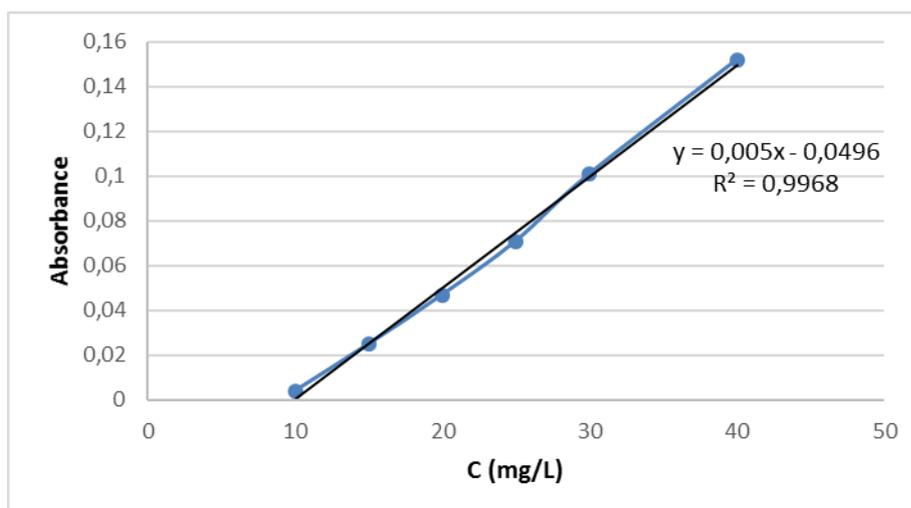


Figure : Courbe d'étalonnage de l'éthanol.

## ANNEXE V



Figure : Dosage des sucres réducteurs



Figure : Prétraitement par ultrason



Figure : Pré culture



Figure : Distillation du bioéthanol

