



**HAL**  
open science

# Valorisation de la mélasse de caroube par une approche bioraffinerie

Hajar Bahry

► **To cite this version:**

Hajar Bahry. Valorisation de la mélasse de caroube par une approche bioraffinerie. Génie des procédés. Université Clermont Auvergne [2017-2020]; Université Libanaise, 2017. Français. NNT : 2017CLFAC070 . tel-03081139

**HAL Id: tel-03081139**

**<https://theses.hal.science/tel-03081139>**

Submitted on 18 Dec 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE**

ECOLE DOCTORALE  
SCIENCES POUR L'INGENIEUR DE CLERMONT-FERRAND

**Thèse en cotutelle avec l'Université Libanaise**

Présentée par

*Hajar* BAHRY

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

**SPÉCIALITÉ : GÉNIE DES PROCÉDÉS**

**Titre de la thèse : Valorisation de la mélasse de caroube par une approche bioraffinerie**

Soutenue publiquement le 14 décembre 2017

devant le jury

<b>M. Abdeltif AMRANE</b> , Professeur à l'Université de Rennes 1	Président - Rapporteur
<b>M. Renaud ESCUDIÉ</b> , Directeur de recherche à l'INRA, LBE, Narbonne	Rapporteur
<b>M. Samir TAHA</b> , Professeur, Université Libanaise	Directeur de thèse
<b>M. Christophe VIAL</b> , Professeur, Université de Clermont Auvergne	Directeur de thèse
<b>Mme Rawa ABDALLAH</b> , Enseignant-chercheur, Université Libanaise	Examinateur
<b>Mme Agnès PONS</b> , Maître de conférences, Université de Clermont Auvergne	Examinateur
<b>Mme Lidia FAVIER</b> , Maître de conférences, ENS Chimie de Rennes	Examinateur
<b>Mme Séverine LOUESDON</b> , Chercheur à l'IFP-Energies Nouvelles, Solaize	Examinateur



# Avant-propos

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre l'Université Clermont Auvergne et l'Université Libanaise dans le cadre d'une thèse en cotutelle sous la direction du professeur Samir TAHA et de Mme Rawa ABDALLAH au Liban et du professeur Christophe VIAL et de Mme Agnès PONS en France. Il a été réalisé au Liban au sein du Laboratoire de Biotechnologie Appliquée : Biomolécules, Biothérapies et Bioprocédés du Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications et en France au sein de l'axe GePEB (Génie des Procédés, Energétique et Biosystèmes) de l'Institut Pascal (UMR CNRS 6602) dont le responsable est le professeur Claude-Gilles DUSSAP. Il n'aurait également pas été possible sans le concours de l'Ecole Doctorale des Sciences et Technologies au Liban et de l'Ecole Doctorale SPI de Clermont-Ferrand en France.

Je remercie l'ensemble de ces institutions, leurs personnels et mes collègues qui ont rendu ce travail possible, ainsi que ma famille pour son soutien.

Clermont-Ferrand, septembre 2017



# Résumé

Cette thèse de doctorat porte sur la valorisation du déchet solide issu de la préparation de la mélasse de caroube libanaise pour la production de bioénergie et de molécules à valeur ajoutée. L'analyse de la composition de ce déchet a montré qu'il contient 45 % (g/g) de sucres, substrats exploitables pour la fermentation alcoolique ou lactique, la production de biohydrogène, ou comme source de carbone pour la croissance d'une algue dans un procédé de phycoremédiation (traitement des eaux par les algues) pour l'élimination de micropolluants pharmaceutiques.

Les résultats obtenus ont montré que la fermentation alcoolique en phase liquide à partir d'extraits de déchet de caroube peut conduire à des rendements élevés en bioéthanol sous réserve d'enrichir le milieu de culture par les éléments nécessaires pour la croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (en particulier l'azote), tandis qu'il est possible de produire directement le bioéthanol sur le déchet par fermentation en milieu solide sous réserve de contrôler précisément l'humidité. Nous avons également démontré que la fermentation lactique par immobilisation de *Lactobacillus rhamnosus* sur des billes d'alginate constitue une alternative possible au bioéthanol pour les sucres extraits du déchet. Cependant, un enrichissement du milieu de culture, ainsi que l'utilisation d'une invertase en prétraitement sont nécessaires afin de maximiser le rendement et la productivité de l'acide lactique. L'immobilisation des microorganismes a permis de réutiliser les mêmes billes d'alginate au cours de cinq cycles successifs de production. Une autre alternative potentielle aux voies précédentes est la fermentation sombre pour la production de biohydrogène directement à partir du déchet. Si des rendements intéressants ont été atteints, il faut noter que comme précédemment dans le cas de la fermentation solide du déchet, une forte dépendance aux conditions initiales de broyage a été mise en évidence ; de plus, à la carence en azote qui obligeait à supplémenter les milieux en fermentation en phase liquide s'ajoutent des besoins en fer. Enfin, l'utilisation du déchet comme substrat carboné dans un procédé de phycoremédiation avec l'algue *Ankistrodesmus braunii* a montré que l'élimination de 90% du diclofénac initial pouvait être atteinte en conditions de mixotrophie, même si seulement un tiers du diclofénac éliminé est effectivement métabolisé par l'algue.

## Mots-clés :

Déchet de caroube, extraction des sucres, bioéthanol, acide lactique, biohydrogène, phycoremédiation

# Abstract

This PhD thesis deals with the valorization of the solid waste generated by the Lebanese carob molasse process with the aim to produce bioenergy or high added-value platform molecules. The chemical analysis of this waste has highlighted that it contains 45% (w/w) sugars, which can be used as a substrate for alcoholic or lactic fermentation, the production of biohydrogen by dark fermentation, or as a carbon source for the growth of microalgae in a phycoremediation process (water treatment process based on algae/microalgae) for the removal of pharmaceutical micropollutants.

Experimental results have shown that high ethanol yield and productivity could be achieved through alcoholic fermentation in the liquid phase using extracts from carob waste as the substrate, provided the culture medium was enriched by complementary nutrients (especially a nitrogen source) to enhance the growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; in parallel, the direct production of ethanol from the solid waste based on solid-state fermentation was also proved to be efficient, provided humidity was accurately controlled. In addition, lactic fermentation performed with immobilized *Lactobacillus rhamnosus* on alginate beads was shown to constitute a potential alternative to bioethanol for the extracts from carob waste. An enriched culture medium was, however, necessary, together with the use of an invertase enzyme as a pretreatment so as to maximize the yield and the productivity of lactic acid. Using microorganism immobilization lead to the opportunity to recycle at least five times alginate beads in successive culture cycles. Another potential alternative to the above-mentioned valorization pathways was proved to lie in the dark fermentation process for biohydrogen production, directly using the solid waste. While attractive yields were reached, a strong dependence on the particle size from grinding pretreatment was emphasized, as in solid-state fermentation; moreover, iron supplementation in the culture medium was compulsory, in addition to nitrogen supplementation already described when fermentation was carried out in the liquid phase. Finally, when the carob waste was used as a substrate for the growth of the algae *Ankistrodesmus braunii* in a phycoremediation process, a removal yield of the initial diclofenac content about 90% could be reached under mixotrophic conditions, even though only one third of the diclofenac removed was effectively metabolized.

## Keywords

Carob waste, sugar extraction, bioethanol, lactic acid, biohydrogen, phycoremediation

# Table des matières

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>v</b>
<b>Mots-clés :</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vi</b>
<b>Keywords</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xi</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapitre 1. Etude bibliographique</b> .....	<b>19</b>
1.1 La caroube et le caroubier .....	19
1.1.1 Taxonomie.....	19
1.1.2 Historique.....	20
1.1.3 Distribution géographique .....	20
1.1.4 Production du caroubier .....	21
1.1.5 Composition chimique .....	22
1.1.6 Utilisation du caroubier.....	22
1.1.7 Reproduction biologique.....	24
1.1.8 Importance économique du caroubier.....	24
1.1.9 La mélasse de caroube et le déchet .....	26
1.2 La production de bioéthanol .....	26
1.2.1 Bioéthanol de première génération .....	27
1.2.2 Bioéthanol de deuxième génération.....	27
1.2.3 Bioéthanol de troisième génération .....	28
1.2.4 Généralités sur la production de bioéthanol par voie fermentaire.....	29
1.2.5 Avantages et inconvénients de l'utilisation du bioéthanol comme biocarburant.....	30
1.2.6 La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
1.2.7 Influence des paramètres environnementaux sur la production d'éthanol.....	36
1.2.8 Cas particulier de la fermentation alcoolique en milieu solide .....	37
1.2.9 Production d'éthanol à partir de caroube.....	40

## Table des matières

---

1.2.10	Conclusion.....	42
1.3	L'acide lactique comme molécule plateforme.....	42
1.3.1	Généralités.....	42
1.3.2	La production de l'acide lactique.....	43
1.3.3	Focus sur la production d'acide lactique par voie fermentaire à partir de glucose.....	44
1.3.4	Les producteurs d'acide lactique microbien.....	45
1.3.5	Optimisation de la fermentation lactique.....	49
1.3.6	Récupération de l'acide lactique.....	51
1.3.7	Conclusion.....	51
1.4	Biohydrogène de deuxième génération.....	52
1.4.1	L'hydrogène comme vecteur d'énergie du futur.....	52
1.4.2	La production d'hydrogène par fermentation sombre.....	54
1.4.3	Conclusion.....	59
1.5	Traitement des eaux pour l'élimination du diclofénac.....	60
1.5.1	Généralités sur le diclofénac.....	60
1.5.2	Procédés d'élimination du DCF.....	63
1.5.3	Phycoremédiation.....	71
1.5.4	Conclusion.....	72
1.6	Conclusion générale.....	72
1.7	Références.....	73
<b>Chapitre 2.</b>	<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>91</b>
2.1	Production du déchet de caroube.....	91
2.2	Analyses chimiques de la caroube et du déchet.....	93
2.2.1	Dosage des polyphénols.....	93
2.2.2	Dosage des sucres réducteurs.....	94
2.2.3	Dosage des sucres totaux.....	95
2.2.4	Dosages des lipides.....	95
2.2.5	Dosage des fibres.....	96
2.2.6	Mesure de l'humidité.....	96
2.2.7	Dosage des cendres.....	96
2.3	Extraction des sucres contenus dans le déchet de caroube.....	97
2.3.1	Hydrolyse acide.....	97
2.3.2	Extraction aqueuse.....	98
2.4	Production de bioéthanol.....	98
2.4.1	Souche de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	98
2.4.2	Pré-cultures.....	99
2.4.3	Cultures en milieu liquide.....	99

## Table des matières

---

2.4.4	Cultures en milieu solide .....	100
2.4.5	Culture en milieu semi-solide .....	101
2.4.6	Culture en réacteur de volume supérieur .....	101
2.4.7	Méthodes analytiques .....	101
2.5	Production d'acide lactique .....	103
2.5.1	Souche .....	103
2.5.2	Extraction des sucres à partir du déchet de caroube .....	103
2.5.3	Milieu de pré-culture .....	103
2.5.4	Immobilisation de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	104
2.5.5	Production en bioréacteur .....	104
2.5.6	Méthodes d'analyses .....	106
2.6	Traitement du diclofénac par <i>Ankistrodesmus braunii</i> .....	106
2.6.1	L'algue <i>Ankistrodesmus braunii</i> .....	106
2.6.2	Milieu de culture .....	106
2.6.3	Pré-culture et culture en présence de diclofénac .....	107
2.6.4	Suivi de croissance .....	107
2.6.5	Procédures analytiques .....	107
2.7	Production d'hydrogène par fermentation sombre .....	108
2.7.1	Préparation des boues activées .....	108
2.7.2	Milieus de culture .....	108
2.7.3	Préparation de l'inoculum .....	109
2.7.4	Culture en discontinu .....	109
2.7.5	Méthodes analytiques .....	110
2.8	Conclusion .....	111
2.9	Références .....	111
<b>Chapitre 3.</b>	<b>Valorisation du déchet de caroube en bioéthanol 2G .....</b>	<b>113</b>
3.1	Introduction .....	113
3.2	Article publié dans Bioresource Technology .....	114
3.3	Expériences complémentaires et conclusions .....	134
<b>Chapitre 4.</b>	<b>Valorisation du déchet de caroube en acide lactique .....</b>	<b>139</b>
4.1	Introduction .....	139
4.2	Article en cours de soumission .....	140
4.3	Conclusion .....	159
<b>Chapitre 5.</b>	<b>Valorisation du déchet de caroube en biohydrogène .....</b>	<b>161</b>
5.1	Introduction .....	161
5.2	Article soumis au Journal of Hydrogen Energy .....	162
5.3	Conclusion .....	189

## Table des matières

---

<b>Chapitre 6. Utilisation des extraits de déchet de caroube comme substrat dans une application de traitement des eaux par microalgues .....</b>	<b>191</b>
6.1 Introduction .....	191
6.2 Article en cours de finalisation .....	192
6.3 Conclusion .....	210
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>211</b>

## Liste des figures

Figure 1:1. Le caroubier ( <i>Ceratonia siliqua</i> ).....	20
Figure 1:2. Centre d'origine et distribution du caroubier dans le monde (Batlle et Tous, 1997).....	21
Figure 1:3. Gousses de différents cultivars de caroubiers libanais (Haddarah, 2013). ....	22
Figure 1:4. Principales filières de production de biocarburants avec focus sur le bioéthanol (Gnansounou, 2001).....	30
Figure 1:5. Schéma métabolique de la glycolyse couplée au cycle de Krebs et à la fermentation alcoolique (Poilpré, 2002). ....	34
Figure 1:6. Structure chimique des isomères de l'acide lactique.....	42
Figure 1:7. Voies métaboliques pour la production homofermentaire de l'acide lactique à partir du glucose (Martinez et al., 2013). ....	45
Figure 1:8. Voies métaboliques pour la production hétérofermentaire de l'acide lactique à partir du glucose (Martinez et al., 2013). ....	46
Figure 1:9. La filière hydrogène (©Connaissance des Énergies d'après CEA). ....	53
Figure 1:10. Mécanisme de production d'hydrogène par la fermentation sombre.....	57
Figure 1:11. Sources de la micropollution aqueuse par les produits pharmaceutiques (Bonnin, 2006).....	62
Figure 1:12. Mécanisme de dégradation du DCF par le chlore proposé par Miyamoto et al. (1997). ....	64
Figure 1:13. Principe de fonctionnement des bioréacteurs à membrane ou BAM/MBR – a) avec membrane externe et recirculation – b) avec membrane immergée (Grasmick et al., 2007). ....	66
Figure 1:14. Mécanisme de dégradation du DCF par ozonation et H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV proposé par Vogna et al. (2004). ....	69
Figure 1:15. Micrographes de cellules d' <i>Ankistrodesmus braunii</i> .....	71
Figure 2:1. Protocole de préparation du déchet de caroube (MH : masse totale ; MS : matière sèche).....	92
Figure 2:2. Photos de la caroube (à gauche) et du déchet (à droite). ....	93
Figure 2:3. Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols. ....	94
Figure 2:4. Courbe d'étalonnage du dosage des sucres totaux. ....	95
Figure 2:5. Protocole complet des essais d'extraction des sucres du déchet de caroube. ....	97
Figure 2:6. Réacteur de 500 mL utilisé pour la fermentation alcoolique en phase liquide.....	99
Figure 2:7. Réacteur de 6 L utilisé pour la fermentation alcoolique en phase liquide. ....	102
Figure 2:8. Spectrophotomètre (à gauche) et chaîne HPLC (à droite) utilisés. ....	103
Figure 2:9. Réacteur utilisé pour la production d'hydrogène de deuxième génération à partir de déchet de caroube.....	109
Figure 2:10. Chaîne micro-GC (à gauche) et compteur volumétrique (à droite) utilisés pour la mesure de la production et de la composition du biogaz. ....	110
Figure 3:1. Summary of the experimental conditions of this work for sugar extraction prior to submerged fermentation, and for solid-state fermentation. ....	117
Figure 3:2. Pareto charts of the standardized effects and p-values from ANOVA of temperature (T), time (t) and L/S ratio on ethanol concentration and sugar recovery in the fresh waste (C <sub>f</sub> and R <sub>t<sub>f</sub></sub> , respectively) and in the carob milled dried powder (C <sub>p</sub> and R <sub>t<sub>p</sub></sub> , respectively). The percentage corresponding to the cumulative effects is displayed together with the p-value of each effect. ....	123

## Liste des figures

---

Figure 3:3. Evolution of ethanol, biomass and sugar concentrations in the submerged fermentation broth with unenriched (a: UECW) and enriched (b: ECW) carob waste extracts.....	125
Figure 3:4. Evolution Solid-state fermentation. Pareto charts derived from ANOVA of the standardized effects with the p-value of each effect of the five-factor screening design (a) and of the three-factor central composite design (b). In (a), the percentage corresponding to the cumulative effects is also reported. ....	128
Figure 3:5. Solid-state fermentation. Evolution of ethanol yield (◆) and total sugars (■) in optimum conditions. ....	131
Figure 3:6. Evolution de la concentration en éthanol (g/L) au cours du temps lors de la fermentation en phase liquide avec changement d'échelle : réacteur de 500 mL (volume de travail de 450 mL) et réacteur de 6 L (volume de travail de 3 litres). ....	136
Figure 3:7. Evolution de la concentration en éthanol (g/L) au cours du temps lors de la fermentation avec déchet solide en suspension pour deux tailles de particules. ....	137
Figure 4:1. Plot of predicted vs. observed P and $Q_p$ values.....	148
Figure 4:2. Illustration of the influence of alginate concentration (A) and pH (B) on lactic acid production (a) and productivity (b). ....	150
Figure 4:3. Interaction plots between alginate concentration (A) and ACEB (D). Effect on: (a) lactic acid production P (g/L); (b) productivity $Q_p$ (g/L/h). ....	152
Figure 5:1. Cumulative hydrogen production and the corresponding Gompertz model. ....	175
Figure 5:2. Hydrogen yield and total sugar consumption obtained in the dark fermentation experiments: glucose complete medium, carob 2.5 mm complete medium, carob 5.0 mm complete medium, carob 5.0 mm iron medium, carob 5.0 mm iron + nitrogen medium. Error bars are based on triplicate experiments.....	176
Figure 5:3. Hydrogen productivity and final concentration of metabolites (acetic acid and butyric acid) obtained from dark fermentation experiments: glucose complete medium, carob 2.5 mm + complete medium, carob 5.0 mm + complete medium, carob 5.0 mm + iron medium, carob 5.0 mm + iron + nitrogen medium. Error bars are based on triplicate experiments. ....	176
Figure 5:4. Metabolites (lactic acid, butyric acid, acetic acid, propionic acid, ethanol) and substrate (glucose) evolution over fermentation time. a) Glucose complete medium, b) Carob 2.5 mm complete medium, c) Carob 5.0 mm complete medium, d) Carob 5.0 mm iron medium, e) Carob 5.0 mm iron + nitrogen medium. ....	179
Figure 6:1. Effect of the concentration of the carob syrup on <i>A. Braunii</i> growth. ....	197
Figure 6:2. Growth of <i>A. braunii</i> in the proteose-peptone (a), and the mixotrophic medium (b). ....	198
Figure 6:3. Growth curves of <i>A. braunii</i> cultured in the proteose-peptone (PP) and the mixotrophic media at different initial DCF concentrations (0, 10 and 20 mg/L, respectively) during 30 days of incubation for various inoculum concentrations: (a) $10^6$ cells/mL, (b) $10^5$ cells/mL. ....	199
Figure 6:4. Effect of the culture medium on DCF removal for an initial DCF concentration of 10 mg/L and an inoculum concentration of $10^6$ cells/ mL. ....	201
Figure 6:5. Effect of inoculum concentration on the removal of DCF in both media at (a) 10 mg/L, and (b) 20 mg/L of DCF. ....	203
Figure 6:6. Effect of DCF initial concentration on the elimination of DCF as a function of inoculum concentration: (a) 105 cells/mL, and (b) 106 cells/ mL. ....	203

## Liste des tableaux

Tableau 1:1. Avantages et inconvénients des filières d'utilisation du bioéthanol (Gnansounou, 2001). .	32
Tableau 1:2. Récapitulatif des principaux oligo-éléments nécessaires au métabolisme de la levure (Jones et al., 1981).	33
Tableau 1:3. Variété de substrats, produits et micro-organismes utilisés pour la fermentation solide (Hölker et al., 2004).	39
Tableau 1:4. Exemples de bactéries lactiques et de leur utilisation industrielle.	47
Tableau 1:5. Effets de la concentration en azote sur la production de dihydrogène par fermentation sombre (Wang et al., 2008).	59
Tableau 1:6. Propriétés physicochimiques du diclofénac (DCF).	60
Table 3:1. Composition of carob pulp and carob waste dry matter (%).	120
Table 3:2. Acid hydrolysis and extraction experiments on milled dried waste as a function of acid concentration and temperature (1 h contact time, L/S=5, particle size: 0.5 mm).	121
Table 3:3. Comparison between aqueous extraction of milled dried waste and of fresh waste as a function of temperature, time and L/S ratio (particle size: 0.5 mm).	122
Table 3:4. Comparison of sugar concentration after aqueous extraction on fresh waste, $C_c$ , and on mechanically cut fresh waste, $C_{fc}$ , as a function and temperature and contact time (L/S=3).	124
Table 3:5. Comparison of kinetic data from SF and SSF from this work on carob waste with literature data on carob pods.	127
Table 3:6. Summary of the results of the screening and the central composite designs for ethanol production using SSF ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ initial sugar).	129
Table 4:1. Range and levels of the independent variables in the Box–Behnken design.	144
Table 4:2. Experimental data (lactic acid production $P$ , yield $Y_{P/S}$ , and maximum productivity $Q_p$ ) collected in the runs of the Box–Behnken design as a function of the four main factors.	146
Table 4:3. ANOVA analysis for the three responses (significant p-values are in bold).	147
Table 4:4. Summary of ANOVA and coefficient estimates of the reduced models for $P$ and $Q_p$ , including df (degree of freedom), p (p-value) and the standard error of the estimates.	148
Table 4:5. Evolution of kinetic parameters of lactic acid production when recycling alginate beads.	153
Table 4:6. Kinetic parameters of lactic acid production from carob waste (CW) and carob waste treated with invertase enzyme (CWI).	154
Table 5:1. Experimental results obtained after 16 h culture in 125-mL glass bottles with different carbon sources. Initial pH: 6.0; initial sugar concentration: 6.0 g/L. Confidence intervals are based on triplicate experiments.	169
Table 5:2. Experimental results obtained after 16 h culture in 125-mL glass bottles at different pH values with carob waste. Initial sugar concentration: 6.0 g/L. Confidence intervals are based on triplicate experiments.	171
Table 5:3. Summary of the kinetic parameters of the dark fermentation process obtained from the Gompertz model.	173
Table 5:4. Summary of the hydrogen production results obtained in the dark fermentation experiments: glucose/complete medium, carob 2.5 mm/complete medium, carob 5.0 mm/complete medium, carob 5.0 mm/iron medium, carob 5.0 mm/iron + nitrogen medium. Confidence intervals are based on triplicate experiments.	174

## Liste des tableaux

---

Table 5:5. Final concentrations of the different metabolites formed in the dark fermentation experiments: glucose/complete medium, carob 2.5 mm/complete medium, carob 5.0 mm/complete medium, carob 5.0 mm/iron medium, carob 5.0 mm/iron + nitrogen medium. Confidence intervals are based on triplicate experiments. .... 180

Table 6:1. Removal yield of DCF determined by HPLC for an initial DCF content between 10 and 20 mg/L, and an inoculum concentration between  $10^5$  and  $10^6$  cells/mL after 30 days..... 206

# Introduction

Le caroubier (*Ceratonia siliqua*), qui appartient à la famille des légumineuses, est un arbre largement cultivé dans les pays méditerranéens, en particulier au Liban car il possède une grande capacité d'adaptation aux contraintes hydriques, tout en en présentant un grand intérêt à la fois économique, écologique et ornemental. Depuis des millénaires, son fruit, la caroube a été utilisée pour traiter les maladies, alors que son écorce et ses feuilles ont été employés dans la médecine traditionnelle comme antidiarrhéique et pour le traitement de la gastro-entérite chez les bébés. La caroube est utilisée par l'industrie agroalimentaire pour l'alimentation humaine et l'alimentation animale. L'arbre peut également être planté pour limiter la propagation des incendies, ou dans un but ornemental dans les jardins et les bordures des routes. En fin de compte, le caroubier reste considéré comme l'un des arbres fruitiers et forestiers les plus performants du bassin méditerranéen puisque presque toutes ses parties (feuilles, fleurs, fruits, bois, écorces et racines) sont encore utilisables.

La caroube est une gousse constituée par une pulpe enveloppant les graines. La pulpe est très riche en sucre, plus que la canne à sucre et la betterave sucrière. Ainsi, elle est utilisée dans la préparation de jus sucrés, du chocolat et comme substitut au cacao. En plus des glucides, la pulpe est riche en fibres alimentaires et en protéines, mais aussi en tanins et en polyphénols, ce qui confère à la caroube une activité antioxydante. Toutefois, c'est la graine qui reste la plus utilisée industriellement en Europe pour préparer la gomme de caroube, un agent de texture (E410) apprécié comme additif par l'industrie agroalimentaire, en particulier dans les crèmes glacées. Au Liban, la pulpe est souvent utilisée pour préparer la mélasse de caroube ou *Dibs el Kharroub*, un substitut au sucre qui présente l'aspect d'un sirop brun épais. La fabrication de cette mélasse suit un procédé d'extraction liquide/solide à l'eau, suivi par une concentration par évaporation jusqu'à l'obtention d'un sirop brun visqueux. Il s'agit d'un procédé traditionnel simple qui n'a jamais été étudiée dans la littérature, ni été rigoureusement optimisé. L'extraction génère un déchet solide qui est, en général, utilisé pour l'alimentation animale.

A l'heure où les ressources de combustibles et matières premières fossiles s'épuisent et que la demande mondiale en énergie continue de croître (augmentation de la population et du niveau de vie), la caroube, riche en sucre, peut constituer un point de départ potentiel intéressant pour certains pays du pourtour méditerranéen en vue de la production de molécules biosourcées, aussi bien dans un but de bioénergies que de valorisation matière, de façon à utiliser à la fois une ressource renouvelable et des procédés plus respectueux de l'environnement. Comme il s'agit également d'éviter un changement d'affectation des sols similaire à celui qui a été induit par les biocarburants

de première génération, l'objectif global de cette thèse est de valoriser le déchet solide résultant de la préparation de la mélasse de caroube libanaise.

Dans le détail, le premier objectif de cette thèse sera de caractériser le déchet issu la préparation de la mélasse de caroube, puis de définir une méthode capable de fournir les conditions optimales d'extraction des sucres correspondant à un compromis entre une récupération maximale des sucres et une concentration dans les extraits économiquement compatible avec les traitements en aval (fermentation ou autre). Dans ce travail, ce premier objectif qui impacte l'ensemble de la thèse, a été tout d'abord couplé à l'étude de la production d'éthanol biosourcé et renouvelable, le bioéthanol, à partir des extraits obtenus à partir du déchet industriel de caroube. En effet, le bioéthanol est une molécule plateforme pour la chimie, mais aussi un biocarburant moins toxique que le méthanol ou le biométhanol et qui permet également de réduire les émissions de dioxyde de carbone lors de sa combustion. Le bioéthanol peut donc être utilisé comme combustible alternatif à faible coût pour remplacer avantageusement les combustibles fossiles. Toutefois, son impact environnemental est amélioré lorsqu'il est produit à partir de déchets comme dans cette thèse (biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération) au détriment de son coût de production. Ainsi, après une étude bibliographique correspondant au chapitre 1 et une description des matériels et méthodes employés (chapitre 2), le chapitre 3 décrira non seulement l'extraction des sucres, mais aussi l'utilisation des extraits pour une fermentation en milieu liquide par la levure *S. cerevisiae*. Une comparaison avec une fermentation directe des déchets broyés en suspension qui couple extraction-fermentation sera également proposée. Leurs résultats seront comparés à ceux obtenus par une fermentation alternative en milieu solide qui pourrait présenter un intérêt pour l'industriel libanais car sa mise en œuvre est plus simple.

A partir de la composition des déchets et des résultats concernant l'extraction, il est apparu que d'autres voies de valorisation potentielles méritaient d'être étudiées. La première alternative que nous avons choisi d'analyser est la production d'acide lactique est qui est une molécule d'intérêt pour les industries alimentaire, cosmétique, textile, pharmaceutique et chimique et dont la demande est en forte croissance. Le but du chapitre 4 sera donc d'analyser, voire d'optimiser la fermentation lactique des sucres extraits du déchet de caroube pour la production d'acide lactique par fermentation avec immobilisation de *Lactobacillus rhamnosus*. La deuxième voie de valorisation alternative vise la production de biohydrogène qui fait actuellement l'objet de deux thèses au sein de l'axe GePEB de l'Institut Pascal (celles d'Alexandre Noblecourt et de Benoit Chezeau). L'hydrogène est considéré comme un vecteur énergétique alternatif très efficace et non polluant car sa combustion produit uniquement de l'eau. De plus, son pouvoir calorifique est élevé. En conséquence, l'objectif du chapitre 5 sera d'étudier la production de biohydrogène de deuxième génération par fermentation sombre en utilisant le déchet de caroube comme source de carbone.

Enfin, en lien avec mes travaux de master, j'ai également proposé l'utilisation du déchet de caroube comme substrat dans un procédé de remédiation des eaux utilisant les microalgues dont le but est l'élimination de micropolluants pharmaceutiques. Ceux-ci s'accumulent dans les eaux souterraines

## Introduction

---

et l'impact d'une exposition chronique de la faune et la flore, potentiellement négatif sur l'environnement, fait actuellement l'objet de recherches intensives. La molécule cible sera le diclofénac, un principe actif commercialisé sous le nom de Voltarène®. La stratégie utilisée dans le chapitre 6 consistera à cultiver la microalgue verte *Ankistrodesmus braunii* et à étudier sa capacité à éliminer le diclofénac ainsi qu'à définir les mécanismes d'élimination.

En fin de compte, ce travail permettra de démontrer le potentiel de valorisation du déchet de caroube issu de la production de la mélasse libanaise et permettra de fournir aux industriels du secteur des pistes pour une meilleure valorisation de ces déchets, en lien avec les besoins actuels croissants en molécules biosourcées comme matière première ou source d'énergie, en substitution des ressources fossiles dont le prix ne va, à terme, qu'augmenter.



# Chapitre 1. Etude bibliographique

L'objectif de ce chapitre est d'introduire les différents volets des travaux de thèse en débutant par la caroube qui est la biomasse que l'on désire valoriser et qui va servir de fil conducteur aux travaux qui ont été menés. La première partie de ce chapitre sera donc consacrée à la caroube et au caroubier. Toutefois, par rapport à des travaux très complets menés sur les variétés de caroube ou les propriétés fonctionnelles de certains constituants de ce fruit (Haddarah, 2013), nous nous limiterons aux points d'intérêt qui permettent de comprendre l'origine de la *mélasse de caroube* et du *déchet solide* qui résulte de sa production et qui se situe au cœur de nos travaux. Ensuite, nous présenterons à partir de la littérature différentes voies de valorisation possibles pour ce déchet sous forme de bioénergie (bioéthanol, biohydrogène), de molécules d'intérêt (acide lactique), voire comme substrat pour une application de phycoremédiation (traitement des eaux par microalgues) destinée à éliminer un micropolluant pharmaceutique. Chacune de ces applications correspondra à une partie de ce chapitre qui visera tout d'abord à décrire ces voies de valorisation et leurs applications à tous types de biomasses, pour ensuite se focaliser sur les applications spécifiques de la littérature mettant en jeu la caroube comme matière première. Par rapport aux travaux de la littérature, on retiendra également que notre matière première n'est pas la caroube, mais le déchet solide de caroube issu de la production de mélasse de caroube libanaise et donc qu'il n'existe pas, à notre connaissance, d'application décrite dans la littérature sur l'utilisation de ce déchet, quelle que soit la voie de valorisation considérée.

## 1.1 La caroube et le caroubier

### 1.1.1 Taxonomie

Le caroubier (Figure 1:1) est un arbre à feuillage persistant mesurant de cinq à sept mètres de hauteur, exceptionnellement plus, qui peut vivre plusieurs centaines d'années. Son tronc est généralement tordu, avec une écorce brune et rugueuse. *Ceratonia siliqua*, le nom scientifique de caroubier, dérive du grec *Keras* (corne) et du latin *siliqua* qui désigne une « silique » ou « gousse » et fait allusion à la dureté et à la forme du fruit, la caroube, qui ressemble à une « corne de bouc » (Bolonos, 1955). Il est également connu sous le nom de *pain de Saint Jean-Baptiste* (Batlle et Tous, 1997). Le genre *Ceratonia* appartient à la famille des légumineuses (*Fabaceae*) de l'ordre des Rosales, de la sous-famille des *Caesalpinioïdæ*. De plus, certains auteurs ont désigné *Ceratonia* comme étant l'un des genres les plus anciens des légumineuses (Tucker, 1992) et qui serait complètement isolé des autres genres de sa famille. Les fruits, appelées « caroubes » (« Kharroub » en arabe, « algarrobo »

en espagnol, « carroubo » en italien), sont des gousses de 10 à 30 cm de long pour 1 à 3 cm de large et 1 cm d'épaisseur qui sont brun foncé à maturité. Ces gousses contiennent des graines qui ont été utilisées pendant longtemps comme unité de poids pour peser les diamants à cause de leur uniformité quasi-parfaite, d'où le nom de « carat », soit 1 carat égal à 205,3 mg (Rejeb, 1995).



**Figure 1:1.** Le caroubier (*Ceratonia siliqua*).

### 1.1.2 Historique

Le lieu d'origine du caroubier demeure inconnu. Selon Petit et Pinilla (1995), cet arbre a été introduit par les Arabes dans la région méditerranéenne, en particulier en Espagne. Toutes les composantes de l'arbre sont utiles. Le fruit, très sucré, a été consommé dans les régions défavorisées, en particulier en temps de famine, même si la consommation humaine directe du fruit est actuellement anecdotique. Mais il peut aussi être utilisé pour l'alimentation des animaux domestiques (Abi Azar, 2007). Le bois est un bon combustible. Il a donc été cultivé par l'Homme depuis l'Antiquité.

Les caroubiers sont bien adaptés aux sols calcaires grâce à un système racinaire profond. Ce système offre au caroubier un potentiel d'adaptation aux différents types de sols et de conditions de salinité. Toutefois, le caroubier ne supporte pas des températures inférieures ou égales à  $-4^{\circ}\text{C}$  et il ne peut survivre à des températures inférieures à  $-7^{\circ}\text{C}$ . En revanche, il peut supporter des températures élevées allant jusqu'à  $40^{\circ}\text{C}$  accompagnées de vents secs.

### 1.1.3 Distribution géographique

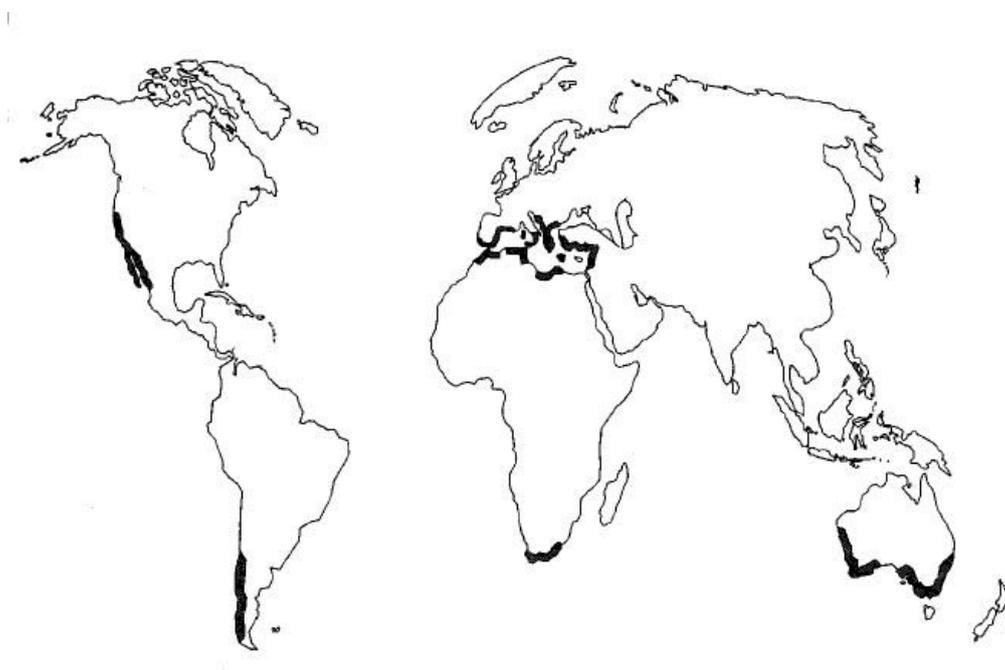
A l'état sauvage, Le caroubier semble être apparu au Moyen Orient et dans l'est du bassin méditerranéen, en particulier en Turquie, à Chypre, en Syrie, au Liban, en Israël, dans le sud de Jordanie, et

dans la péninsule arabique, puis il s'est répandu en Egypte, en Libye et en Tunisie avant d'atteindre l'ouest du bassin méditerranéen. Il a été disséminé par les Grecs en Grèce et en Italie, puis par les Arabes le long de la côte de l'Afrique du Nord, et enfin au sud et à l'est de l'Espagne. Dès lors, sa culture s'est diffusée au sud du Portugal et au sud-est de la France. Le caroubier a été également introduit avec succès dans plusieurs autres pays ayant un climat méditerranéen (Hillcoat et al., 1980), par exemple en Australie, en Afrique du Sud, aux Etats Unis (Arizona, Californie du Sud), aux Philippines et en Iran (Figure 1:2).

Au Liban, selon les régions, la caroube est appelée « kharroub » ou « kharnub ». La majeure partie de la population de *Ceratonia siliqua* se trouve dans la partie ouest du pays, dans les zones côtières et sur les pentes inférieures des montagnes côtières, de 20 à 800 m d'altitude (Haddarah et al., 2013). Les arbres situés à des altitudes plus élevées présentent souvent un aspect rabougri et chétif, sauf s'ils sont protégés par les parois d'une vallée, d'un rocher, ou par d'autres espèces végétales (Abi Azar, 2007).

### 1.1.4 Production du caroubier

La production annuelle mondiale de caroube, essentiellement méditerranéenne, est estimée à 310000 tonnes. Par ordre de production décroissante, elle est essentiellement concentrée en Espagne, en Italie, au Maroc, au Portugal, en Grèce, et en Turquie. Les producteurs moins importants sont Chypre, l'Algérie, le Liban, et en dernier, la Tunisie.



**Figure 1:2.** Centre d'origine et distribution du caroubier dans le monde (Batlle et Tous, 1997).

Ainsi, l'Espagne est le premier producteur et exportateur mondial de gousses de caroube avec une production d'environ 150 000 t/an ; elle couvre à elle seule 57,5% de la superficie cultivée et 47,6% de la production mondiale (Petit et Pinilla, 1995). La superficie en Europe, pour la production de

caroube est de 83 574 ha contre une superficie estimée à 1 000 ha pour l'Algérie et 13 460 ha pour l'ensemble des pays d'Afrique du Nord.

La production de caroube au Liban est estimée à 7 400 t/an à partir de 700 ha. Toutefois, le recensement du Ministère de l'Agriculture en 2010 estime la production annuelle du caroubier sur le territoire libanais à seulement 2200 tonnes (Haddarah et al., 2013). En pratique, il existe une grande variabilité phénotypique au sein et entre les cultivars (Batlle et Tous, 1997) ; celle-ci a d'importantes implications sur l'optimisation de la productivité de la culture du caroubier (Figure 1:3).

### 1.1.5 Composition chimique

Le fruit du caroubier, la gousse de caroube, est formé principalement de pulpe et des graines qui représentent respectivement 90% et 10% de son poids total. La graine est utilisée pour l'extraction de galactomannanes (Haddarah et al., 2013). Tandis que la pulpe de caroube est riche en hydrates de carbone (saccharose, fructose et glucose), ainsi qu'en fibres alimentaires, tanins et polyphénols ; elle contient également une faible quantité de protéines et de lipides (Bengoechea et al., 2008). La composition chimique précise varie selon la période de récolte, l'origine du cultivar (Figure 1:3) et les facteurs environnementaux.



**Figure 1:3.** Gousses de différents cultivars de caroubiers libanais (Haddarah, 2013).

### 1.1.6 Utilisation du caroubier

Le caroubier est un arbre d'importance écologique, industrielle et ornementale indiscutable. L'arbre et toutes ses parties (surtout les fruits), sont utilisés dans des secteurs très variés.

#### 1.1.6.1 L'arbre

Le caroubier est utilisé comme plante ornementale dans les jardins et pour la reforestation des zones abimées par l'érosion ou la désertification, vu sa faible exigence en culture et sa tolérance vis-

à-vis des sols pauvres (Batlle et Tous, 1997). Actuellement, il est considéré comme l'un des arbres fruitiers et forestiers les plus performants du bassin méditerranéen puisque toutes ses parties (feuilles, fleurs, fruits, bois, écorces et racines) sont utilisables. Si le bois peut être utilisé directement comme combustible, il est également très utilisé pour la fabrication de charbon de bois.

### 1.1.6.2 *Le fruit*

La caroube, très riche en éléments nutritifs, a longtemps été utilisée comme un aliment pour le bétail et la consommation humaine. La gousse est constituée par une pulpe enveloppant les graines. La farine de caroube, qui peut être produite soit à partir de la gousse, soit à partir des graines seules, est utilisée dans le traitement de la diarrhée et dans la suppression des parasites intestinaux. Elle est utilisée dans le secteur de l'agro-alimentaire pour la préparation de biscuits, de jus, et comme substituant du cacao car elle est plus calorique et ne contient ni caféine, ni théobromine. Pour ces applications, c'est toutefois la farine de graine de caroube qui est la plus employée. Vu son importance dans la croissance et la santé en post-sevrage, la farine de caroube a également été incorporée dans l'alimentation des porcelets (Lizardo et al., 2002).

La gomme de caroube est extraite à partir des graines de caroube. Ces graines sont constituées de trois différentes parties : une enveloppe (cuticule marron, 30-33%), un endosperme (blanc et translucide, 42-46%) et un embryon ou un germe (23-25%). Elle est utilisée dans l'agro-alimentaire comme épaississant (E410) pour la fabrication d'un grand nombre de denrées alimentaires : crème glacée, soupe, sauce, biscuit, tourte, confiserie, produits de boulangerie et dans l'alimentation animale, mais aussi dans le secteur de la cosmétique, de la pharmacie, et dans la fabrication d'un condiment aromatique du Sénégal appelé *netétou* (Ndir et al., 2000). La gomme de caroube peut être utilisée comme substitut de la pectine, de la gélatine, comme stabilisateur alimentaire, pour la croissance bactérienne et d'autres applications dans le textile (Calixto et al., 1982). La gomme de caroube peut exercer une action phyto-hormonale bénéfique et significative sur la croissance de la plante, agissant comme agent biofertilisant. Selon Coit (1967), la gomme de caroube est utilisée comme épaississant pour l'imprimerie et les encres, la photographie, le textile, les matières plastiques, le cirage...

La pulpe, très riche en sucre est souvent utilisée pour préparer des jus sucrés concentrés ou des sirops, par exemple le *pekmez* en Turquie et la mélasse de caroube ou *Dibs el Kharroub* au Liban sur laquelle nous reviendrons par la suite. Étant riche en antioxydants (composés phénoliques), en sucres, protéines, fibres, potassium et calcium, la pulpe est reconnue en thérapeutique pour ses effets hypocholestérolémiant, antiprolifératif et antidiarrhéique et pour son action sur les troubles digestifs. La plupart de ses actions pharmacologiques ont été attribuées à une activité antioxydante qui élimine les radicaux libres et/ou inhibe la peroxydation lipidique (Custodio et al., 2011).

### 1.1.6.3 *Les autres parties de la plante*

- *Les feuilles*

Les feuilles de caroubier ne tombent pas en automne ; persistantes, elles sont renouvelées partiellement au printemps tous les deux ans. Elles sont résistantes à la sécheresse, mais elles ne tolèrent pas le froid (Biner et al., 2007). De plus, le feuillage apporte une ombre appréciée dans les pays chauds. La valeur nutritive des feuilles du caroubier est de 0.25 UF/kg de matière sèche. Les feuilles sont riches en tanins ; la qualité nutritive des tanins est améliorée par l'utilisation des feuilles avec du polyéthylène glycol (PEG).

### - L'écorce

L'écorce du caroubier a été depuis longtemps utilisée en tannerie, particulièrement dans l'achèvement et l'émaillage des peaux (Batlle, 1997). En Turquie, elle a été également utilisée par la médecine traditionnelle comme remède anti-diarrhée.

Il n'existe, en revanche, pas d'utilisation connue pour les fleurs et les racines.

### 1.1.7 Reproduction biologique

Le caroubier est dioïque, parfois hermaphrodite. Les pieds mâles sont stériles et improductifs. Il est considéré comme le seul arbre méditerranéen qui fleurisse en été, d'août à octobre (Aafi, 1996), et en automne de septembre à novembre. Cependant, le moment et la durée de période de la floraison dépendent des conditions climatiques, ce qui est le cas pour la plupart des arbres fruitiers (Batlle et Tous, 1997).

La pollinisation des fleurs du caroubier est, en grande partie, assurée par les insectes, mais aussi par le vent (Passos de Carvalho, 1988). Les fleurs sécrètent des substances nectarifères dont la quantité et la contenance en sucre sont élevées dans la fleur femelle par rapport à son homologue mâle. La fructification, chez le caroubier, se situe entre juillet et décembre de l'année qui suit la floraison selon les régions et les cultivars (Aafi, 1996). La variation dans l'intensité d'inflorescence et la production des gousses est plus liée à des facteurs endogènes qu'aux aléas climatiques (Konate, 2007). Toutefois, des conditions environnementales défavorables peuvent entraver d'une manière significative la production des fruits (Batlle et Tous, 1997).

Le fruit du caroubier se développe très lentement, nécessitant 9 à 10 mois pour atteindre la maturité. Il est de grande taille, 10 à 30 cm de longueur et 2 à 3,5 cm de largeur et indéhiscents après maturité. Il est vert puis brun et au moment de la maturité, brun foncé à noir. Il est sinueux sur les bords, aplati, droit ou arqué et présente un tissu pulpeux sucré et rafraîchissant. La gousse est séparée à l'intérieur par des cloisons pulpeuses et renferme 12 à 16 graines brunes dont la longueur et la largeur sont respectivement de 8 à 10 mm et de 7 à 8 mm (Batlle et Tous, 1997).

### 1.1.8 Importance économique du caroubier

Le caroubier (*Ceratonia siliqua*) possède une grande capacité d'adaptation aux contraintes hydriques, ce qui lui offre d'énormes intérêts socio-économiques et écologiques. Il peut être utilisé pour limiter la propagation des incendies, ou dans un but ornemental dans les jardins et les bordures

des routes (Batlle et Tous, 1997). Il peut également être utilisé pour la reforestation et le reboisement des zones arides et dégradées.

Le caroubier a une importance remarquable au niveau économique, grâce à ses graines qui sont utilisées pour l'extraction de gomme de caroube, ce qui donne au caroubier une grande importance dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et pour un grand nombre d'autres applications.

Par ailleurs, la pulpe de caroube est très riche en sucre, plus riche que la canne à sucre et la betterave sucrière (Limtong et al., 2007 ; Haankuku et al., 2015) ; elle constitue donc une ressource bon marché en hydrates de carbone utilisable pour la production de bioéthanol. En effet, le sucre représente le constituant majeur de la pulpe (environ 500 g/kg) ; cette quantité varie selon de nombreux facteurs tels que l'origine géographique, les conditions climatiques, la diversité entre les variétés, la récolte et le stockage (Owen et al., 2003 ; Papagiannopoulos et al., 2004). En fait, la pulpe du fruit contient, en plus des glucides, des fibres alimentaires, des protéines, des tanins, des polyphénols (Papagiannopoulos et al., 2004), pour une teneur négligeable en matières grasses, mais avec une teneur appréciable en minéraux. Le saccharose est le sucre le plus abondant dans la gousse de caroube (Calixto et al., 1982), suivi par le glucose et le fructose ; les teneurs en autres sucres (xylose, maltose) sont plus faibles.

La caroube contient également 16 à 20 % de polyphénols ; cette quantité varie selon l'origine géographique et les conditions climatiques, le mode de récolte et celui de stockage (Papagiannopoulos et al., 2004). De nombreuses études ont décrit l'activité antioxydante de la caroube qui résulte de la présence de polyphénols (Hariri et al., 2009). Les polyphénols bruts de la gousse ont un effet protecteur contre la décoloration du  $\beta$ -carotène (Kumazawa et al., 2002).

La farine de germe de caroube obtenue à partir des graines est plus riche en protéines (52 % avec une teneur élevée en lysine et arginine) que celles de pois et de soja ; elle contient encore plus de carbohydrates (27 %). La farine de gousse de caroube broyée contient à peu près 4,45% de protéines, dont les acides aminés suivants : acide aspartique, asparagine, alanine, acide glutamique et glutamine, leucine et valine ; ceux-ci représentent 57 % de la teneur totale en acides aminés des gousses (Ayaz, 2009)

Enfin, la poudre de caroube contient environ 2 à 6 % de cendres selon le type de caroube (Avallone et al., 1997 ; Albanell et al., 1991) dont de nombreux sels minéraux essentiels. La gousse est une bonne source de potassium (802 mg/100 g), de calcium (440 mg/100 g) et de sodium (10,1 mg/100 g). De même, de nombreux autres oligo-éléments et des sels minéraux sont présents dans des quantités importantes : fer (2,34 mg/100 g), magnésium (66,9 mg/100 g), manganèse (0,56 mg/100 g), zinc (0,70 mg/100 g), cuivre (0,62 mg/100 g), et phosphore (31,58 mg/100 g) (Petit et Pinilla, 1995).

### 1.1.9 La mélasse de caroube et le déchet

La mélasse de caroube, ou *Dibs el Kharroub*, est un sirop brun épais extrait de la pulpe dégrainée de la gousse très utilisé au Liban comme substitut au sucre raffiné. Elle contient au moins 64% de glucides. Elle est produite localement par une quarantaine de sociétés privées. Elle peut être incorporée dans des préparations culinaires ou se consommer comme dessert. C'est un produit populaire car il est local, naturel et son prix est très accessible.

La fabrication de la mélasse suit un procédé d'extraction liquide/solide à l'eau, suivi par une concentration par évaporation jusqu'à l'obtention d'un sirop brun visqueux. Il s'agit d'une méthode traditionnelle simple qui n'a jamais été étudiée dans la littérature, ni été rigoureusement optimisée. Un exemple de procédé utilisé par les industriels locaux sera décrit dans le chapitre 2 (page 91). L'extraction génère un déchet solide qui est, en général, utilisé pour l'alimentation animale.

*Le but de cette thèse est la valorisation de ce déchet solide qui reste riche en sucre, compte tenu du caractère traditionnel et empirique du procédé d'extraction dont le but est d'être simple et peu coûteux et pour lequel il n'existe pas de données dans la littérature pour les raisons qui viennent d'être évoquées ainsi qu'à cause du fait que la production de mélasse de caroube est limitée géographiquement au Liban. En conséquence, cette étude bibliographique va maintenant s'intéresser à des voies potentielles de valorisation de ce déchet, principalement sous forme de molécules à valeur ajoutée ou de bioénergie. Un autre point commun aux voies de valorisation qui ont été choisies est qu'elles mettront en jeu des bioprocédés.*

## 1.2 La production de bioéthanol

L'éthanol (ou « alcool éthylique », souvent appelé par abus « alcool », de formule chimique  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) peut être produit par synthèse chimique à partir d'hydrocarbures, ou par fermentation à partir de biomasse. Dans ce dernier cas, on le nomme parfois « bioéthanol » ou « agroéthanol », bien qu'il n'existe aucune différence de propriétés entre l'éthanol produit par voie chimique et par voie fermentaire.

L'utilisation de la biomasse végétale permet d'éviter l'émission de 50 à 80 % de  $\text{CO}_2$  selon les applications par rapport à l'équivalent d'origine fossile. L'alcool d'origine agricole, obtenu par voie fermentaire, est largement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire, dans les industries chimiques, pharmaceutiques et parapharmaceutiques, en particulier la parfumerie. L'éthanol est miscible avec l'eau en toutes proportions. En général, il est hydraté car il présente un azéotrope avec l'eau à 96% (ou 96°). L'utilisation de l'alcool anhydre (pureté 99,8%) est donc rare.

Dans le domaine de l'énergie, il peut être utilisé majoritairement comme carburant (le bioéthanol à 65-85% dans un mélange avec l'essence est commercialisé sous le nom de superéthanol E85) ou comme additif minoritaire également avec l'essence (le supercarburant SP95-E10 contient 10% de bioéthanol) et plus rarement avec le biodiesel (sous divers noms, comme l'Estérol), ou bien converti en ETBE (éthyl-tertio-butyl-éther) qui peut également être utilisé comme additif dans l'essence

jusqu'à 15%. La consommation mondiale d'énergie augmente, principalement à cause de la démographie, mais aussi de l'urbanisation et de l'industrialisation des sociétés humaines. Or, les réserves de combustibles fossiles diminuent et leurs prix sont instables, ce qui encourage la recherche de nouvelles sources d'énergie qui sont à la fois renouvelables et respectent mieux l'environnement. Le bioéthanol constitue une de ces sources potentielles d'énergie renouvelable car il combine une haute efficacité énergétique et un faible impact environnemental puisqu'il peut être produit par fermentation microbienne en utilisant une grande variété d'hydrates de carbone, tels que l'amidon, le sucre, ou la cellulose (Turhan et al., 2010). En fonction de la nature de la biomasse utilisée, on distingue trois générations de bioéthanol que nous allons décrire ci-dessous.

### 1.2.1 Bioéthanol de première génération

Le bioéthanol de première génération est produit à partir de sucre ou d'amidon. Au Brésil, le sucre est obtenu à partir de canne à sucre. Les Etats-Unis produisent l'éthanol à partir d'amidon, généralement à partir du maïs, mais aussi à partir du blé. Les autres grands pays producteurs d'éthanol sont la Chine, le Canada, la France, l'Allemagne et la Suède (Lennartson et al., 2014). En France, le substrat est la betterave à sucre (Fargione et al., 2008).

Si pour la canne et la betterave à sucre, une extraction des sucres suffit, la première étape de la production d'éthanol à partir de céréales consiste à broyer et à liquéfier l'amidon. La liquéfaction est suivie par l'hydrolyse ou saccharification qui libère les monosaccharides (glucose) dans la solution. Pendant la fermentation, par exemple avec la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les monomères de sucre sont convertis en éthanol et en dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>. Habituellement, on obtient une concentration en éthanol d'environ 10% (p/v) en fin de fermentation. Une étape de distillation est nécessaire pour concentrer l'éthanol.

Cependant, l'utilisation de biomasse dédiée à l'alimentation humaine, ou la substitution de cultures dédiées à l'alimentation humaine par des cultures énergétiques (phénomène appelé CASI, ou *changement d'affectation des sols indirect*) pour la production d'éthanol a conduit à des discussions éthiques considérables et au débat « nourriture contre carburant ». Ainsi, l'UE souhaite réduire la proportion de bioéthanol de première génération dans le SP95-E10 à 7% dès 2020 et à 3,8% en 2030.

### 1.2.2 Bioéthanol de deuxième génération

Le bioéthanol de deuxième génération (ou *bioéthanol 2G*) utilise différents types de matériaux lignocellulosiques en qualité de substrat sans concurrence d'usage avec l'alimentaire. Les substrats sont par exemple la paille de céréales, le miscanthus, les bois et résidus forestiers, des cultures dédiées qui ne concurrencent pas l'alimentation humaine ou animale, etc. L'utilisation de déchets alimentaires est également possible.

Les procédés de production d'éthanol de deuxième génération n'ont techniquement aucun problème avec la disponibilité des matières premières car 7-18 milliards de tonnes/an de biomasse

lignocellulosique sont disponibles. Toutefois, la production de bioéthanol de deuxième génération doit encore relever trois défis (Cheng et Timilsina, 2011).

Le premier défi technique réside dans la nécessité de prétraitements de la biomasse récalcitrante car, comme pour les céréales, les sucres ne sont pas immédiatement disponibles. Ce prétraitement sévère, peut affecter la fermentation alcoolique par la formation de composés inhibiteurs. Le coût de ce prétraitement impacte également très fortement le prix du bioéthanol de deuxième génération par rapport à celui de première génération.

Le deuxième défi est le coût nécessaire pour la production d'enzymes efficaces pour hydrolyser la cellulose. Des améliorations majeures ont été réalisées par les fabricants d'enzymes, ce qui réduit le coût de l'enzyme à 0,13 USD/L d'éthanol (Geddes et al., 2011). Toutefois, des progrès sont encore nécessaires.

Troisièmement, il faut atteindre des concentrations en éthanol suffisamment élevées dans le moût dans le but de réduire le coût de la distillation et le traitement des eaux usées. Un objectif de 4,0 à 4,5 % (p/v) est généralement demandé (Lennartsson et al., 2014). Un problème supplémentaire est que la biomasse de deuxième génération contient une part non négligeable d'hémicellulose qui conduit à la formation de pentoses. Or, la levure *S. cerevisiae*, le micro-organisme le plus utilisé dans la fermentation alcoolique, est incapable de fermenter les pentoses produits par l'hydrolyse de l'hémicellulose. Des organismes modifiés génétiquement sont nécessaires pour surmonter ce problème (Madhavan et al., 2012), mais les essais de fermentation couplée des pentoses et hexoses sont rares et une fermentation séparée semble préférable, ce qui implique des étapes additionnelles de séparation et donc une augmentation du coût du procédé.

En résumé, cette génération de biocarburants est maintenant en phase d'industrialisation. En France, le principal projet de production de bioéthanol de deuxième génération est le projet FUTUROL porté par l'IFP Energies Nouvelles (<http://projet-futurol.com/>). L'utilisation du déchet de mélasse de caroube pour la production de bioénergie correspond en tous points aux biocarburants de deuxième génération.

### 1.2.3 Bioéthanol de troisième génération

Les biocarburants de troisième génération se concentrent sur l'utilisation d'organismes marins tels que les microalgues. Ceux-ci peuvent être produits extensivement dans des bassins ou dans des procédés intensifiés à base de photobioréacteurs. Ils sont censés présenter des rendements supérieurs et atteindre des rendements annuels plus importants à l'hectare que les procédés de première et deuxième génération, tout en limitant l'utilisation des matières premières grâce à la photosynthèse et l'utilisation des sols, par exemple dans le cas de microalgues marines (Jambo et al., 2016). Même si la filière « lipide » destinée à la production de biodiesel est la plus répandue, certaines microalgues sont capables de produire des sucres qui pourront être fermentés classiquement.

Toutefois, les biocarburants de troisième génération sont encore au stade de la recherche et leurs coûts sont encore très loin d'être compétitifs, non seulement avec ceux d'origine fossile, mais également avec ceux de la deuxième génération. Dans nos travaux, nous n'utiliserons donc pas les microalgues pour la production de biocarburants, même si une application mettant en jeu des microalgues sera développée dans la partie 1.5.

### 1.2.4 Généralités sur la production de bioéthanol par voie fermentaire

Seule la production de bioéthanol par voie fermentaire étant utilisée dans ce travail, nous restreindrons notre étude bibliographique à ce volet. La production d'éthanol par voie fermentaire est un procédé bien connu qui dépend de différents facteurs, en particulier la matière première, les micro-organismes impliqués et les technologies de mise en œuvre.

La matière première doit être un substrat riche en sucres susceptibles d'être fermentés, donc des sucres simples de type hexose (glucose, fructose...), des diosides à base d'hexoses (saccharose, lactose...), ou bien des composés cellulosiques ou amylacés qui peuvent être hydrolysés en hexoses simples. Industriellement, les principales sources de matières premières les plus utilisées sont les jus de betterave à sucre, les mélasses de canne à sucre ou de betterave...

Plusieurs micro-organismes sont capables de réaliser la fermentation alcoolique des sucres : ce sont des levures et des bactéries telles que *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Hansenia*, *Pachia*, *Bacillus*... Parmi les levures utilisées pour la fermentation alcoolique, la levure *Saccharomyces cerevisiae* connue sous le nom de « levure de boulanger » est la plus utilisée.

Le procédé de fermentation consiste en une utilisation de matières organiques comme source de carbone extracellulaire par les micro-organismes. Ces derniers utilisent leurs enzymes afin d'activer des voies métaboliques correspondant à des réactions chimiques intracellulaires qui vont libérer de l'éthanol extracellulaire.

La fermentation est l'étape clé dans le procédé de production du bioéthanol. Dans le cas du glucose, l'équation-bilan est la suivante :



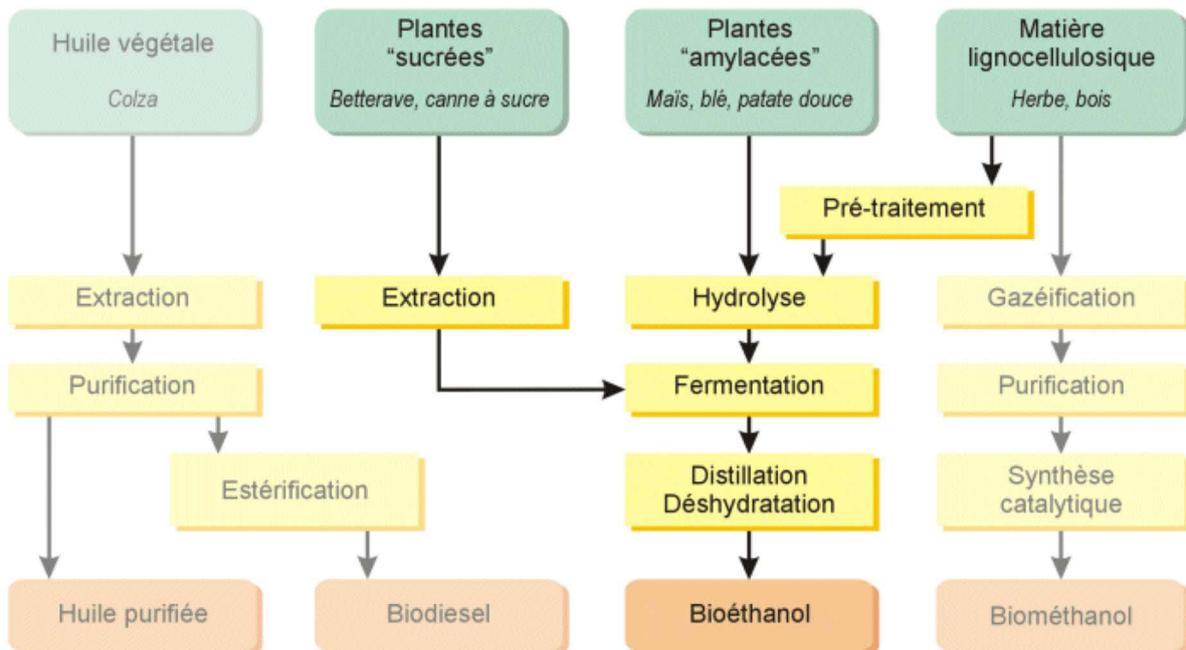
La fermentation alcoolique ne nécessite pas d'oxygène et peut être conduite en anoxie ou anaérobie car son rendement énergétique par mole de glucose (identique à celui de la fermentation lactique) est de l'ordre de 2%, contre 30 à 40% pour la respiration cellulaire.

Comme la fermentation est limitée à 15% v/v à cause de la toxicité de l'éthanol pour le micro-organisme, une étape de distillation est nécessaire. Si la distillation est sans aucun doute l'opération unitaire de séparation la mieux maîtrisée dans le domaine du Génie des Procédés, elle reste énergétiquement et économiquement l'étape la plus coûteuse de la fabrication de l'alcool.

### 1.2.5 Avantages et inconvénients de l'utilisation du bioéthanol comme biocarburant

Les besoins en carburant pour le transport et la mobilité, ainsi que la tension sur le marché des hydrocarbures ont naturellement contribué au développement du bioéthanol comme additif dans le SP95-E10 ou comme biocarburant majoritaire dans les véhicules « flex fuel » capables de rouler au superéthanol E85. Les filières de production correspondent à la première et à la deuxième génération, comme illustré par la Figure 1:4 qui résume les paragraphes précédents. De plus, le bioéthanol présente des avantages avérés par rapport aux carburants d'origine fossile :

- Il présente un indice d'octane élevé pour un coût relativement réduit et il est donc bien adapté aux moteurs à essence.
- L'éthanol est non toxique ; il présente un risque moins élevé de formation d'ozone pendant la combustion que l'essence ou le diesel ; s'il est soluble dans l'eau, il est rapidement biodégradé. Sa toxicité est inférieure à celle de méthanol qui constitue une alternative possible. Son ajout permet également d'abaisser la teneur en benzène des essences.
- Il réduit les émissions de particules fines qui ont un effet néfaste sur la santé des enfants et des personnes qui souffrent de troubles respiratoires.
- Il réduit les émissions de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) par rapport aux carburants conventionnels. Si l'on tient compte de l'aspect toxicité rapporté précédemment, il conduit à une réduction de l'impact environnemental du moteur à combustion.
- Enfin, il permet de réduire la dépendance des pays occidentaux aux importations de dérivés pétroliers et présente un intérêt économique important pour ces pays (amélioration de la balance commerciale, diversification agricole...).



**Figure 1:4.** Principales filières de production de biocarburants avec focus sur le bioéthanol (Gnansounou, 2001).

Toutefois, l'utilisation du bioéthanol dans les carburants présente également quelques inconvénients majeurs :

- La combustion de l'éthanol pur produit une flamme invisible qui peut provoquer des problèmes de sécurité.
- Le mélange des carburants provenant du pétrole est plus énergétique que le bioéthanol, ce qui entraîne une consommation plus élevée du mélange ; de plus, ce dernier est plus corrosif que l'essence (Balat et al., 2008).
- Augmenter la proportion d'éthanol au-delà de 5% réduit la tension de vapeur du mélange, ce qui peut poser des problèmes de démarrage à froid.
- L'éthanol tend à s'hydrater, ce qui peut nécessiter une modification des moteurs ; de plus, les mélanges essence/bioéthanol peuvent conduire à une séparation de phase en présence d'eau. Ce risque est encore plus sensible dans les mélanges bioéthanol/biodiesel.
- La combustion des mélanges essence/bioéthanol peut produire du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde, ainsi que du nitrate de peroxyacétyle (PAN) qui sont des composés toxiques.

Les différentes filières d'utilisation du bioéthanol dans les biocarburants sont résumées dans le Tableau 1:1 avec le détail de leurs avantages et de leurs inconvénients respectifs.

En conclusion, la production de bioéthanol est une voie de substitution des combustibles fossiles qui présente un avantage environnemental, sous réserve de favoriser la production de deuxième génération, la troisième génération étant encore trop éloignée de l'industrialisation. Toutefois, la production de bioéthanol de deuxième génération se heurte encore à de nombreux obstacles, scientifiques et techniques, mais surtout économiques.

### 1.2.6 La levure *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* est le micro-organisme le plus utilisé pour la production d'éthanol par voie fermentaire. Les levures *Saccharomyces* appartiennent au règne des champignons, à la division (embranchement) des *Ascomycota* (*Ascomycètes*), à la sous-division des *Saccharomycotina*, à la classe des *Saccharomycètes*, à l'ordre des *Saccharomycetales* et à la famille des *Saccharomycetaceae*. Ces levures sont des eucaryotes unicellulaires. La taille d'une levure peut varier entre 1 et 9  $\mu\text{m}$  de longueur et de 1 à 5  $\mu\text{m}$  de largeur ; elle est de forme sphérique ou ovale et elle se divise par bourgeonnement. Leur métabolisme est de type aérobie ou anaérobie facultatif. Depuis plus de 3000 ans, elles sont utilisées pour la fabrication du pain. Mais c'est seulement entre 1857 et 1863 que Louis Pasteur a démontré le rôle de la levure dans la fermentation alcoolique (FA). En pratique, *Saccharomyces cerevisiae* est capable d'assimiler un grand nombre de substrats carbonés, mais incapable d'utiliser l'amidon. Sur le plan académique, cette levure est devenue un des organismes modèles des eucaryotes ; elle compte parmi les mieux connus et les plus étudiés. Ses caractéristiques les plus importantes sont les suivantes d'après Leveau et Bouix (1993) :

- elle peut résister à la pression osmotique ;
- elle est stable génétiquement dans le temps ;

## Etude bibliographique

- elle assure une bonne conversion du glucose en éthanol grâce à sa tolérance à l'éthanol.

**Tableau 1:1.** Avantages et inconvénients des filières d'utilisation du bioéthanol (Gnansounou, 2001).

	Avantages	Inconvénients	Applications
<b>Ethanol hydraté</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation directe</li> <li>- Coût de production moins élevé que l'éthanol anhydre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La modification des moteurs est nécessaire</li> <li>- Problème de fonctionnement à froid pour le moteur diesel</li> </ul>	Voitures 100 % éthanol au Brésil ainsi qu'en Suède, avec plus de 400 bus développés par Scania (en circulation à ce jour) à partir de moteurs diesel
<b>Ethanol anhydre en mélange avec l'essence</b>	Mélange jusqu'à 15 % sans nécessité de modification du moteur	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coûts plus élevés liés à la fabrication de l'éthanol</li> <li>- Augmentation de la pression de vapeur</li> </ul>	Utilisation d'un mélange à 24% au Brésil sans modification du moteur dans les véhicules à essence.
<b>Ethanol anhydre en mélange avec le diesel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ethanol mélangé à hauteur de 3% sans modification du moteur, ni additif</li> <li>- Ethanol mélangé à hauteur de 10-15%, mais avec un solubilisant empêchant la démixtion</li> </ul>	Phase pilote Technique nouvelle	Mélange à 3 % testé au Brésil Mélange à 10-15 % testé en Suède et au Danemark (autobus)
<b>ETBE (éthyl-tertio-butyl-éther)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indice d'octane élevé</li> <li>- Faible pression de vapeur</li> <li>- Tolérance à l'eau</li> </ul>	La production d'ETBE nécessite une matière première (naphta), qui n'est pas disponible avec un coût acceptable pour toutes les industries.	La filière d'utilisation du bioéthanol la plus largement développée en Europe : 10 à 15% ETBE dans l'essence (France, Espagne, Hollande, Italie)
<b>Estérol (mélange bioéthanol et biodiesel)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas nécessaire de modifier le moteur</li> <li>- Prix compétitif</li> <li>- Diminue l'émission des gaz à effet de serre.</li> <li>- Densité énergétique meilleure que l'éthanol.</li> </ul>	Phase de test	En phase de test en Suède et aux USA

Le métabolisme de la levure utilise de nombreux éléments nutritifs présents en faibles quantités, tels que l'azote, le soufre, le phosphore, certains acides aminés, des vitamines et des oligo-éléments. Ceux-ci sont indispensables pour sa croissance et pour maintenir sa capacité à produire de l'éthanol. Parmi ceux-ci, on peut noter :

- *Le phosphore* : la seule source phosphore pour *S. cerevisiae* est l'orthophosphate ; elle l'utilise sous forme d'ion monovalent. Il est nécessaire pour la synthèse des lipides et des hydrates de carbone et pour maintenir l'intégrité membranaire (Winter, 1988).

## Etude bibliographique

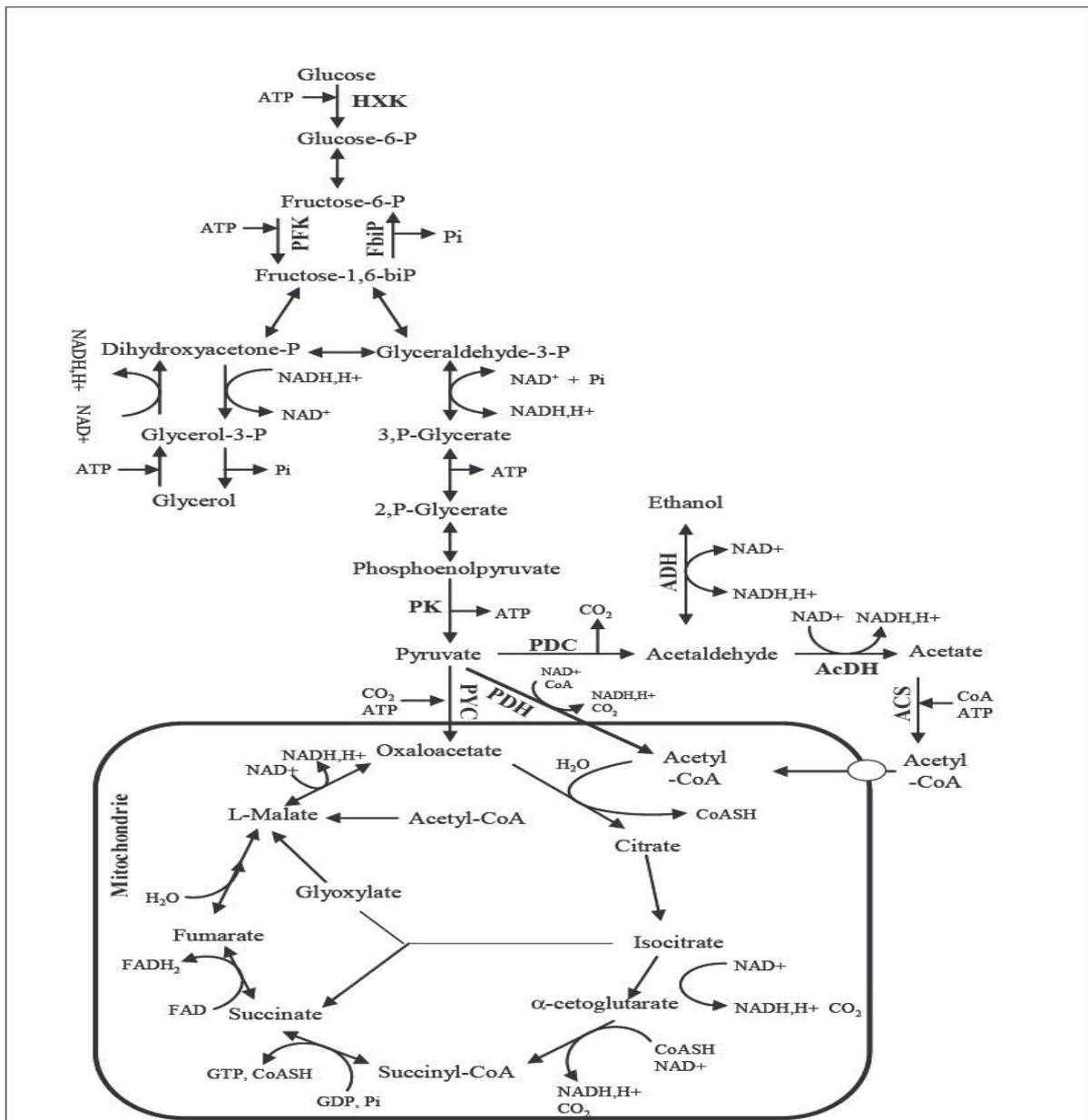
- *L'azote* : les acides aminés et certains peptides sont utilisés par les levures comme source d'azote, mais les ions ammonium sont plus facilement assimilables (Winter, 1988).
- *Le soufre* : il est généralement assimilé sous la forme inorganique d'ions sulfate  $SO_4^{2-}$  ; dans la cellule, il est transformé en méthionine.
- *Les vitamines* : elles jouent le rôle de co-enzymes ou de précurseurs d'enzymes. Ainsi, elles permettent une régulation du métabolisme de la levure. Par conséquent, l'assimilation et le stockage de certaines vitamines telles que la biotine, le myo-inositol et les acides pantothénique et nicotinique conditionnent les futures capacités de croissance et de production de la levure (Winter, 1988). Ces vitamines jouent également un rôle majeur dans la tolérance à l'éthanol.
- *Les oligo-éléments* : leur rôle est résumé dans le Tableau 1:2. Ils sont divisés en macro et microéléments. Toutefois, certains oligoéléments, s'ils sont présents en excès, peuvent devenir des inhibiteurs.

**Tableau 1:2.** Récapitulatif des principaux oligo-éléments nécessaires au métabolisme de la levure (Jones et al., 1981).

Classe	Ions	Rôles
Macro-éléments	$K^+$	Participe à la régulation du pH intracellulaire. L'excrétion de $K^+$ sert à contre balancer l'entrée d'ions du type $Zn^{2+}$ et $Co^{2+}$
	$Mg^{2+}$	$Mg^{2+}$ participe au transport des sucres. Sa concentration est régulée par un système de transport de cation divalent
	$Ca^{2+}$	$Ca^{2+}$ joue un rôle dans la protection de la levure contre les agressions environnementales
	$Zn^{2+}$	Elément essentiel de la glycolyse, il intervient comme co-facteur Deux ions $K^+$ sont excrétés pour chaque $Zn^{2+}$ assimilé
	$Mn^{2+}$	Stimule la synthèse des protéines
	$Fe^{2+}, Fe^{3+}$	Participent aux sites actifs de certaines protéines
	$Na^+$	Diffuse passivement à travers la cellule Stimule le transport des sucres
	$Cl^-$	Joue le rôle de régulateur avec les ions positifs
Micro-éléments	$Mo^{2+}$ $Co^{2+}$ $B^{2+}$	Stimulent la croissance pour de faibles concentrations

## Etude bibliographique

Chez *S. cerevisiae*, selon les conditions d'aération, le glucose peut être métabolisé selon deux voies métaboliques principales : la voie de type respiratoire et la voie de type fermentaire. Les deux voies sont résumées sur la Figure 1:5. La glycolyse est une première étape commune aux deux voies. La première étape de la glycolyse est le transport de glucose à travers la membrane par un mécanisme de diffusion facilitée à l'aide d'une perméase ; les transporteurs ont des affinités différentes pour le glucose. Par exemple, les gènes HXT 1 et 3 codent pour des transporteurs ayant une faible affinité pour le glucose ; en revanche, les gènes HXT 6 et 7 codent pour des transporteurs ayant une forte affinité pour le glucose, alors que HXT 4 aurait une affinité intermédiaire.



**Figure 1:5.** Schéma métabolique de la glycolyse couplée au cycle de Krebs et à la fermentation alcoolique (Poilpré, 2002).

Lorsque le glucose est dégradé par la voie de la glycolyse, encore appelée voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), un intermédiaire est formé, le fructose-1,6-biphosphate dont la synthèse nécessite 2 ATP. Puis, le fructose-1,6-biphosphate est transformé en deux trioses-phosphate : le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) grâce à une aldolase. Enfin, le G3P est transformé en 1,3-bisphosphoénolpyruvate et en pyruvate, ce qui s'accompagne de la formation de 2 ATP.

En conséquence, comme chaque molécule de glucose donne deux trioses phosphate, sa transformation en deux molécules de pyruvate produit 4 ATP, soit un gain net de 2 ATP. Le bilan énergétique est positif, même si les oxydations s'arrêtent au stade du pyruvate. Cependant, deux molécules de NAD<sup>+</sup> ont été transformées en NADH au cours de l'oxydation catalysée par la glycéraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase ; ces molécules doivent être régénérées. Il s'agit d'un des impératifs des cellules : outre produire de l'ATP et récupérer des intermédiaires utiles aux synthèses (six précurseurs métaboliques sont synthétisés au cours de la glycolyse : G6P, F6P, PEP, pyruvate, DHAP et PGA), la cellule doit réoxyder tous ses coenzymes réduits. Cela se déroule au cours de la chaîne respiratoire dans le cas d'un métabolisme oxydatif (section 1.2.6.1), ou bien lors de la réduction du pyruvate en éthanol dans le cas d'un métabolisme fermentaire en anaérobiose (section 1.2.6.2).

### 1.2.6.1 Voie respiratoire

La voie respiratoire ou « métabolisme oxydatif » permet la multiplication des cellules par bourgeonnement. Il nécessite la présence de l'oxygène comme accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire et une faible concentration en substrat. Il permet l'oxydation complète du glucose en H<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> au cours de la glycolyse, puis du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. Le métabolisme oxydatif est l'un des métabolismes les plus énergétiques, avec un rendement cellulaire élevé, même si le rendement de la conversion du glucose en biomasse dépend de la souche. Le rendement théorique limite en biomasse est  $Y_{X/S} = 0,73$  g/g de glucose. Cependant, les rendements pratiques obtenus les plus élevés sont de l'ordre de  $0,5$  g.g<sup>-1</sup>.

L'équation suivante résume le bilan matière et le bilan énergétique théorique maximal de cette voie métabolique, hors synthèse de biomasse :



L'efficacité de cette voie dépend du rapport P/O qui se traduit par le nombre de moles d'ATP formées par atome d'oxygène consommé. En théorie, pour la levure, le rapport doit être P/O=2, alors que ce rapport varie entre 1,2 et 1,3 en pratique pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans des cultures en aérobiose sur différents types de substrats (Aldiguier, 2006).

On peut noter ici que *Saccharomyces cerevisiae* est une levure soumise à l'effet Crabtree. En 1929, Crabtree a mis en évidence un effet inhibiteur du glucose sur la respiration des cellules tumorales de rat. Par la suite, ce même phénomène a été observé chez certaines levures et à l'heure actuelle, il est bien connu que ce phénomène désigne le changement de métabolisme survenant

lorsque le flux de glucose sature la capacité respiratoire de la levure (Sonnleitner et Käpelli, 1986). Les concentrations élevées en glucose peuvent donc inhiber la respiration cellulaire et ce phénomène porte le nom d'effet Crabtree (de Deken, 1966). Le niveau de sensibilité est variable selon le type de levure considéré, et à partir de ce critère les levures peuvent être nommées Crabtree positives, et Crabtree négatives si la respiration n'est pas inhibée par la présence de glucose. Chez *S. cerevisiae* la respiration est réprimée en présence de concentrations en glucose supérieures à 0,1 g/L et son métabolisme s'oriente alors vers une dégradation privilégiant la voie fermentaire avec production d'éthanol (Barford et Hall, 1981).

### 1.2.6.2 Voie fermentaire

Dans le cas de métabolisme fermentaire, le rôle de l'accepteur final d'électrons est assuré par des molécules organiques, compte tenu de l'absence de l'oxygène. Ce métabolisme conduit finalement à la production de l'éthanol, de dioxyde de carbone et de produits secondaires. C'est le pyruvate qui se transforme en éthanol dans le métabolisme fermentaire, ce qui constitue la différence essentielle entre le métabolisme oxydatif et le métabolisme fermentaire, *i.e.* le devenir de pyruvate. Durant la production d'éthanol, il y a production simultanée d'énergie pour la croissance et l'activité des micro-organismes.

Le bilan énergétique de la dégradation du glucose en éthanol est :



Le rendement théorique de production d'éthanol à partir de glucose est de 0,511 g/g, tandis que dans la pratique, on n'obtient que 80 à 90% du rendement théorique.

Le rendement en biomasse  $Y_{x/s}$  est de 0,1 g/g de glucose ; il est très largement inférieur au rendement observé dans le métabolisme oxydatif, de même que la production d'énergie exprimée en molécules d'ATP.

## 1.2.7 Influence des paramètres environnementaux sur la production d'éthanol

### 1.2.7.1 Influence de la température

La température est considérée comme l'un des facteurs clés de la croissance bactérienne. En théorie, une augmentation de 10°C double la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme (Torija et al., 2002). Toutefois, une température trop élevée devient létale pour les micro-organismes en provoquant une dénaturation des enzymes, des systèmes de transport, des membranes microbiennes et de la plupart des protéines (Converti et al., 1996). En pratique, une température inférieure à 10°C provoque un blocage de l'activité microbienne car les enzymes sont alors moins actifs et les membranes cellulaires perdent de leur fluidité. En revanche, une température comprise entre 25 et 37°C augmente la vitesse de croissance. Aldigui et al. (2004) ont étudié la croissance de *S. cerevisiae* en mode fed-batch dans une gamme de température allant de 27 à 39°C ; une température de 30°C s'est montré la plus favorable à la croissance de la levure, alors que 33°C est la température optimale pour maximiser la production de l'éthanol.

### 1.2.7.2 Influence du pH

Le pH détermine l'activité métabolique des cellules ; il agit sur la solubilité des nutriments et sur la perméabilité de la membrane. Les levures et les moisissures peuvent se développer dans une gamme de pH comprise entre 2,5 et 8,5 (Martinez et al., 2003). La limite haute de leur développement se situe entre 9 et 9,5. Le pH interne des micro-organismes est proche de la neutralité ; il n'est pas nécessairement égal au pH extracellulaire du milieu de culture à cause de l'imperméabilité de la membrane plasmique aux protons. Le pH interne a une influence sur l'activité enzymatique, la synthèse des protéines et l'excrétion des métabolites pendant la fermentation, tandis que le pH externe peut influencer sur la vitesse avec laquelle les molécules sont transportées vers l'intérieur de la cellule. Par exemple, Lin et al. (2012) ont montré sur une souche de *S. cerevisiae* que la production d'éthanol était maximisée à un pH de 5.

### 1.2.7.3 Influence de la biomasse

L'augmentation de la concentration cellulaire peut affecter d'une manière négative les cinétiques de croissance de la levure à haute concentration. Ceci peut s'expliquer par une chute de la viabilité cellulaire qui résulterait à la fois de l'encombrement dans le réacteur, d'un problème de partage des substrats et de la production abondante de co-métabolites toxiques liés à la synthèse cellulaire. Cette inhibition est cependant assez rarement rencontrée.

### 1.2.7.4 Influence de l'éthanol

L'éthanol est connu pour être inhibiteur de sa propre synthèse ; il peut réduire à la fois sa propre vitesse spécifique de production et la vitesse de consommation de sucre, ce qui diminue le taux de croissance de la levure. Pour ces raisons, la concentration en éthanol est considérée comme le paramètre le plus limitant de la fermentation alcoolique. La concentration en éthanol à partir de laquelle il n'y a plus de croissance ( $P_m$ ) est 87 g/L, tandis que la concentration en éthanol à partir de laquelle il n'y a plus de production d'éthanol ( $P_m'$ ) est de 114 g/L. Il est cependant possible d'augmenter la tolérance à l'éthanol par l'ajout de vitamines et/ou d'ergostérol.

L'éthanol peut aussi agir en modifiant la structure de la membrane cytoplasmique d'un point de vue lipidique. Des études ont montré que la barrière membranaire est plus perméable avec l'augmentation de la concentration de l'éthanol, ce qui permet la fuite des composés nécessaires à la fermentation, comme des cofacteurs et des enzymes. C'est le cas pour *S. cerevisiae* où l'intégrité de la structure membranaire est altérée suite à la diminution de la fluidité membranaire.

## 1.2.8 Cas particulier de la fermentation alcoolique en milieu solide

Dans cette section, nous allons faire une digression sur la fermentation en milieu solide (FMS, ou SSF en anglais) afin de mieux définir par la suite les spécificités de la production d'éthanol par FMS/SSF, puis pour analyser les travaux sur la production d'éthanol à partir de gousses de caroube par FMS/SSF. En effet, les déchets agricoles solides sont produits en quantités importantes et comme ils sont riches en hydrates de carbone et autres éléments nutritifs (ce qui est le cas des déchets de caroube), ils peuvent servir directement de substrat pour la FMS/SSF tout en réduisant

la consommation en eau du procédé. Du point de vue technologique, la difficulté de la FMS/SSF est la récupération des produits qui peut nécessiter une extraction liquide/solide. Pour plus de détail sur la FMS/SSF, on consultera Pandey et al. (2008), ainsi que la synthèse de Duchiron et Copinet (2011) pour une analyse rapide des micro-organismes utilisables, des paramètres clés et des matériels industriels.

La fermentation en milieu solide est définie comme étant la culture de micro-organismes soit sur des supports solides et humides inertes, soit sur des substrats insolubles pouvant en outre être utilisés comme source de carbone et d'énergie. La fermentation se déroule en l'absence ou quasi-absence d'eau libre, ce qui est finalement plus proche de l'environnement naturel auquel les micro-organismes sont adaptés (Pandey et al., 2000). Depuis 1986, une série de projets de recherche au Brésil ont été réalisés pour donner une valeur ajoutée aux produits agricoles tropicaux par FMS/SSF ; cette voie a été développée en raison des grandes quantités de résidus agricoles générés par ce pays. La fermentation en milieu solide a gagné un grand intérêt dans divers domaines comme la biorestauration et la biodégradation des composés dangereux, la détoxification biologique des résidus agro-industriels, la biotransformation des cultures et des résidus de cultures pour l'enrichissement nutritionnel, ainsi que la production de produits à valeur ajoutée, tels que les métabolites secondaires biologiquement actifs, y compris les antibiotiques, les alcaloïdes, les facteurs de croissance des plantes, les enzymes, les acides organiques, les biopesticides, etc. (Pandey et al., 2000).

La sélection d'un substrat pour la mise en œuvre du procédé de FMS/SSF dépend de plusieurs facteurs liés principalement à son coût et à la disponibilité du substrat. De plus, le substrat choisi doit fournir tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des micro-organismes et il doit être un support idéal. Cependant, certains des éléments nutritifs peuvent être disponibles à des concentrations sous-optimales ou même ne pas être présents sur le support. Dans de tels cas, il est nécessaire de les amener par des apports extérieurs. Dans certains cas, une étape de prétraitement (chimique et/ou mécanique) des substrats est nécessaire, par exemple pour les substrats lignocellulosiques, ce qui facilite la croissance microbienne.

En effet, la taille des particules du support est un paramètre important pour la fermentation en milieu solide. Les particules de substrat plus petites offriraient une plus grande surface pour l'attaque microbienne et la réduction des tailles est souvent considérée comme un facteur souhaitable. Toutefois, les particules plus grosses offrent une meilleure efficacité de respiration/aération due à l'augmentation de l'espace inter-particules, mais elles fournissent une surface limitée pour l'attaque microbienne. Ainsi, il est souvent nécessaire d'arriver à un compromis qui peut différer pour chaque procédé particulier.

### *1.2.8.1 Les applications de la fermentation en milieu solide*

Les applications de la FMS/SSF sont multiples. Le Tableau 1:3 illustre la production de diverses molécules d'intérêt sur différents substrats/supports par la technique de FMS/SSF.

## Etude bibliographique

La biotransformation de la culture et des résidus de cultures pour l'amélioration des qualités nutritionnelles des aliments a été parmi l'une des plus importantes applications de la FMS/SSF. Elle a été par exemple utilisée pour améliorer la qualité nutritionnelle du manioc qui est pauvre en protéines, vitamines et minéraux et qui joue un rôle très important comme aliment de base pour des millions de personnes en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud. Ainsi, le champignon comestible *R. formosa* s'est montré le plus approprié pour améliorer la qualité nutritionnelle de la farine de manioc cru.

**Tableau 1:3.** Variété de substrats, produits et micro-organismes utilisés pour la fermentation solide (Hölker et al., 2004).

Substrat	Produit	Micro-organisme
Amandes	Lipases	<i>Rhizopus oligosporus</i>
Pulpe de pomme, orge	Dégradation des colorants	<i>Champignons</i>
Duchess de banane	Enzymes lignolytiques	<i>Pleurotus sp.</i>
Cacao	Endo-polygalacturonase	<i>Peacilomyces clavisporus</i>
Manioc, soja, amarante	Arôme	<i>Rhizopus oryzae</i>
Résidus de café	Champignons comestibles	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Résidus de maïs	Enzymes cellulolytiques	<i>Fusarium oxysporum</i>
Pâte Kraft d'Eucalyptus	Xylanase	<i>Streptomyces sp.</i>
Lignite	Charbon solubilisé	<i>Trichoderma atroviride</i>
Résidus d'orange	Pectinase	<i>Thermoascus aurantiacus</i>
Ananas, fruits mélangés	Acide citrique	<i>Aspergillus niger</i>
Tourteaux de soja	Protéases	<i>Penicillium sp.</i>

La FMS/SSF a récemment été appliquée comme un outil permettant de détoxifier des résidus agro-industriels contenant des composés toxiques (anti-physiologiques et antinutritionnels) tels que le cyanure d'hydrogène, la caféine, les tanins, les polyphénols, etc. Ofuya et Obilor (1994) ont étudié les effets de FMS/SSF sur les composés toxiques des pelures de manioc ; une fermentation pendant 96 heures a provoqué une réduction d'environ 95 % des niveaux d'HCN dans les pelures et une élimination d'environ 42 % des tanins solubles.

La FMS/SSF a été également utilisée pour la production d'hormones. La production d'acide gibbérellique (GA3), hormone de croissance végétale, par *Gibberella fujikuroi* ou *Fusarium moniliforme* par fermentation solide montre une diminution de la durée de fermentation et une production supérieure à celle trouvée en phase liquide (Pandey et al., 2000) : par FMS/SSF, on obtient 240 mg GA3/kg de matière sèche du manioc après 36 heures, tandis qu'en phase liquide, seulement 23 mg de GA3/L ont été produits en 120 heures.

En fin de compte, la fermentation en milieu solide peut être utilisée pour la production d'un très grand nombre de molécules d'intérêt à partir d'une grande variété de substrats. Par exemple, elle a été testée pour la production d'éthanol à partir de fleurs de mahula (Mohanty et al., 2008) où une concentration maximale en éthanol de  $225,0 \pm 4,0$  g/kg fleurs a été atteinte à pH 6 à 30°C, avec une humidité de 70 % après 72 heures de fermentation ; dans ce cas, la productivité maximale en éthanol était de 3,13 g/kg de fleur/h, le rendement en éthanol était de 58,44 g/100 g de sucre consommé et l'efficacité de la fermentation était de 77,1 %. Différents facteurs ont été testés pour la production d'éthanol à partir de sorgho par FMS/SSF (Yu et al., 2008). Les valeurs optimales de ces paramètres étaient  $4.10^6$  cellules/g de sorgho, avec une taille de particules de 1,5 mm et un taux d'humidité de 75 %, conduisant à un rendement maximal en éthanol de 0,46 g d'éthanol par g de sucres totaux.

### *1.2.8.2 Avantages et inconvénients de la fermentation en milieu solide*

La fermentation solide est connue depuis des millénaires, même si elle reste plus populaire en Asie qu'en Europe où elle est restée cantonnée au pain et aux fromages. Ses avantages peuvent être résumés comme suit :

- La technologie est simple et les problèmes de fonctionnement sont donc limités ;
- Les volumes de réacteur nécessaires sont plus petits ; donc la productivité est plus grande à volume égal ;
- Comme déjà mentionné, le support ressemble plus à l'habitat naturel de nombreux micro-organismes.

Toutefois, la fermentation solide présente aussi quelques inconvénients par rapport à la fermentation en phase liquide :

- Sa mise en œuvre technologique à l'échelle industrielle est souvent délicate ;
- Les paramètres du procédé (pH, température, humidité, accès aux nutriments...) sont plus difficiles à contrôler qu'en phase liquide ;
- Le mélange et les transferts sont moins bons qu'en phase liquide à cause de l'absence d'agitation ou de la faible agitation du milieu (lit fixe...).

En conclusion, la fermentation solide apparaît comme une alternative possible pour la production d'éthanol à partir de déchets solides de caroube, ce qui ouvre la possibilité d'une utilisation directe du déchet solide.

## **1.2.9 Production d'éthanol à partir de caroube**

### *1.2.9.1 Par fermentation en milieu solide*

Roukas (1993) a étudié la production d'éthanol par fermentation solide à partir de gousses de caroube en utilisant *Saccharomyces cerevisiae*. La concentration maximale d'éthanol obtenue est de  $160 \pm 3$  g / kg de gousses sèches avec un rendement de  $40 \pm 2$  % et un taux d'utilisation des sucres

de  $80 \pm 2$  %. La taille optimale des particules est de 0,5 mm et l'humidité de 70 %, pour un pH de 4,5 et une température de 30°C.

Enfin, la production de bioéthanol à partir de caroube par *Zymomonas mobilis* a été étudiée par Mazaheri et al. (2012). Les particules de son de blé ont été mélangées avec des gousses de caroube comme support pour la croissance bactérienne. Les effets de la température, de l'humidité, des tailles des particules de caroube et de son de blé, du pH, de la concentration initiale en cellules, et de la concentration en peptone et en extrait de levure ont été étudiés par une approche « plan d'expériences » avec des plans de criblage de type Plackett-Burman. Puis les facteurs les plus influents ont été optimisés pour la production maximale d'éthanol par la méthode des surfaces de réponses (RSM). Les résultats ont montré que 0,30 g d'éthanol par gramme de sucre initial a été produit à une température de 31°C, pour une humidité initiale de 80 % (p/p), une taille de particules de caroube de 1 mm, une concentration en peptone de 0,7 % (p/p), une concentration cellulaire initiale de  $6,74 \times 10^8$  cellules/g de caroube et une durée de fermentation de 43 heures.

### 1.2.9.2 En phase liquide

Une étude sur la production d'éthanol à partir d'extrait de caroube avec *S. cerevisiae* a été réalisée par Turhan et al. (2010a). Les effets de divers paramètres opératoires de la fermentation tels que le pH, la composition des milieux, le volume de l'inoculum et quatre différentes sources d'azote ont été évalués. Lorsque la fermentation est conduite à un pH de 5,5, avec un volume d'inoculum de 3%, et en utilisant la farine de viande comme source d'azote, la concentration en éthanol obtenue est de 42,6 g/L.

Vaheed et al. (2010) ont également utilisé une approche par plans d'expériences pour optimiser la production d'éthanol à partir d'extrait de caroube en utilisant *Zymomonas mobilis*. Des plans de criblage de type Plackett-Burman et des méthodes de surfaces de réponses (RSM) ont été utilisées. Les effets des concentrations initiales en sucre, peptone et extrait de levure, ainsi que la vitesse d'agitation, le pH et la durée de la culture ont été étudiés avec l'extrait de caroube. Tout d'abord, la production d'éthanol (en g/g de sucre initial) traitée comme réponse a montré que l'on pouvait indifféremment utiliser de l'extrait hydrolysé ou non hydrolysé de caroube. Un rendement maximal en éthanol de  $0,34 \pm 0,02$  g/g de sucre initial a été obtenu à 30°C, pour un pH initial de 5,2 et une vitesse d'agitation de 80 tpm en utilisant des concentrations initiales, exprimées en g par 50 mL de milieu de culture, de 5,78 pour le sucre et de 0,43 pour la peptone, pour une durée de culture de 36 heures.

Enfin, Ercan et al. (2012) ont étudié l'optimisation de la production d'éthanol à partir d'extrait de caroube par immobilisation de *S. cerevisiae* sur billes d'alginate. Les résultats ont montré que la concentration en alginate de calcium et la quantité des cellules immobilisées ont des effets significatifs sur le rendement en éthanol. Les conditions optimales pour la production d'éthanol sont : une concentration d'alginate de 2%, une vitesse d'agitation de 150 tpm, 5% des cellules de levure piégées dans des billes et un pH de 5,5. Dans ces conditions, la concentration d'éthanol, le rendement, la productivité et le taux de consommation du sucre étaient respectivement de 40,10 g/L, 46,32 %

et 3,19 g/(L.h) et 90,66 %, alors que la durée fermentation avait été réduite à 24 heures. En outre, les cellules immobilisées se sont révélées être réutilisables pendant cinq cycles, même si une diminution progressive du rendement avait été observée.

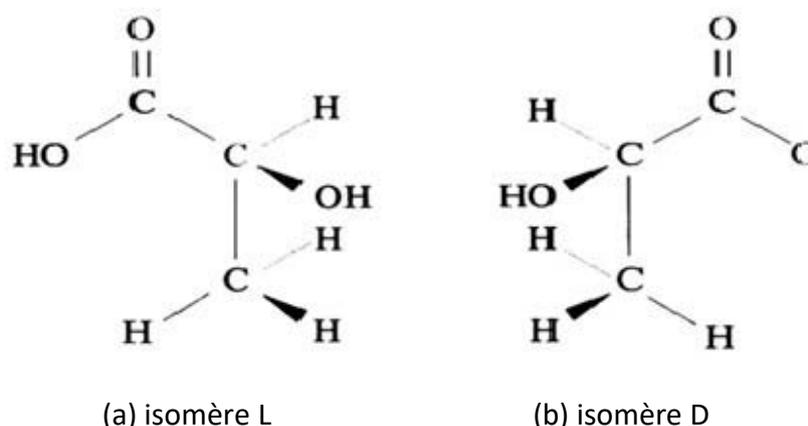
### 1.2.10 Conclusion

En conclusion, la littérature montre qu'il est possible de produire de l'éthanol à partir d'extraits de caroube, en milieu liquide, mais également par fermentation solide. Toutefois, il n'existe aucune donnée sur l'utilisation du déchet résultant de la production de la mélasse de caroube libanaise, ce qui rend notre étude originale.

## 1.3 L'acide lactique comme molécule plateforme

### 1.3.1 Généralités

L'acide lactique (LA), dont le nom selon la nomenclature est l'acide 2-hydroxypropanoïque ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ), est une molécule plateforme de grand intérêt qui a des applications très larges dans les industries alimentaire (additif E270), cosmétique, textile, pharmaceutique et chimique. C'est un acide alpha-hydroxylé qui se présente sous la forme de deux énantiomères : l'acide-D(-)-lactique et l'acide-L(+)-lactique (Figure 1:6). La forme L(+) a des qualités nutritionnelles élevées et elle est plus rapidement métabolisée que la forme D(-) (Djidel, 2007). C'est un acide organique largement répandu dans la nature ; il est soluble dans l'eau, incolore et très peu volatil. Son pKa étant de 3,86, il est souvent présent sous forme d'ions lactate.



**Figure 1:6.** Structure chimique des isomères de l'acide lactique.

L'une des applications importantes de l'acide lactique est actuellement sa polymérisation pour former de l'acide polylactique (PLA), un polymère de grand intérêt comme matériau de substitution agro-biodégradable aux matières plastiques d'origine fossile, ce qui représente une alternative écologique à la fois au problème de l'épuisement des ressources fossiles et à celle des déchets plastiques (Abdel-Rahman et al., 2013). Le PLA peut être utilisé comme matériau pour l'emballage et l'étiquetage, mais a également trouvé des applications dans le textile et dans les industries

médicales et pharmaceutiques (Martinez et al., 2013). La demande en PLA augmente, tandis que sa production est seulement de 450 000 tonnes par an (Okano et al., 2010) ; cela est dû au coût élevé de la matière première, c'est-à-dire les monomères d'acide lactique. Les coûts associés à la production d'acide lactique incluent ceux liés aux substrats nécessaires à la fermentation (tels que les sources d'azote qui sont coûteuses et les sucres nécessaires à la croissance cellulaire), ainsi que ceux résultant de la récupération et de la purification en aval. Ainsi, la demande en acide lactique augmente chaque année de 5 à 8 % ; le marché mondial annuel pour la production d'acide lactique devrait atteindre 367 300 tonnes pour l'année 2017. Les États-Unis comptent parmi les principaux fabricants d'acide lactique par fermentation ; dans le monde, Corbion/Purac (Pays-Bas) et Galactic (Belgique) comptent parmi les principales entreprises produisant de l'acide lactique au côté de plusieurs entreprises chinoises. À la fin de 2002, Nature Works LLC a lancé la première usine de production de PLA à Blair, Nebraska (États-Unis), capable de produire 140 000 t/an.

Hors PLA, l'acide lactique a également des applications importantes dans l'industrie cosmétique ; par exemple, il est utilisé dans la fabrication de produits d'hygiène et de cosmétique en raison de ses effets hydratants et antimicrobiens. Dans l'industrie pharmaceutique, il est utilisé comme un supplément dans la synthèse de médicaments contre l'ostéoporose et d'actifs dermatologiques (Bai et al., 2004). Dans l'industrie alimentaire, l'acide lactique est utilisé dans la production de yaourt et de fromage (Martinez et al., 2013). Également, des dérivés d'acide lactique tels que les esters de lactate sont largement utilisés en raison de leurs propriétés hygroscopiques et émulsifiantes (Gao et al., 2011).

### 1.3.2 La production de l'acide lactique

L'acide lactique est produit par synthèse chimique ou enzymatique et par fermentation. Industriellement, on rencontre la voie chimique et la fermentation microbienne. L'obtention sélective de l'un des deux stéréo-isomères de l'acide lactique ou de leur mélange racémique est possible par la fermentation microbienne (Martinez et al., 2013), tandis que la synthèse chimique conduit toujours à un mélange racémique (Randhawa et al., 2012). Les procédés de fermentation microbienne admettent des conditions de production plus douces et conduisent à une plus faible consommation d'énergie ; de plus, ces procédés présentent des avantages environnementaux car ils mettent en jeu des ressources renouvelables en comparaison avec la synthèse chimique qui utilise des matières premières dérivées du pétrole (Reddy et al., 2015). En effet, la biomasse lignocellulosique est recommandée pour la production de LA par voie fermentaire car elle n'entre pas en concurrence avec les ressources alimentaires pour l'alimentation humaine ou animale (Kuo et al., 2015). Cependant, l'utilisation de ces matières premières requiert des prétraitements qui peuvent conduire à la formation d'inhibiteurs de fermentation indésirables pour la souche, par exemple : le furfural, le 5-hydroxyméthylfurfural, et certains acides organiques (Jönsson et Martin, 2016). De plus, les mélanges de sucres contiennent généralement des quantités significatives de pentoses qui ne peuvent pas être fermentés par la majorité des souches. Ainsi, la rentabilité de la production d'acide lactique par voie fermentaire doit encore être améliorée pour répondre à l'énorme demande actuelle, notamment dans le cas d'un acide optiquement pur.

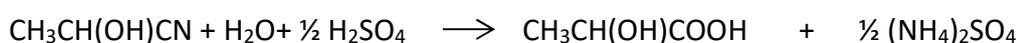
### 1.3.2.1 La voie chimique

Pour la synthèse d'acide lactique par voie chimique, du cyanure d'hydrogène est ajouté à l'acétaldéhyde en présence d'une base pour obtenir du lactonitrile. La réaction se produit à des pressions élevées en phase liquide. Ensuite, le lactonitrile est hydrolysé en acide lactique, soit par l'acide sulfurique concentré, soit par l'acide chlorhydrique (Narayanan et al., 2004).

Le procédé de synthèse chimique produit un mélange racémique d'acide (D)- et (L)-lactique.



Acide cyanhydrique    Acétaldéhyde                      Lactonitrile



Lactonitrile                                      acide lactique                      sel d'ammonium

### 1.3.2.2 La voie fermentaire

La production de LA par fermentation est actuellement obtenue par l'utilisation de bactéries lactiques (LAB), de bacilles, et de certaines souches génétiquement modifiées, y compris *Escherichia coli* et *Corynebacterium* (Abdel-Rahman et al., 2013). Le genre le plus vaste et le plus diversifié de bactéries lactiques est *Lactobacillus*. Les micro-organismes appartenant à ce genre sont utilisés à l'échelle industrielle compte tenu de leur vitesse de croissance et de leur productivité élevées (Kylä-Nikkil et al., 2000), ainsi que de leur capacité à vivre dans un environnement acide. Il est cependant nécessaire de choisir les conditions de fermentation les plus favorables qui varient en fonction du micro-organisme, en termes de température, de pH, d'aération, d'agitation, etc.

## 1.3.3 Focus sur la production d'acide lactique par voie fermentaire à partir de glucose

### 1.3.3.1 Voie homofermentaire

Les bactéries lactiques homofermentaires produisant exclusivement le lactate incluent des espèces de Streptocoques, Entérocoques, Lactocoques et Lactobacilles. Les bactéries homolactiques ont la capacité de fermenter des mono- et des disaccharides autres que le glucose. Le mécanisme de cette voie est décrit par la Figure 1:7. La fermentation homolactique devrait théoriquement produire 2 moles d'acide lactique par mole de glucose consommé avec un rendement théorique de 1 gramme de produit par gramme de substrat, mais les rendements expérimentaux sont généralement plus faibles (0,74 à 0,99 g/g), notamment parce qu'une partie du carbone est utilisée pour la production de biomasse (0,07 à 0,22 g/g) (Martinez et al., 2013).

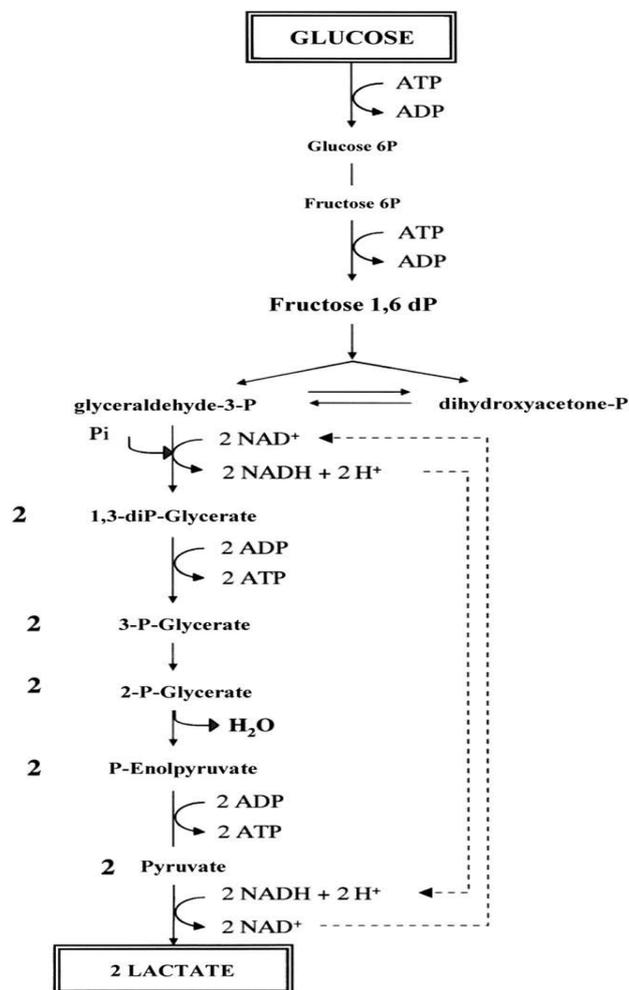
### 1.3.3.2 Voie hétérofermentaire

Cette voie conduit à la formation d'acide lactique et de coproduits tels que le CO<sub>2</sub>, l'éthanol et/ou l'acide acétique. Les bactéries hétérofermentaires ne contiennent pas de FDP-aldolase ni de triose phosphate isomérase. Le glucose est transformé dans une première étape en glycéraldéhyde-3-phosphate, acétyl-phosphate et CO<sub>2</sub> par une voie pentose-phosphate (Figure 1:8). Enfin l'acétyl-

phosphate est réduit en éthanol, tandis que glycéraldéhyde-3-phosphate subit une glycolyse au cours de laquelle il est transformé en acide lactique. *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. parabuchneri* et *L. reuteri* sont les principaux micro-organismes qui utilisent uniquement cette voie métabolique pour la consommation d'hydrates de carbone (Nigatu, 2000).

### 1.3.4 Les producteurs d'acide lactique microbien

L'acide lactique peut être produit à partir de substrats bien plus variés que le glucose par plusieurs micro-organismes classés en bactéries, champignons, levures, cyanobactéries et algues. Toutefois, la majeure partie de la production d'acide lactique est effectuée en utilisant des micro-organismes tels que des bactéries lactiques (LAB) et des champignons filamenteux, par exemple *Rhizopus*. La production d'acide lactique peut être améliorée par l'utilisation de souches mixtes lorsque la fermentation utilise des biomasses complexes (Abdel-Rahman et al., 2013).



**Figure 1:7.** Voies métaboliques pour la production homofermentaire de l'acide lactique à partir du glucose (Martinez et al., 2013).

1.3.4.1 Bactéries

Les bactéries lactiques utilisées industriellement (Tableau 1:4) sont généralement des bactéries Gram+ ; elles se développent dans des conditions anaérobies car elles n'utilisent pas d'oxygène pour leur production d'énergie, mais elles sont également capables de croître en présence d'oxygène. Les micro-organismes producteurs d'acide lactique peuvent être divisés en quatre familles, à savoir, les bactéries lactiques (LAB), les souches de *Bacillus*, *E. coli* et *Corynebacterium glutamicum*. Les bactéries lactiques possèdent la L-lactate déshydrogénase (L-LDH) et la D-lactate déshydrogénase (D-LDH). En conséquence, il y a production à la fois de (L) et (D) acide lactique, ce qui est considéré comme une limitation de la fermentation lactique, en plus du faible rendement dû à la formation de sous-produits et le besoin d'un milieu riche en nutriments.

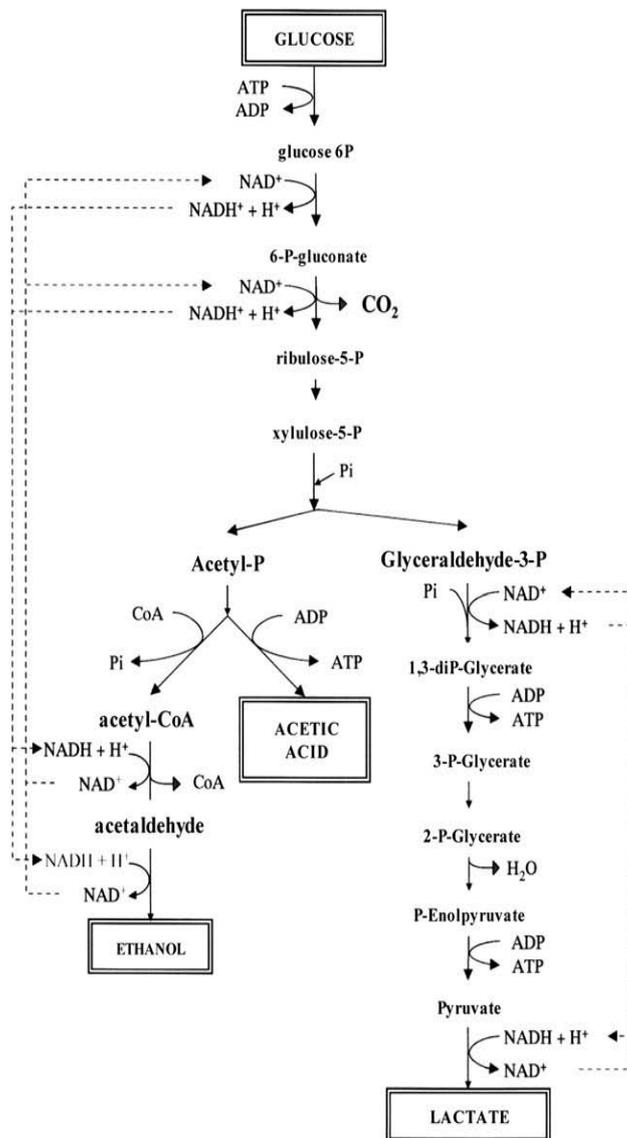


Figure 1:8. Voies métaboliques pour la production hétérofermentaire de l'acide lactique à partir du glucose (Martinez et al., 2013).

**Tableau 1:4.** Exemples de bactéries lactiques et de leur utilisation industrielle.

Utilisation industrielle des bactéries lactiques	
Espèce	Utilisation industrielle
<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus cremoris</i>	La plupart des fromages, crèmes, beurres...
<i>Lactococcus diacetylactis</i>	Fromages (gouda, bleu, camembert), crèmes, beurres...
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Yaourts, fromages (parmesan, emmental, gruyère...), crèmes...
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Yaourts, laits fermentés...
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Fromages...
<i>Lactobacillus casei</i>	Fromages...
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Laits fermentés...
<i>Leuconostoc lactis</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	Fromages, crèmes...

La suppression du gène codant l'acide (L)– ou (D)–lactique compte parmi les solutions les plus élégantes pour surmonter le problème de la pureté optique de l'acide lactique (Kyla-Nikkila et al., 2000). Aussi, le rendement peut être amélioré par la délétion des gènes codant pour le pyruvate formate lyase (production de l'acide formique), l'alcool déshydrogénase (production d'éthanol) et/ou l'acétate kinase (production d'acide acétique) (Zhou et al., 2003).

L'utilisation de souches de LAB alcaliphiles ou thermotolérantes a permis de faire émerger des voies prometteuses pour la production d'acide lactique en raison de leur tolérance à des niveaux de température et de pH élevés qui minimiseraient les problèmes de contamination pendant le traitement (Calabia et al., 2011). Calabia et al. (2011) ont isolé un alcaliphile *Halolactibacillus halophilus* à partir d'un environnement marin qui a produit 65,8 g /L d'acide (L)–lactique à un pH de 9,0. L'ingénierie métabolique a été mise en œuvre pour améliorer la production d'acide lactique (Vijayakumar et al., 2008). Wee et al. (2006) ont obtenu la production d'acide lactique en utilisant *Enterococcus faecalis* RKY1 à partir de sucres simples et mixtes. La production d'acide lactique a également été décrite pour plusieurs espèces de *Bacillus*, y compris *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus* sp. Les souches alcaliphiles telles que *Bacillus* sp. WL-S20, isolé par Meng et al. (2012), produisent de l'acide lactique à une concentration de 225 g/L avec un rendement de 0,993 g/g en fermentation fed-batch à un pH de 9, ce qui permettrait de réduire le risque de contamination lors de la fermentation. De plus, *Bacillus* ssp. peut produire de l'acide lactique en fermentation thermophile ( $\geq 50^{\circ}\text{C}$ ). Ces caractéristiques devraient donner à *Bacillus* spp. plusieurs avantages par rapport aux autres bactéries tels que la diminution des coûts associés à l'eau de refroidissement après stérilisation du milieu de culture.

### 1.3.4.2 Levures

Les levures, telles que *Saccharomyces cerevisiae*, ont été utilisées pour la production d'acide lactique car elles sont plus résistantes aux bas pH par rapport aux bactéries lactiques. A titre d'exemple, une levure génétiquement modifiée a été préparée pour la production d'acide lactique et utilisée à grande échelle sur une base expérimentale.

### 1.3.4.3 Champignons

Plusieurs espèces du genre *Rhizopus*, en particulier *R. oryzae*, sont devenues l'objet d'études pour la production d'acide lactique optiquement pur. Sa production par *Rhizopus* en utilisant différentes sources de carbone renouvelables, y compris la mélasse, la biomasse lignocellulosique et l'amidon, a été rapportée par de nombreux auteurs (voir par exemple, Abdel-Rahman et al., 2013). Pour une production optimale d'acide lactique par *Rhizopus*, des conditions limites doivent être respectées afin de limiter la formation de sous-produits indésirables, en particulier l'éthanol et l'acide fumarique ; de plus, la nature filamenteuse des souches de *Rhizopus* peut limiter la productivité en raison d'une limitation physique par le transfert de masse (Bai et al., 2003). Le genre *Rhizopus* possède des enzymes amylolytiques qui transforment l'amidon en acide L(+)-lactique, mais le rendement est faible par rapport aux bactéries lactiques. En revanche, ces espèces présentent une exigence en nutriments plus faible que les bactéries (Bulut et al., 2004) ; de plus, la séparation de LA du moût de fermentation est plus facile que pour les bactéries ou les levures (Zhang et al., 2007).

### 1.3.4.4 Substrats de fermentation pour la production d'acide lactique

La matière première pour la production industrielle d'acide lactique doit présenter un certain nombre de caractéristiques telles qu'un coût faible, une vitesse de fermentation rapide, des rendements élevés, et une disponibilité sur l'année entière.

Diverses matières premières issues de ressources renouvelables ont été considérées comme des substrats alternatifs intéressants, y compris des sous-produits des industries agricoles, des industries alimentaires et des biomasses naturelles non utilisées, telles que la biomasse lignocellulosique, le lactosérum, le glycérol et la biomasse algale.

Récemment, un intérêt croissant s'est porté sur l'utilisation de déchets lignocellulosiques comme matières premières parce que ces matériaux sont abondants, renouvelables et bon marché (Abdel-Rahman et al., 2011). Le prétraitement et la saccharification des matières premières par un traitement physico-chimique et enzymatique constituent, en termes de rentabilité, l'un des inconvénients majeurs de la production d'acide lactique à partir de ces matières premières (Abdel-Rahman et al., 2011). Par exemple, les tiges de maïs, la bagasse de canne à sucre et les déchets de transformation du bois sont des substrats alternatifs utilisés pour la production d'acide lactique après prétraitement chimique ou hydrolyse enzymatique (Wang et al., 2010 ; Cui et al., 2011).

De même, le lactosérum constitué de lactose, de protéines, de matières grasses et de vitamines hydrosolubles, est considéré comme une matière première utilisable pour la production d'acide lactique (Panesar et al., 2007). Dans une étude de fermentation à pH contrôlé du lactosérum par

*Lactobacillus casei* ATCC 393, un rendement de 0,67 g/g et une productivité de 0,39 g/L/h en acide lactique ont été atteints (Alonso et al., 2014).

L'utilisation de microalgues est également une solution potentielle pour réduire les coûts du substrat. Les microalgues peuvent croître partout avec de courtes périodes de récolte ; elles contiennent peu de lignine, ce qui simplifie la saccharification, et ont des teneurs en sucres fermentescibles élevées (Nguyen et al., 2012). La microalgue verte *Hydrodictyon reticulatum* a été utilisée comme substrat pour la production d'acide lactique par *Lactobacillus paracasei* LA104 ; 36,1 g/L de LA ont été obtenus, avec un rendement de 0,46 g/g d'algues et une productivité de 1,03 g/L/h (Nguyen et al., 2012). En outre, *Nannochloropsis salina* a été consommée par le *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 pour la production de LA ; 23 g/L de LA ont été obtenus, avec un rendement et une productivité respectifs de 0,93 g/g et 0,45 g /L/h (Talukder et al., 2012). L'utilisation des microalgues reste cependant encore très limitée.

### 1.3.5 Optimisation de la fermentation lactique

De nombreux travaux ont visé à optimiser la fermentation lactique. *R. oryzae* NRRL 395 immobilisé sur une mousse de polyuréthane a été utilisé pour la production d'acide lactique à l'aide de la méthodologie des surfaces de réponses. Trois variables indépendantes (le pH, la concentration en glucose et la vitesse d'agitation) ont été étudiées au moyen d'un plan composite centré basé sur un plan complet  $2^3$  (Tanyildızı et al., 2012). La production maximale d'acide lactique atteinte était de 93,2 g /L en utilisant une concentration en glucose de 150 g /L, un pH de 6,39 et une vitesse d'agitation de 147 tpm. La production d'acide lactique dans des conditions optimales en utilisant des cellules entières immobilisées a été estimée à environ 55%, ce qui est plus élevé que pour des cultures en suspension (Tanyildızı et al., 2012). Dans une autre étude, l'alginate de calcium a été utilisé pour immobiliser *L. delbrueckii* avec pour substrat un déchet d'ananas. Différents facteurs tels que la température, le pH, la concentration en alginate de calcium, le diamètre des billes et la taille de l'inoculum ont été étudiés systématiquement par une approche « plans d'expériences » avec pour réponse la production en acide lactique. Deux méthodologies de surfaces de réponses ont été mises en œuvre pour comparer les effets de la liqueur de maïs macéré, du lactosérum issu de la préparation de fromage, du sulfate d'ammonium, du pH et de la régulation de température sur la production d'acide lactique en utilisant *Lactobacillus* sp. LMI8 qui a été isolé des eaux usées de la farine de manioc. Dans le premier plan, le sulfate d'ammonium et la liqueur de maïs ont été étudiés comme sources d'azote bon marché en combinaison avec d'autres composants pour remplacer l'extrait de levure en vue d'une production plus économique. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 15 g/L de liqueur de maïs, 55 g/L de lactose et 5,625 g/L de sulfate d'ammonium. La production d'acide lactique par des cellules immobilisées de *Lactococcus lactis* IO-1 à partir de glucose a été étudiée en utilisant une immobilisation soit par encapsulation dans des microcapsules, soit par piégeage dans des billes d'alginate. Ce procédé a été optimisé par la méthode Taguchi à partir d'expériences en fioles, puis extrapolé vers un bioréacteur de production (Sirisansaneeyakul et al., 2007).

### 1.3.5.1 Besoins nutritionnels

Les bactéries lactiques sont exigeantes du point de vue nutritionnel. Elles ont besoin pour leur croissance de substrats carbonés, phosphatés, soufrés, azotés, ainsi que de vitamines, d'oligoéléments et de facteurs de croissance (Djidel et al., 2007).

- *Besoins en azote* : Les bactéries lactiques ont besoin de sources d'acides aminés exogènes pour assurer le fonctionnement de leur métabolisme. Ces acides aminés peuvent être présents sous forme de peptides. L'azote, qui est impliqué dans des processus anaboliques ou cataboliques, doit être disponible sous la forme d'acides aminés, de peptides et de composés inorganiques qui peuvent être ajoutés aux milieux de culture sous forme de peptone, d'extrait de levure, d'urée ou de sulfate d'ammonium (Nancib et al., 2001). Dans une autre étude, un hydrolysât de plumes de poulet utilisé comme source d'azote a présenté une production d'acide lactique plus élevée (38,5 g/L) que l'extrait de levure (33,2 g/L) et le sulfate d'ammonium (28,5 g/L) lorsque la fermentation a été menée avec *R. oryzae* TS-61 à partir de mélasse de betterave comme source de carbone (Taskin et al., 2012).
- *Besoins en vitamines* : Un apport exogène de vitamines est nécessaire aux bactéries lactiques car ces dernières sont incapables de synthétiser des vitamines. Toutes les espèces ont un besoin en niacine, pantothénate de calcium, riboflavine et biotine. Le besoin en biotine peut être remplacé par un apport en Tween 80 (Djidel et al., 2007).

### 1.3.5.2 Inhibition par le substrat

Classiquement, les concentrations élevées en substrat peuvent inhiber la production de métabolites à cause du stress osmotique, de la réduction de l'activité de l'eau et de la lyse cellulaire (Abdel-Rahman et al., 2013). Ces problèmes peuvent être surmontés par l'ajout d'osmoprotecteurs (Zhou et al., 2013). Ces mêmes auteurs ont montré qu'une souche thermophile *B. coagulans* WCP10-4 présente une tolérance osmotique élevée et utilise 240 g/L de glucose en fermentation discontinue avec une production de LA de 210 g/L, un rendement de 0,95 g/g et une productivité de 3,5 g/L/h. Cette souche a consommé 200 g/L d'amidon de maïs, produisant 202,0 g/L d'acide (L)-lactique par fermentation en milieu solide à 50°C. En dehors de *B. coagulans* WCP10-4 et de *Lactobacillus lactis*, la majorité des producteurs de LA sont inhibés par des concentrations en sucre supérieures à 150 g/L (Bai et al., 2003).

L'amélioration d'une souche de *Lactobacillus delbrueckii* a également été obtenue par mutagénèse UV et a permis d'atteindre une production de LA de 128,5 g/L pour 150 g/L de saccharose, avec un rendement de 0,98 g/g et une productivité de 3,2 g/L/h, alors que la souche non modifiée avait atteint seulement 78,0 g/L de LA, un rendement de 0,87 g/g et une productivité de 1,6 g/L/h. La souche modifiée a également été capable de produire 135 g/L de LA sur 150 g/L de sucre de canne, mais avec un rendement de seulement 0,90 g/g (Kadam et al., 2006).

### 1.3.5.3 Inhibition par l'acide lactique produit

L'acide lactique est connu pour exercer un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire, encore plus fortement que sur sa propre vitesse spécifique de formation. L'inhibition par l'acide lactique sur la croissance cellulaire et sur le métabolisme est probablement due à l'augmentation de la pression osmotique moyenne, mais aussi à la formation de certains sous-produits de fermentation tels que l'acide formique, l'acide acétique qui peuvent exercer des effets inhibiteurs individuels (Loubière et al., 1997). Par exemple, ces auteurs ont observé une diminution de 50 % de la croissance de *L. lactis* en présence de 76 mmol/L d'acide formique et de 187 mmol/L d'acide acétique. Pour atténuer l'effet de l'inhibition, diverses stratégies ont été proposées, parmi lesquelles l'utilisation de technologies couplant réaction et séparation qui visent à soutirer l'acide du milieu de fermentation en même temps qu'il est formé (Moldes et al., 2001).

### 1.3.6 Récupération de l'acide lactique

Plusieurs techniques de récupération destinées à la séparation de l'acide lactique produit du moût de fermentation sans précipitation ont été décrites, comme la dialyse, l'extraction par solvant, la distillation directe, des méthodes chromatographiques, l'ultrafiltration et l'osmose inverse, l'électrodialyse conventionnelle et l'électrodialyse à membranes bipolaires (Bailly, 2002). Parmi celles-ci, la technique d'électrodialyse a été jugée la plus efficace pour la récupération d'acide lactique à partir du moût de fermentation en raison de sa rapidité de mise en œuvre, de sa capacité à éliminer efficacement les composés non-ioniques et à purifier l'acide, de sa capacité à le concentrer, ainsi que de son caractère respectueux de l'environnement (Boniardi et al., 1997).

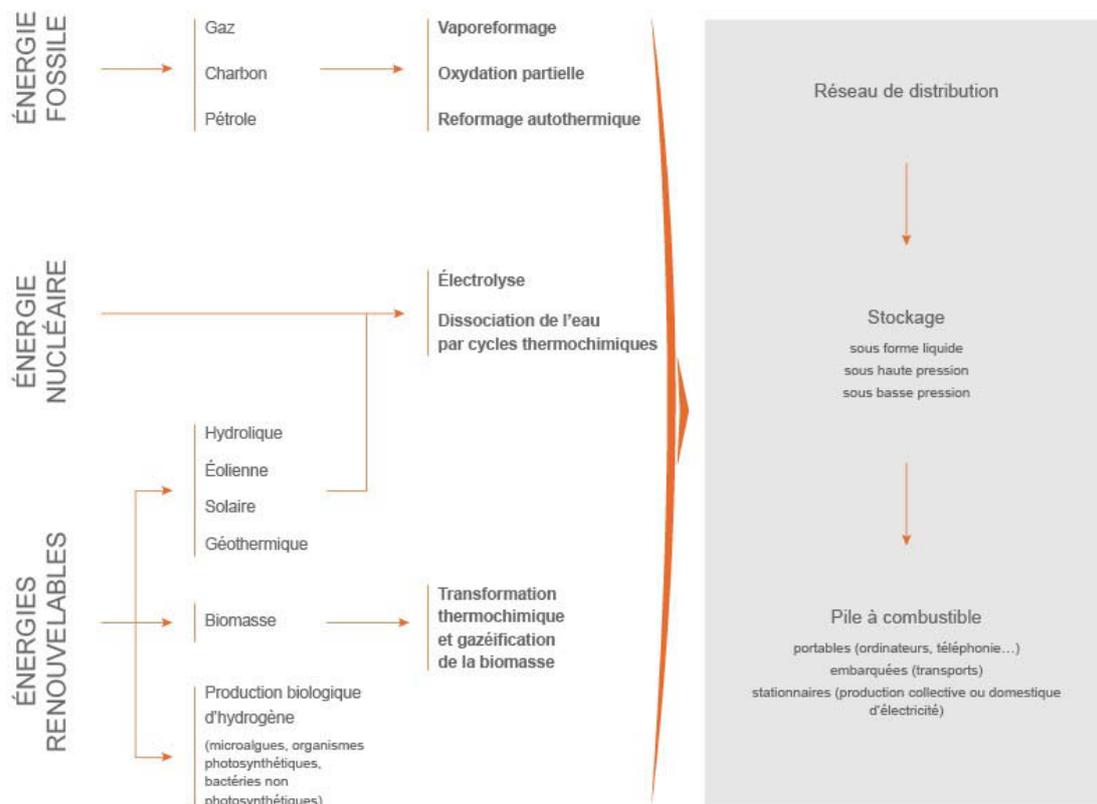
### 1.3.7 Conclusion

En fin de compte, la production d'acide lactique par voie fermentaire présente un intérêt industriel et économique indéniable. Cependant, il existe peu de littérature sur l'utilisation de la caroube pour produire de l'acide lactique. On citera les travaux de Turhan et al. (2010b) qui ont obtenu 59,3 g/L d'acide lactique à partir d'extraits de caroube à 94,1 g/L de sucres avec *Lactobacillus casei* après ajout d'une source d'azote et d'une invertase, puis ceux de Bouhadi et al. (2017) qui ont obtenu 52,8 g/L sur de la mélasse de caroube à 31,8 g/L de sucre fortement enrichi en lactosérum (dont lactose) et Tween 80 avec *Lactobacillus delbrueckii*. Turhan et al. (2010b) ont remarqué que l'utilisation d'une invertase capable de convertir le saccharose en monosaccharides améliorerait la production d'acide lactique de 31,4 à 59,3 g/L, ce que les auteurs ont interprété par le fait que *L. casei* ne peut utiliser directement le saccharose comme substrat. Comme pour l'éthanol, il apparaît que le déchet solide issu de la production de mélasse de caroube n'a jamais été étudié.

### 1.4 Biohydrogène de deuxième génération

#### 1.4.1 L'hydrogène comme vecteur d'énergie du futur

L'épuisement des combustibles fossiles à l'échelle de la planète et les problèmes environnementaux associés à ces combustibles nécessitent de trouver des formes alternatives d'énergie. Nous avons déjà discuté le cas du bioéthanol comme carburant d'origine renouvelable, mais les différents types de biogaz, le biométhane et le biodiesel font également l'objet d'une intense activité de recherche. Cependant, une alternative est l'hydrogène dans le cadre du concept de « l'économie hydrogène » (Rifkin, 2002) dans laquelle l'hydrogène gazeux  $H_2$  serait le vecteur énergétique du futur. Actuellement,  $H_2$  n'est utilisé que pour la synthèse de l'ammoniac et pour l'hydrogénation des huiles alimentaires et des dérivés pétroliers, ainsi que pour celle du charbon et de l'huile de schiste (Ghimire et al., 2015). Aussi, environ 98% de l'hydrogène produit à ce jour provient des combustibles fossiles, principalement du gaz naturel (48%) et d'huile (30%) au moyen de procédés de reformage à la vapeur (vaporeformage), ainsi que plus marginalement par d'autres procédés industriels, tels que la gazéification du charbon (18%) et l'électrolyse de l'eau (4%) (Singh et al., 2015). Ces voies sont résumées sur la Figure 1:9. En effet, alors que  $H_2$  est abondant dans l'Univers, il n'est quasiment pas présent sur Terre. Cependant, ces procédés consomment beaucoup d'énergie et utilisent de ressources non-renouvelables, ce qui les rend moins attractifs d'un point de vue environnemental. L'électrolyse de l'eau est probablement la technologie la plus propre pour la production d'hydrogène gazeux, mais le coût en électricité représente 80% du coût de production de  $H_2$  et l'eau d'alimentation doit être déminéralisée pour éviter des dépôts sur les électrodes et la corrosion. L'électrolyse apparaît cependant comme un moyen de stockage de l'énergie électrique développé dans les stratégies « power-to-gas » destinées à stocker l'électricité éolienne et solaire renouvelable, mais intermittente. En effet, l'hydrogène est considéré comme une ressource énergétique alternative très efficace et non polluante, du moins si son mode de production l'est, car sa combustion produit uniquement de l'eau comme sous-produit. De plus, son pouvoir calorifique supérieur est élevé (PCS de 142 MJ/kg) et sa combustion génère environ 2,75 fois plus d'énergie que l'essence à masse constante. Ses applications potentielles pourraient couvrir l'essentiel des secteurs de la consommation énergétique, c'est-à-dire le transport, le bâtiment et l'industrie, principalement au moyen de la pile à combustible qui permet de produire de l'électricité à partir de  $H_2$ , et de façon plus marginale au moyen d'un moteur thermique à hydrogène.



**Figure 1:9.** La filière hydrogène (©Connaissance des Énergies d'après CEA).

Une alternative au power-to-gas est la production directe d'hydrogène « renouvelable », par exemple d'hydrogène bio-sourcé (Figure 1:9), communément appelé *biohydrogène*. L'hydrogène bio-sourcé, obtenu directement ou indirectement à partir de biomasse, peut être produit selon plusieurs voies (Venkata Mohan et Pandey, 2013) :

- Le vaporeformage de matières renouvelables, comme le biogaz, les huiles de pyrolyse... Cela revient à adapter le procédé classique à d'autres matières premières que le gaz naturel ; en théorie, de nombreuses molécules comme le bioéthanol sont utilisables, mais la rentabilité du procédé est alors bien plus faible que celle du gaz naturel (Kumar et Sarkar, 2011).
- La voie thermochimique (pyrolyse, gazéification) qui produit un syngaz CO/H<sub>2</sub> en purifiant l'hydrogène du syngaz par divers procédés, comme l'adsorption (Bhaskar et al., 2013) ;
- La voie fermentaire sombre qui met en jeu des processus biologiques anaérobies similaires à la méthanisation (Latrille et al., 2011) ;
- La photo-fermentation qui met en jeu des micro-organismes produisant de l'hydrogène à partir de substrats comme les acides gras volatils en présence de lumière (Cournac et al., 2012) ; elle peut être couplée à la voie sombre en utilisant les digestats liquides produits par cette dernière comme substrat (Venkata Mohan et al., 2011) ;

- La voie photosynthétique, également en présence de lumière, mais qui repose sur le principe de la biophotolyse de l'eau, en général au moyen de microalgues, ce qui correspond à des biocarburants de troisième génération (Cournac et al., 2012) ;
- L'électrolyse microbienne dans des piles à combustibles microbiennes productrices de H<sub>2</sub> ; cette voie est actuellement la moins mature et fait face à des limitations technologiques (matériaux des anodes et des cathodes, extrapolation...) (Latrille et al., 2011).

On constate que l'hydrogène peut être produit par des micro-organismes autotrophes et hétérotrophes (Kotay et al., 2008). Dans les conversions autotrophes comme la biophotolyse directe ou indirecte, l'énergie solaire est directement convertie en hydrogène par des réactions photosynthétiques médiées par des micro-organismes photosynthétiques (microalgues, mais aussi protistes et autres bactéries photosynthétiques). Dans des conditions hétérotrophes, les substrats organiques sont transformés en composés organiques simples avec production simultanée d'hydrogène moléculaire (Li et al., 2007 ; Das et al., 2008).

Dans ce chapitre, nous ne traiterons que du cas de la voie fermentaire sombre qui sera appliquée au déchet de caroube.

### 1.4.2 La production d'hydrogène par fermentation sombre

La production d'hydrogène par fermentation sombre a récemment fait l'objet d'une grande attention en raison de ses avantages. Ceux-ci incluent le fait que l'industrialisation de cette technologie est assez simple et que ce procédé produit une source d'énergie respectueuse de l'environnement. La fermentation sombre présente, de plus, un rendement très élevé par rapport à la production d'hydrogène photosynthétique, et elle n'est pas limitée par les besoins en lumière, ce qui permet de produire de l'hydrogène en permanence. Son mécanisme nécessite des enzymes hydrogénases de micro-organismes anaérobies (Kovacs et al., 2004). En pratique, elle correspond à la première partie du mécanisme de la digestion anaérobie, également appelée *méthanisation*, dans laquelle les étapes de production de méthane ont été inhibées. Elle peut être conduite (Latrille et al., 2011) :

- *En culture pure ou mixte* : les cultures ont en général des rendements de production en H<sub>2</sub> plus élevés, mais sont sensibles aux risques de contamination. L'absence de besoin de stérilité rend les cultures mixtes plus attractives.
- *Avec des micro-organismes mésophiles, thermophiles, voire extrêmophiles* : si augmenter la température permet d'augmenter les rendements en hydrogène, le bilan énergétique net de l'opération doit tenir compte des besoins supplémentaires en énergie thermique pour le maintien en température du réacteur ;
- *Dans une gamme limitée de pH* : celle-ci est souvent assez étroite, de moins d'une unité de pH, ce qui implique qu'une régulation du pH est en général indispensable car la formation d'acides gras volatils en cours de culture induit une diminution du pH.
- *Sur une grande variété de substrats*, mais avec des rendements assez variables (Latrille et al., 2011).

- Avec une grande variété de réacteurs : cuves agitées, lits fluidisés, lits fixes, UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), bioréacteurs à membranes peuvent être mis en œuvre. Ils présentent tous à la fois des avantages et des inconvénients qui ont été résumés par Lin et Yu (2011) et qui peuvent dépendre des substrats utilisés.

En fin de culture, on obtient un biogaz H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> et un digestat liquide contenant principalement des acides gras volatils (acétate, butyrate, mais aussi formate, propionate, succinate, valérate, lactate...) et parfois de l'éthanol.

### 1.4.2.1 Substrats utilisés dans la fermentation sombre

De nombreux déchets peuvent être utilisés comme sources de carbone renouvelables pour la production d'hydrogène, comme les sous-produits de l'industrie agricole et alimentaire, y compris l'amidon, les eaux usées industrielles riches en cellulose et les déchets de boues des stations d'épuration des eaux usées (Das et al., 2008). A partir de ces substrats, il est possible de combiner la production de l'hydrogène bio-sourcé au traitement de déchets solides ou liquide dans un procédé respectueux de l'environnement (Ghimire et al., 2015). Dans les travaux récents sur la fermentation sombre, des substrats complexes ont été étudiés, comme la fraction organique des déchets solides municipaux (Valdez-Vazquez et al., 2005 ; Chen, et al., 2012 ; Tawfik et al., 2012), les résidus agricoles comme la biomasse lignocellulosique (par exemple, la paille de riz, la paille de blé et les tiges de maïs). Les travaux sur la caroube sont rares si l'on excepte ceux de Fountoulakis et al. (2014) et de Dias (2015). Si Dias (2015) montre que la caroube est un excellent substrat pour la production de biohydrogène en cultures pures par *Clostridium butyricum*, Fountoulakis et al. (2014) ont obtenu un rendement de seulement 0,43 mol H<sub>2</sub> par mole de glucose à partir de caroube en culture mixte en continu.

### 1.4.2.2 Les micro-organismes utilisés dans la fermentation sombre

Dans le cas de cultures pures, l'espèce la plus utilisée pour la production de l'hydrogène est le *Clostridium*. Les cultures mixtes utilisent un consortium microbien comportant souvent des bactéries indigènes (boues activées, compost...). Une étape indispensable est l'élimination des bactéries consommatrices d'hydrogène afin de maximiser la production de biohydrogène en favorisant la croissance des micro-organismes producteurs d'hydrogène. Parmi ces bactéries consommatrices, il y a les méthanogènes, les bactéries hydrogénotrophes sulfato-réductrices (SRB), les producteurs de propionate, les bactéries ferri-réductrices et les bactéries lactiques (LAB). Parmi les méthodes de traitement, on recense les chocs thermique, acide et basique, ainsi que l'aération, la congélation et la décongélation, le chloroforme et l'utilisation du sodium 2-bromoéthanesulfonate (Wang et al., 2008). Le procédé de choc thermique à une température comprise entre 80 et 140°C pendant 15 minutes à 3 heures est le plus utilisé car il est simple, peu coûteux et rapide par rapport aux autres types de traitements (Kim et al., 2008). Même dans les cultures mixtes utilisées pour la fermentation sombre, les *clostridiaceae* sont les souches les plus représentées. Mais on trouve également des souches de la famille des entérobactéries qui ont l'avantage d'être anaérobies facultatives, alors que la famille des *Clostridium* est de type anaérobie stricte. Si la composition des inocula est très

variable selon leur origine (compost, boues activées...), elle évolue dynamiquement en cours de culture.

### 1.4.2.3 Mécanisme de la fermentation sombre

Lors de la fermentation sombre, un sucre, par exemple le glucose, est dégradé en conditions anaérobies par glycolyse pour donner deux moles de pyruvate par mole d'hexose. Ce pyruvate est ensuite transformé par l'enzyme pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) pour former de l'acétyl-CoA et la ferrédoxine (réduite), Fd(red). L'acétyl-CoA est métabolisé dans le cycle de Calvin pour produire de l'ATP tandis que la Fd(red) est oxydée par l'hydrogénase à fer seul [FeFe] pour produire de l'hydrogène. Comme le montre la Figure 1:10, 2 moles de pyruvate sont générées par la glycolyse à partir d'une mole d'hexose et, à partir de chaque mole de pyruvate, deux Fd(ox) sont réduits par la PFOR. En théorie, le rendement maximal de la fermentation anaérobie serait donc de quatre moles d'hydrogène produites par mole d'hexose consommée si les produits de la réaction n'étaient pas métabolisés.

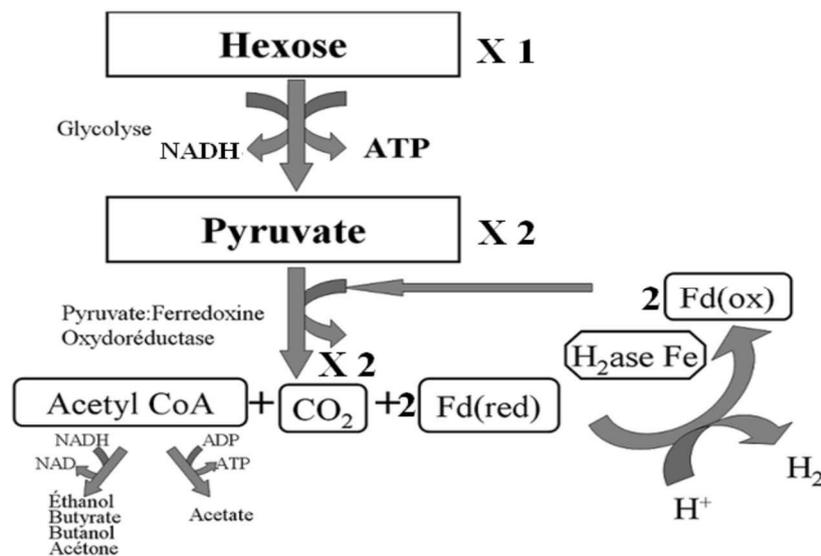
La fermentation sombre des hydrates de carbone produit un rendement maximal théorique de 4 moles H<sub>2</sub> par mole de sucre en C<sub>6</sub> transformé, bien que les rendements rapportés soient généralement bien plus faibles en raison des limitations thermodynamiques et de la formation de sous-produits (Hawkes et al., 2007). Ces produits finaux sont principalement des acides gras volatils à partir desquels du méthane peut être facilement produit en utilisant la technologie de digestion anaérobie bien établie (Kyazze et al., 2007).

Sur la Figure 1:10, lorsque la voie métabolique dominante de la fermentation sombre favorise la production d'acide acétique (Li et al., 2007), son rendement stœchiométrique en H<sub>2</sub> est de 4 moles par mole de glucose consommé :



En revanche, le rendement en H<sub>2</sub> n'est que de 2 moles par mole de glucose lorsque le produit final est l'acide butyrique (Li et al., 2007) :



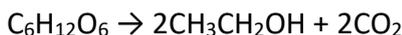


**Figure 1:10.** Mécanisme de production d'hydrogène par la fermentation sombre.

Dans certaines conditions, certaines voies métaboliques conduisent à l'éthanol et à la production simultanée d'acétate (Li et al., 2007), ce qui réduit le rendement en hydrogène à 2 moles d'H<sub>2</sub> par mole de glucose :



En revanche, les voies métaboliques conduisant à l'éthanol et au lactate ne produisent pas d'hydrogène, tandis que la production de propionate peut être consommatrice de H<sub>2</sub> :



La voie métabolique dominante dépend de la nature des micro-organismes, des conditions de température et de pH, et des nutriments en présence. En particulier, les éléments nutritifs tels que l'azote, le phosphate, les ions métalliques et autres oligoéléments sont nécessaires. Dans la suite de cette section, en plus de l'analyse des effets de la température et du pH, nous nous intéresserons aux rôles spécifiques de l'azote et du fer.

#### 1.4.2.4 Influence du pH

Le pH est l'un des facteurs les plus importants dans les mécanismes de la fermentation sombre. En effet, le pH affecte non seulement le rendement de la production d'hydrogène, mais il peut également modifier le profil des sous-produits et il a un impact sur la structure des communautés microbiennes dans le cas des cultures mixtes. Il est connu que les faibles pH conduisent à l'inhibition de l'activité hydrogénase (Khanal et al., 2004). Les voies métaboliques impliquant l'acétate et la production de butyrate semblent être favorisées dans une gamme de pH comprise entre 4,5 et 6,0,

tandis que des pH neutres ou supérieurs sont supposés promouvoir la production de l'éthanol et du propionate.

La plupart des travaux de la littérature ont montré que le pH le plus approprié pour les bactéries produisant de l'hydrogène se situe dans une gamme comprise entre 5 et 6. Un pH inférieur à 4,5 favorise la production de solvants (Van Ginkel et al., 2005). Par exemple, dans le cas de la fermentation du glucose par *C. pasteurianum*, un pH inférieur à 5 favorise le butanol et l'acétone (Dabrock et al., 1992). De même, le pH optimal pour les déchets alimentaires organiques varie de 4,5 à 7, pour les déchets lignocellulosique il varie de 6,5 à 7, tandis qu'un pH neutre semble optimal pour le fumier animal (Guo et al., 2010). En pratique, aucune production de biohydrogène n'a été rapportée à un pH inférieur à 4,0 ou supérieur à 8,0 car un pH très acide conduit à une perturbation de la maintenance des cellules dans laquelle l'énergie (ATP) est utilisée pour maintenir la neutralité du milieu au lieu de produire du biohydrogène (Hallenbeck et Ghosh, 2009).

### 1.4.2.5 Température

La température est également l'un des paramètres les plus importants dans la production d'hydrogène par fermentation sombre. La température affecte la croissance des micro-organismes, le degré d'hydrolyse du substrat et le rendement de production en hydrogène. Les micro-organismes thermophiles peuvent utiliser plus efficacement les sucres complexes pour la production d'hydrogène que les mésophiles. Toutefois, la majorité des études récentes sur la fermentation sombre a été réalisée dans des conditions mésophiles, plus précisément entre 30 et 40°C (Yasin et al., 2013), et typiquement dans la gamme 35-37°C (Dong et al., 2009 ; Zong et al., 2009 ; Hong et Haiyun, 2010). L'effet de la température dans la gamme mésophile (30-45°C) a été étudié en détail par Kim et al. (2008) sur des micro-organismes mésophiles ; la production d'hydrogène augmente lorsque la température augmente jusqu'à 40°C (avec un maximum pour la production d'acétate et de butyrate), puis elle est fortement inhibée à 45°C. Des études sur les conditions thermophiles (la plupart du temps à une température de 55°C) sont également documentées dans la littérature (Chu et al., 2008 , Valdez-Vazquez et Poggi-Varaldo 2009). Les conditions thermophiles sont supposées améliorer l'activité enzymatique des hydrogénases pendant la fermentation par *Clostridia* et inhiber l'activité des consommateurs d'hydrogène (Lay et al., 1999 , Oh et al., 2004), mais au prix d'une dépense énergétique plus importante pour le maintien en température du fermenteur.

### 1.4.2.6 Besoins en azote

L'azote a une grande importance pour les producteurs d'hydrogène car il est un élément indispensable aux protéines, aux acides nucléiques et à de nombreux enzymes. Cependant, la littérature montre un profond désaccord entre les concentrations en azote ammoniacal optimales pour la production d'hydrogène. Une comparaison plus détaillée des données de la littérature est présentée dans le Tableau 1:5. On constate que c'est la différence entre les micro-organismes mis en jeu qui peut expliquer ces résultats. D'autres auteurs se sont plutôt focalisés sur l'optimisation des rapports C/N/P (Argun et al., 2008), mais leurs résultats confirment la dépendance au micro-organisme, voire au substrat, de l'ajout optimal d'une source d'azote.

**Tableau 1:5.** Effets de la concentration en azote sur la production de dihydrogène par fermentation sombre (Wang et al., 2008).

Inoculum	Substrat	Type de réacteur	Source d'azote	Concentration en composé azoté		Rendement maximal en H <sub>2</sub>
				Gamme étudiée	Optimum	
<i>Escherichia coli</i>	Glucose 0,4%	Batch	NH <sub>4</sub> Cl	0 à 0,2 g.L <sup>-1</sup>	0,01 g.L <sup>-1</sup>	1,7 mole H <sub>2</sub> /mole de glucose
Boues anaérobies traitées thermiquement	Glucose 3,76 g.L <sup>-1</sup>	Batch	NH <sub>4</sub> Cl	0,5 à 10 g.L <sup>-1</sup>	7 g.L <sup>-1</sup>	0,96 mole H <sub>2</sub> /mole de glucose
Compost d'herbes	Déchets alimentaires	Batch	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0 à 0,6 g.L <sup>-1</sup>	0,4 g.L <sup>-1</sup>	3,2 mmole H <sub>2</sub> /g de MVS*
Boues anaérobies enrichies à partir de céréales concassées	Amidon de maïs 15 g.L <sup>-1</sup>	Batch	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,1 à 2 g.L <sup>-1</sup>	1 g.L <sup>-1</sup>	0,5 mmole H <sub>2</sub> /g d'amidon
Compost	Glucose 1 %	Batch	Extrait de levures	2 à 8%	4%	2,1 mole H <sub>2</sub> /mole de glucose
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Glucose 1%	Batch	Poly-peptones	0 à 5%	2%	1,0 mole H <sub>2</sub> /mole de glucose

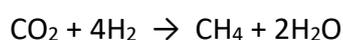
\*MVS : matières volatiles sèches.

### 1.4.2.7 Besoins en fer

Le fer est également un composant important pour la croissance bactérienne, pour la biosynthèse d'enzymes et la formation des hydrogénases, donc pour la production d'hydrogène. Ainsi, de nombreux travaux ont porté sur l'effet de la concentration du milieu en fer. Cependant, il n'existe pas d'accord entre les différentes contributions sur la concentration optimale. Par exemple, Liu et al. (2004) ont trouvé que 10 mg/L est la concentration optimale, tandis que Zhang et al. (2005) ont trouvé un optimum à 1600 mg/L. Il est possible que cet optimum dépende de la composition du consortium microbien, ce qui expliquerait ces différences. En tous cas, l'ajout de fer au milieu est indispensable à la formation de biohydrogène.

### 1.4.3 Conclusion

La fermentation sombre permettant de produire du biohydrogène 2G apparaît comme une voie possible de valorisation du déchet de caroube, d'autant plus si l'on tient compte du potentiel de l'hydrogène comme vecteur d'énergie et outil de stockage de l'électricité dans une approche « power-to-gas ». Une autre utilisation potentielle de l'hydrogène concerne l'utilisation du CO<sub>2</sub> en excès par un procédé de *méthanation* qui peut être chimique ou biologique et s'appuie sur la réaction de Sabatier (connue depuis 1902) :



D'importants projets (comme en France GRHYD porté par l'entreprise *Engie*) et travaux de recherche sont en cours sur ces points, comme par exemple l'injection d'hydrogène produit par

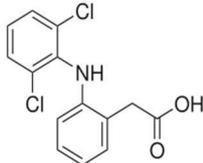
électrolyse dans le gaz de ville ou l'utilisation d'hythane (mélange CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>) comme carburant, même si le développement de l'économie hydrogène reste encore hypothétique à cause de la faible compétitivité économique de la « chaîne hydrogène » par rapport à des voies alternatives. Comme nous l'avons mentionné, il n'existe que très peu de travaux sur l'utilisation de la caroube pour la fermentation sombre : de plus, les conditions de culture et les résultats obtenus diffèrent fortement, ce qui ne permet pas de conclure a priori sur les résultats qu'il est possible d'obtenir avec le déchet de caroube libanais. Une étude expérimentale est donc nécessaire.

## 1.5 Traitement des eaux pour l'élimination du diclofénac

### 1.5.1 Généralités sur le diclofénac

Le diclofénac est un anti-inflammatoire non-stéroïdien qui sert à atténuer les douleurs articulaires. Les médicaments anti-douleur, appelés analgésiques (ou antalgiques) agissent en bloquant la cyclo-oxygénase (COX), enzyme qui catalyse la synthèse des différentes prostaglandines de l'acide arachidonique (Vane et al., 1998). Si le diclofénac est l'antalgique le plus prescrit dans le monde, les autres molécules bien connues sont l'ibuprofène et le le naproxène. Le diclofénac (DCF) est commercialisé dans un grand nombre de formulations différentes sous des noms génériques tels que *Diclométin*, *Diclomex* et *Voltaren* (*Voltarène* étant le nom le plus connu en France). Le nom diclofénac est dérivé du nom chimique de sa molécule, l'acide 2-(2,6-dichloranilino)-phénylacétique. C'est un acide faible, polaire (Tableau 1:6), utilisé en médecine humaine et vétérinaire pour réduire l'inflammation et la douleur (Al-Rajab et al., 2010). Il est principalement utilisé sous forme de sel de diclofénac sodique. La consommation mondiale de DCF est estimée à 940 tonnes par an, avec une dose quotidienne définie de 100 mg. Le diclofénac a été découvert par Ciba-Geigy, une entreprise pharmaceutique suisse en 1973 (maintenant fusionnée dans le groupe Novartis).

**Tableau 1:6.** Propriétés physicochimiques du diclofénac (DCF).

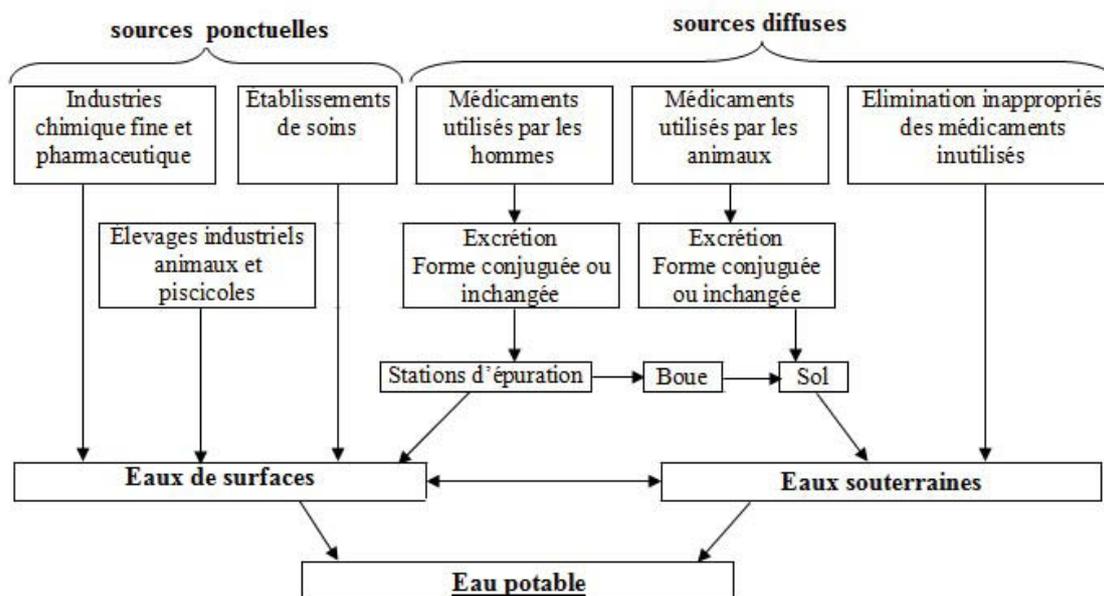
Classe thérapeutique	Antalgique
Formule	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>
Structure	
Masse molaire (g/mol)	296,14
pK <sub>a</sub>	4,2
Log K <sub>ow</sub>	0,70 et 4,51
Solubilité dans l'eau à 25°C	2,37.10 <sup>-3</sup> g/L

### 1.5.1.1 Origine de la micropollution aqueuse par les produits pharmaceutiques et le DCF

Différentes classes de produits pharmaceutiques sont présents dans l'eau, notamment les anti-inflammatoires, les analgésiques, les régulateurs de lipides sanguins, les antidépresseurs, les antiépileptiques, les hormones et les antimicrobiens. Ces substances qui sont purement d'origine anthropique sont classées sous le nom de *micropolluants pharmaceutiques*. Ils ont été détectés dans les eaux souterraines et de surface (Andreozzi et al., 2003 ; Perez-Estrada et al., 2005), l'eau potable dont l'eau du robinet, les sédiments océaniques et les sols. Lorsque ces produits pharmaceutiques sont présents dans l'environnement, ils ont des effets potentiellement inquiétants sur la faune et la flore (Fent et al., 2006). Leur présence dans l'environnement résulte de plusieurs mécanismes qui opèrent en parallèle (Figure 1:11) :

- L'excrétion métabolique, principal mécanisme de dissémination des micropolluants pharmaceutiques, qui peut être directe (molécule non métabolisée) ou indirecte lorsque des métabolites conjugués ou très peu modifiés dans l'organisme peuvent être ultérieurement hydrolysés dans l'environnement pour redonner la molécule initiale.
- Le rejet direct des médicaments dans les eaux résiduaires par les industries pharmaceutiques qui provient des unités de production (Zuccato et al., 2000).
- Les effluents hospitaliers et les effluents agricoles pour les médicaments vétérinaires qui résultent de l'utilisation industrielle des médicaments.
- L'élimination incomplète des produits pharmaceutiques par les stations d'épuration, ce qui conduit ces stations à rejeter ces produits pharmaceutiques dans l'environnement.

Récemment, le DCF a attiré l'attention à cause de sa présence fréquente dans les sources d'eau potable (Gros et al., 2010) ; il a également été détecté à moins de 10 ng/L dans un échantillon d'eau potable à partir d'un robinet d'eau privé à Berlin (Heberer, 2002). Des traces de DCF ont été détectées dans presque tous les pays de l'Union Européenne (Lonappan et al., 2016). La concentration maximale en diclofénac dans les eaux de surface qui a été mesurée est de 1030 ng/L. Toutefois, aucune mesure n'a signalé sa présence dans le milieu marin. Cela provient du fait qu'après administration orale, le diclofénac est éliminé dans une courte période par l'organisme (temps de demi-vie d'environ 2 heures, selon Wishart et al., 2006). Pourtant, environ 65% de la dose sont excrétés dans l'urine dans laquelle six métabolites ont été identifiés. Aussi, 17% du diclofénac retrouvé dans les stations d'épuration est d'origine hospitalière.



**Figure 1:11.** Sources de la micropollution aqueuse par les produits pharmaceutiques (Bonnin, 2006).

### 1.5.1.2 Toxicité du DCF

De nombreuses études ont mis en évidence des preuves d'impacts négatifs à long terme d'une exposition pharmaceutique chronique sur les organismes et les populations vivantes (Macherius et al., 2014). Les micropolluants pharmaceutiques peuvent perturber ou modifier le système endocrinien et induire une résistance aux agents pathogènes, comme dans le cas de plusieurs antibiotiques (Pomati et al., 2006). Pour le diclofénac, certains effets nocifs ont été observés à des concentrations faibles. L'un des effets secondaires du diclofénac est l'apparition d'insuffisance rénale (Oaks et al., 2004). Le DCF est toxique pour les oiseaux et des études ont prouvé sa toxicité sur les vautours : au Pakistan, en Inde, au Bangladesh et au Népal, le diclofénac a provoqué une forte baisse de la population des vautours (Oaks et al., 2004). Le DCF a également affecté négativement la croissance des œufs de mdaka, une espèce de poisson ; il peut s'accumuler dans le foie, le rein, les branchies et les tissus musculaires de la truite et peut provoquer des altérations cytologiques même à une concentration de 1 µg/L (Schwaiger et al., 2004 ; Tribskorn et al., 2004). La toxicité rénale et hépatique a également été mesurée sur certaines espèces de poissons à des concentrations de l'ordre du microgramme par litre (Fent et al., 2006) : le DCF et ses métabolites ont été détectés dans la bile de ces poissons (Kallio et al., 2010). Le DCF provoque aussi la peroxydation lipidique chez les moules, ce qui induit des lésions tissulaires (Schmidt et al., 2011). Il peut encore agir sur la croissance des bactéries Gram(+) et Gram(-) en inhibant la synthèse de l'ADN à des concentrations qui sont cependant bien plus élevées que celle communément rencontrées (50 à 100 mg/L). Le DCF peut également interagir avec d'autres contaminants inorganiques dans l'environnement, en particulier dans les stations de traitement des eaux usées, comme les métaux, d'autres contaminants organiques et même avec ses propres métabolites (Lonappan et al., 2016). Des études antérieures ont déjà prouvé que le DCF possède une activité anti-inflammatoire plus élevée en présence de certains métaux (Kovala-

Demertzi, 2000). De même, les complexes entre le DCF et des ions métalliques comme Hg(II), Pb(II), et Sn (II) sont connus pour être des agents antibactériens (Refat et al., 2014), tandis que le complexe entre le DCF et Cu(II) peut cliver l'ADN (Theodorou et al., 1999).

En 2006, l'utilisation vétérinaire de DCF a été interdite en Inde (The Drugs Controller General, 2006). En outre, en 2008, l'Inde a imposé des restrictions supplémentaires sur l'utilisation de diclofénac pour les animaux, de même que le Népal et le Pakistan, suivis par le Bangladesh en 2010 (Lonappan et al., 2016). Malgré cela, la toxicité du DCF, comme celle des micropolluants, reste encore mal comprise.

### 1.5.2 Procédés d'élimination du DCF

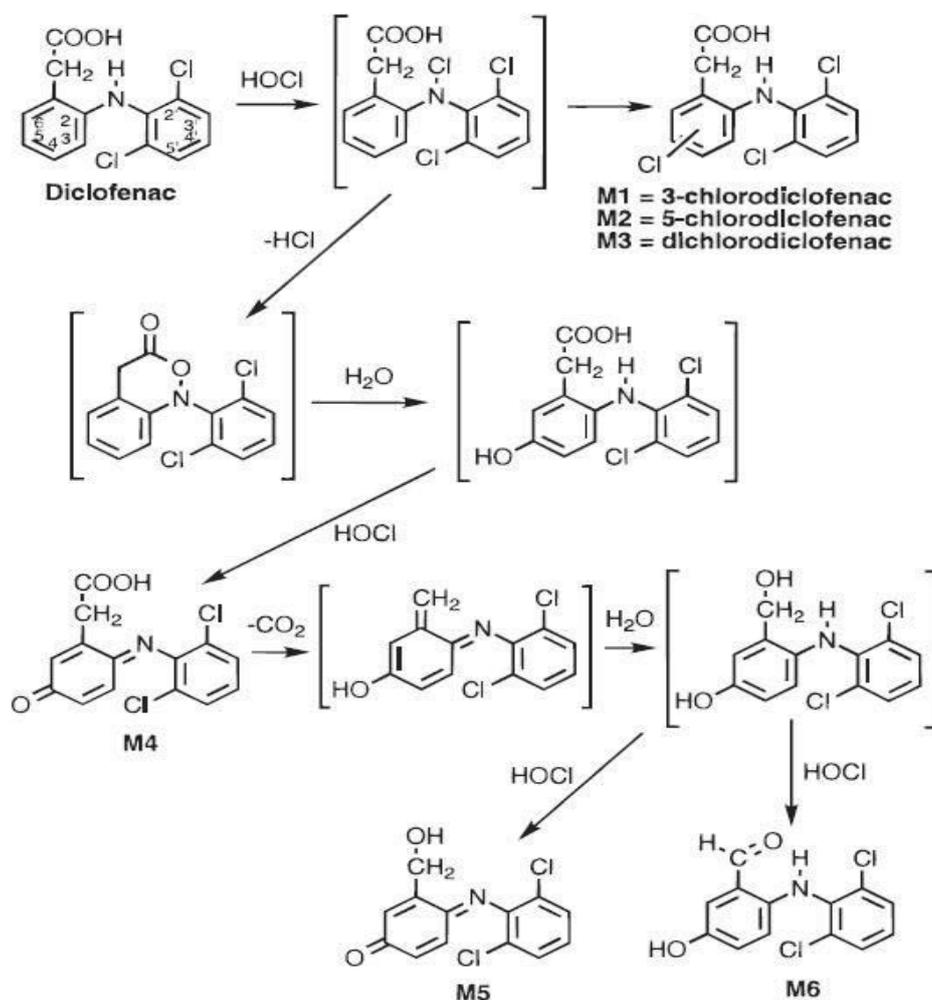
#### 1.5.2.1 Adsorption sur le charbon actif

L'adsorption sur charbon actif est souvent utilisée pour éliminer les traces de diclofénac présentes dans l'environnement aquatique en raison de son faible coût (Cherik et al., 2015). Les résultats de la littérature montrent que lors de l'adsorption du DCF sur un charbon actif préparé à partir de déchets d'olives, la température n'a aucun effet sur le processus d'adsorption, tandis que l'augmentation du pH réduit la quantité adsorbée (Baccar et al., 2012), ce qui semble montrer que la forme acide est adsorbée préférentiellement. L'adsorption du diclofénac sodique sur la bagasse de raisin montre que le pourcentage d'élimination était compris entre 16,4 % et 22,8 % et indépendante de la concentration initiale de diclofénac sodique (Antunes et al., 2012). En fait, la capacité d'adsorption des charbons actifs dépend de leur point isoélectrique (ou point de charge nulle) et de leurs propriétés de surface (volume poreux, surface spécifique, groupes fonctionnels et acidité de surface). Ainsi, un produit commercial comme le Clarimex® 061 CAE conduit à un rendement d'élimination qui varie de 68 % et 99 % lors d'une augmentation de la concentration de DCF de 10 mg/L à 50 mg/L (Vona et al., 2015), alors que le rendement d'élimination a diminué de 82,7 % à 70,2 % dans les mêmes conditions avec un charbon actif Epibon®.

#### 1.5.2.2 Chloration

Le traitement des eaux par les dérivés chlorés (notamment ClO<sub>2</sub>) est une méthode connue pour dégrader efficacement et rapidement le DCF en quelques minutes selon trois voies : chloration, hydroxylation et décarboxylation. En revanche, il peut y avoir formation d'intermédiaires chlorés qui sont plus toxiques que le composé initial, ce qui pose une question d'utilisation de ClO<sub>2</sub> pour la désinfection (Wang et al., 2013). Dans une étude au cours de laquelle l'élimination du DCF a été étudiée en fonction de la concentration en chlore et en bromure à pH 5,7, 7 et 8,3, des valeurs de demi-vie du diclofénac de l'ordre de 325,2 minutes et de 72,6 minutes ont été rapportées à pH 7 en l'absence de bromure pour des concentrations en chlore respectivement de 1 mg/L et de 10 mg/L. Pour de faibles concentrations en chlore, il a été montré dans cette étude que la présence de bromure pouvait accélérer la réaction. En l'absence de bromure, deux sous-produits de chloration dont le chloro-diclofénac et un autre composé correspondant au chloro-diclofénac décarboxylé ont été mis en évidence. Aucun mécanisme de formation de ces sous-produits n'a été proposé (Wang et al.,

2013), mais un mécanisme avait été préalablement proposé par Miyamoto et al. (1997) ; celui-ci est présenté sur la Figure 1:12.



**Figure 1:12.** Mécanisme de dégradation du DCF par le chlore proposé par Miyamoto et al. (1997).

### 1.5.2.3 Boues activées classiques et bioréacteur à membrane

Dans les usines de traitement des eaux usées conventionnelles, seulement environ 30% du diclofénac est généralement éliminé (Suárez et al., 2008). Ces usines reposent en très grande majorité sur le procédé à *boues activées* qui est le plus utilisé pour le traitement biologique des eaux en qualité de traitement secondaire. Quintana et al. (2005) ont étudié la biodégradation du diclofénac par les boues activées ; ils n'ont observé aucune transformation du diclofénac sur plus de 28 jours, ni lorsque le diclofénac était la seule source de carbone (20 mg/L), ni lorsqu'il était mélangé avec du lait en poudre (2 à 50 mg/L). Dans une autre étude où la capacité des boues activées à éliminer le diclofénac a été analysée, les résultats ont également montré que ce médicament n'a pas été complètement éliminé (entre 0 et 50 %, selon Radjenović et al., 2009). D'autres travaux plus récents ont mentionné que la dégradation microbienne du DCF par des boues activées ne conduit pas à son élimination complète et que celle-ci ne dépasse pas 50 % (Petrie et al., 2013), ce qui est en accord avec les résultats de Zupanc et al. (2013) qui ont atteint 48 % d'élimination. De plus, il semble que

ce traitement produit des métabolites secondaires qui sont également considérés comme toxiques (Kosjek et al., 2009).

En fait, la diversité des résultats obtenus traduit la diversité de la flore microbienne des boues activées qui peut varier d'une station d'épuration à l'autre et donc d'une étude à l'autre. Il est donc difficile de généraliser les valeurs de rendement d'élimination, excepté le fait que le procédé à boues activées n'est pas capable d'éliminer suffisamment le DCF. Cette conclusion n'est pas surprenante car le DCF est considéré comme l'un des composés les plus pertinents en termes d'écotoxicité et de persistance dans l'environnement pour le suivi des micropolluants pharmaceutiques. Ainsi, le DCF a été détecté dans l'effluent des stations d'épuration des eaux usées et dans les eaux de surface respectivement jusqu'à 4,7 µg/L et 1,2 µg/L, et même dans les eaux souterraines et dans l'eau du robinet à des concentrations allant respectivement jusqu'à 380 ng/L et 10 ng/L (Heberer, 2002 ; Aguinaco et al., 2012).

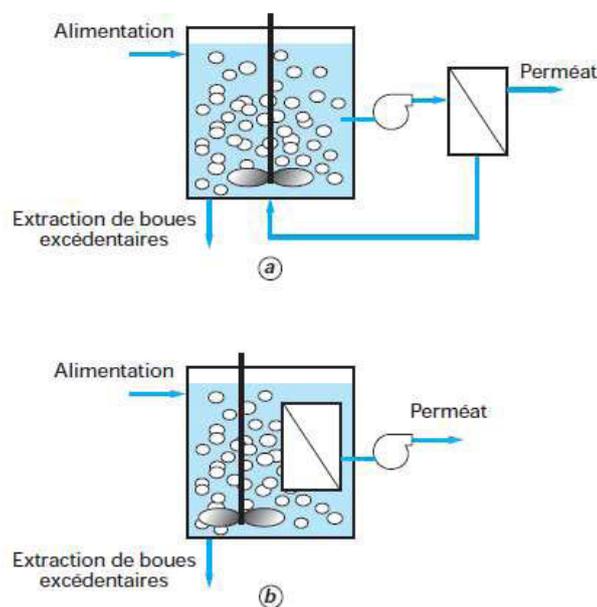
D'un point de vue plus fondamental, Fan et al. (2014) ont étudié la biodégradabilité du diclofénac avec deux types de boues : stérilisées et activées. En pratique, les boues sont susceptibles d'éliminer les micropolluants selon deux voies principales :

- L'adsorption par fixation à la surface des membranes cellulaires qui peut être suivie ou pas par une dégradation ; souvent, elle correspond à un déplacement sans transformation chimique de la pollution.
- L'absorption dans la cellule qui peut également être suivie ou pas d'une dégradation, mais où l'assimilation/dégradation est bien plus probable que pour le mécanisme d'adsorption.

Les résultats montrent que pour les boues stérilisées, un pourcentage d'élimination de 40,1% a été atteint en 6 heures. En revanche, pour les boues activées, seulement 19,7% du DCF a été éliminé en 6 heures avec une large fraction du DCF adsorbé (14,9%) et une biodégradation limitée à 4,8% de la concentration initiale. Ceci peut être expliqué par une modification des caractéristiques des boues durant la stérilisation qui améliorent l'élimination du DCF par adsorption.

La faible biodégradation de diclofénac a été également mentionnée par Kimura et al. (2007) dans des expériences d'élimination mettant en jeu respectivement un bioréacteur classique et un bioréacteur à membrane (BAM/MBR). Seule la combinaison d'un BAM/MBR avec d'autres technologies de traitement tertiaires, comme l'ozonation, semble permettre une élimination efficace des produits pharmaceutiques (Huber et al., 2005). Dans un bioréacteur à membrane (BAM/MBR), le clarificateur est remplacé par une membrane filtrante qui retient la biomasse dans le bioréacteur (Figure 1 :13) ; les principaux avantages d'un BAM/MBR sont sa plus grande efficacité de dégradation, sa compacité et sa plus faible production de boues, tout en permettant d'augmenter le temps de séjour de celles-ci et donc leur efficacité (Chang et al., 2008). Leur principal inconvénient est lié au colmatage des membranes qui induit une baisse significative de perméabilité en cours de filtration par l'accumulation de ces particules sur ou dans la paroi membranaire qui, si elle n'est pas maîtrisée donne naissance à un film biologique structuré dont l'élimination devient très difficile (Grasmick et

al., 2007). La prévention ainsi que l'élimination du colmatage nécessitent des cycles de nettoyage/maintenance physiques ou chimiques.



**Figure 1:13.** Principe de fonctionnement des bioréacteurs à membrane ou BAM/MBR – a) avec membrane externe et recirculation – b) avec membrane immergée (Grasmick et al., 2007).

### 1.5.2.4 Procédés alternatifs de biodégradation du DCF

Malgré l'inefficacité relative du procédé à boues activées, la biodégradation est considérée comme un des procédés d'avenir pour l'élimination de la majorité des xénobiotiques, y compris les produits pharmaceutiques. Les micro-organismes sont, en effet, capables de dégrader assez efficacement toute matière organique, si les souches nécessaires sont ajoutées (bio-addition), ou si les micro-organismes indigènes sont acclimatés (bio-acclimatation).

Dans une usine pilote de traitement des eaux usées, le DCF n'a pas été dégradé avec une concentration initiale de 10 µg/L puisque 96 à 99% de sa concentration initiale se retrouve dans les effluents après 55 heures de traitement (Zwiener et Frimmel, 2003). Des résultats similaires ont été obtenus dans un réacteur à biofilm oxygène après 48 heures de traitement ; cependant, le diclofénac a été mieux dégradé dans un réacteur à biofilm anoxique (avec des rendements d'élimination de 34 à 38 %), ce qui démontre qu'un traitement spécifique aux micropolluants doit être développé.

Globalement, les champignons apparaissent comme les micro-organismes les plus efficaces pour traiter les micropolluants pharmaceutiques. Par exemple, l'enzyme peroxygénase extracellulaire du basidiomycète *Agrocybe aegerita* permet la conversion du diclofénac en 4'-OH diclofénac. Rodarte-Morales et al. (2012) ont étudié la bioconversion du DCF par *Phanerochaete chrysosporium* dans des bioréacteurs fed-batch fonctionnant sous une alimentation continue d'air ou par injections pulvérisées. Les performances de ces réacteurs fongiques ont été stables au cours d'une journée.

L'élimination du diclofénac a atteint 77% après 2 heures, puis une élimination totale après 23 heures de traitement.

De même, il a été démontré que les champignons xylophages de type « pourriture blanche », capables de produire de la lignine peroxydase, de la laccase et de la peroxydase du manganèse, conduisent à une biodégradation significative du DCF. En pratique, la pourriture blanche semble capable de dégrader un grand nombre de produits pharmaceutiques tels que les antibiotiques (tétracycline et oxytétracycline), les régulateurs de lipides (acide clofibrique), les antiépileptiques (carbamazépine), les analgésiques (ibuprofène) et les œstrogènes (17beta-estradiol et 17alpha-éthynylestradiol), ce qui confirme l'importance de ce groupe de micro-organismes à des fins de bioremédiation des produits pharmaceutiques (Marco-Urrea et al., 2009). Plus récemment, Nguyen et al. (2013) ont étudié la dégradation du DCF par de la pourriture blanche dans un BAM/MBR avec et sans addition d'un médiateur d'oxydoréduction (1-hydroxyle-benzotriazole ou HBT) ; leurs résultats montrent que l'addition de ce médiateur améliore l'efficacité de l'élimination du DCF de 70 % à 95 %.

De même, l'utilisation de *Trametes versicolor* a conduit à une dégradation rapide du diclofénac. Le système cytochrome P450 semblerait jouer un rôle clé dans la première étape de dégradation du DCF selon les résultats obtenus avec l'inhibiteur du cytochrome P450 1-aminobenzotriazole. La laccase purifiée à partir de ce champignon peut aussi catalyser la transformation du diclofénac en 4-(2,6-dichlorophénylamino)-1,3-benzènediméthanol. D'autres expériences à l'échelle des réacteurs sont cependant nécessaires pour confirmer l'efficacité de *T. versicolor* sur le diclofénac dans les milieux aquatiques (Marco-Urrea et al., 2009).

### 1.5.2.5 Photo-dégradation naturelle

Le diclofénac a également été décrit comme étant hautement photodégradable à la lumière visible (Buser et al., 1998). La photo-transformation a été identifiée comme le principal processus d'élimination du diclofénac dans un lac (Greifensee) par Buser et al. (1998). Plus de 90% du diclofénac entrant dans le lac a été éliminé vraisemblablement par la dégradation photolytique. Dans ce mécanisme, la demi-vie du DCF a été estimée à 3,3 heures (Schmitt-Jansen et al., 2007).

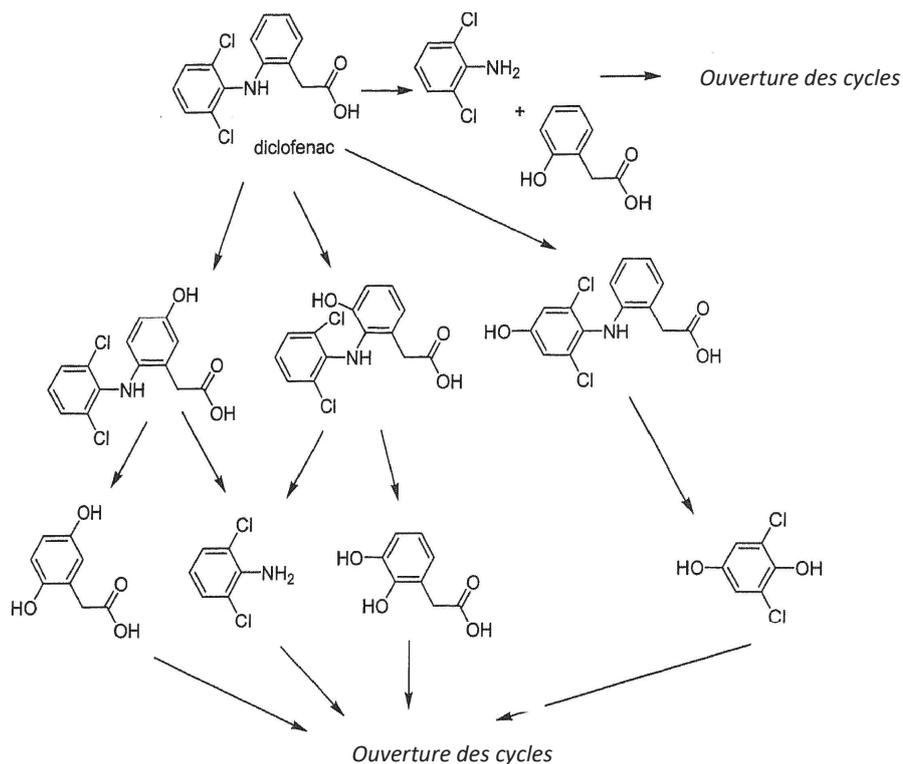
Des expériences de laboratoire ont confirmé la photodégradation rapide du diclofénac dans l'eau lorsqu'il est exposé à la lumière du soleil. Cette dégradation varie selon les saisons. Le photo-produit initial est l'acide 8-chlorocarbazole-1-acétique qui est photodégradé encore plus vite que le composé parent (Poiger et al., 2001). Malheureusement, la profondeur est un paramètre clé pour ce phénomène en milieu naturel : à moins de 50 cm de profondeur, 96% de la concentration initiale a été dégradée en deux semaines, tandis qu'entre 50 et 100 cm de profondeur, la dégradation est limitée à un tiers pendant la même période (Bartels et al., 2007). La photo-transformation du DCF dans l'eau purifiée, l'eau déminéralisée et l'eau du fleuve Mississippi a pu être accélérée par l'alcool isopropylique, un extincteur de radical libre (Packer et al., 2003). Un problème résultant de ce procédé est que certains des sous-produits de photo-transformation ont présenté une toxicité six fois plus importante lors de tests de reproduction d'algues (Schmitt-Jansen et al., 2007).

### 1.5.2.6 Procédés d'oxydation avancée

Les procédés d'oxydation avancée sont des technologies basées sur la formation de radicaux hydroxyles capables d'oxyder les composés récalcitrants, toxiques et non-biodégradables. Ils sont de plus en plus appliqués pour l'élimination de la pollution causée par la présence de produits pharmaceutiques dans les eaux usées depuis moins d'une décennie (Klavarioti et al., 2008), alors qu'ils font partie des traitements tertiaires, à l'origine réservés aux procédés de potabilisation. Les procédés d'oxydation avancée comprennent la photocatalyse homogène et hétérogène par irradiation par de la lumière (en général UV), l'électrolyse, la sonolyse, l'ozonation, et les procédés mettant en œuvre le réactif de Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ ). Ces procédés peuvent parfois être couplés, par exemple ozone/ $\text{H}_2\text{O}_2$  ; ils peuvent être utilisés en finition, mais aussi comme une étape de prétraitement pour convertir les composés initialement biorécalcitrants en des intermédiaires plus facilement biodégradables, puis suivis par un post-traitement biologique (Klavarioti et al., 2008).

L'ozone ( $\text{O}_3$ ) est un oxydant puissant qui se décompose dans l'eau pour former des radicaux hydroxyles qui sont des agents oxydants plus forts que l'ozone lui-même, induisant ainsi l'oxydation de certains groupes fonctionnels de molécules organiques. Par ailleurs, l'efficacité du traitement est améliorée si l'ozone est associé à une irradiation par de la lumière (Irmak et al., 2005) ; de même, le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Zwiener et Frimmel, 2000) et des complexes de fer ou de cuivre peuvent également agir comme des catalyseurs (Skoumal et al., 2006). L'ozonation et le système  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  se sont avérés efficaces pour induire la dégradation de diclofénac, assurant une conversion complète du chlore en ions chlorure et des taux de minéralisation de 32% pour l'ozonation et de 39% pour  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  après un traitement de 90 minutes. Les mécanismes réactionnels conduisent à des intermédiaires hydroxylés (par exemple le 2-[(2,6-dichlorophényl)-amino]-5-hydroxyphénylacétique). Andreozzi et al. (2004) ont également traité avec succès un mélange de produits pharmaceutiques contenant 2,8 mg/L de DCF et cinq autres principes actifs par ozonation et  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ . Zwiener et Frimmel (2000) ont noté un effet positif de l'ajout de peroxyde d'hydrogène lors de la dégradation du DCF par l'ozone. Un mécanisme de dégradation a été proposé à partir d'une étude sur une solution à 14,8 mg/L de DCF à pH 7 dans laquelle 30 % du carbone organique total a été éliminé après 1,5 heure d'ozonation (Vogna et al., 2004) ; il est présenté sur la Figure 1:14.

L'oxydation catalytique des composés organiques dans l'eau dépend fortement de la température. L'étude menée à l'échelle du laboratoire a été effectuée entre 40 et 60°C dans un système discontinu. Le taux de conversion du DCF a été doublé lorsque la température a été augmentée de 40 à 60°C (Hofmann et al., 2007).



**Figure 1:14.** Mécanisme de dégradation du DCF par ozonation et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV proposé par Vogna et al. (2004).

L'efficacité de la photolyse directe est fortement améliorée lorsque l'irradiation se fait en présence du peroxyde d'hydrogène qui facilite les processus de dégradation. Le rôle bénéfique de peroxyde d'hydrogène dans la photolyse a été démontré dans de nombreux travaux (voir par exemple, Andreozzi et al., 2003 ; Arslan-Alaton et Dogruel, 2004). Ces références démontrent que le DCF a été dégradé à plus de 45% par photolyse directe en utilisant une lampe à mercure émettant de la lumière UV à 254 nm avec une intensité de  $2,7 \times 10^{-6}$  Einstein.s<sup>-1</sup> pendant 1,5 heure, mais aussi que la dégradation du DCF a atteint 90% avec l'addition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De même, la photocatalyse hétérogène utilisant le dioxyde de titane TiO<sub>2</sub> comme catalyseur a également été étudiée pour la dégradation du DCF : une conversion complète de 43 mg/L de diclofénac a été atteinte avec 0,2 g/L de TiO<sub>2</sub> en 200 minutes. Dans une étude de photominéralisation du DCF catalysée par TiO<sub>2</sub> libre ou supporté par une matrice de silice sous rayonnement UV qui permet une élimination quasi-totale du DCF (di Credico et al., 2015), les résultats ont montré que le mécanisme de dégradation débute par la perte rapide d'un atome de chlore (en 1 heure), suivie par une cyclisation intramoléculaire, ce qui diffère du mécanisme de la Figure 1:14.

La limitation de la réaction de Fenton est qu'elle se produit à des pH bas, souvent inférieurs à 3. Un inconvénient supplémentaire des procédés Fenton dédiés à la dégradation du DCF résulte de la précipitation de ce médicament à pH acide. Ainsi, Packer et al. (2003) ont observé qu'il n'y a pas de transformation du DCF lors d'un traitement Fenton à pH 3,5 à une température de 22°C. La dégradation du DCF donne des sous-produits qui ont été identifiés par chromatographie GC-MS : le 1-

(2,6-dichlorophényl)-indoline-2-one et de l'aldéhyde 8-chloro-9H-carbazole-1-acétique. Toutefois, Ravina et al. (2002) ont étudié l'oxydation du DCF par photo-Fenton au moyen d'un photo-réacteur éclairé à 400 W avec une lampe à vapeur de mercure à une longueur d'onde de 254 nm. La majorité du carbone organique initial (plus de 90%) a pu être éliminée de la solution de diclofénac avec des concentrations allant de 10 à 80 mg/L en une heure par un traitement photo-Fenton avec 14 mg/L de  $\text{Fe}^{2+}$  et 340 mg/L d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à pH 2,8 et à une température de 50°C. Il y n'a pas des données sur la solubilité du DCF dans cette étude et il est possible que la solubilité du médicament augmente à haute température à ce pH. Le pH optimal recommandé par Perez-Estrada et al. (2005) pour l'élimination du DCF par le procédé photo-Fenton se situe entre 4,5 et 5. Un grand nombre d'intermédiaires de dégradation a été identifié dans le mécanisme induit par le procédé photo-Fenton. L'hydroxylation et la formation ultérieure de quinone-imine sont les voies de dégradation principales. Ces intermédiaires de quinone-imine sont susceptibles de se décomposer en dérivés d'hydroquinone et de l'aniline qui ont également été observés dans les procédés d'ozonation et d'oxydation par  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ .

Enfin, la sonolyse du DCF dans l'eau a été étudiée par Hartmann et al. (2007) à des fréquences d'ultrasons de 24 kHz, 216 kHz, 617 kHz et 850 kHz, en présence de divers catalyseurs ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SnO}_2$ ). La dégradation du DCF par sonolyse dans une solution aqueuse à 617 kHz suit une cinétique de premier ordre, avec un temps de demi-réaction de 13,9 minutes. Les catalyseurs, en particulier  $\text{TiO}_2$ , ont augmenté le rendement de la dégradation. Après 30 minutes d'irradiation, 84% du DCF a été éliminé pour une concentration initiale de 50 mg/L. De même, un traitement électrochimique a été étudié par Ji et al. (2017) à partir de plusieurs matériaux d'électrodes. Ces auteurs ont montré que l'oxydation du diclofénac est favorisée par les ions hydroxyle générés par l'oxydation de l'eau à la surface de l'anode. L'efficacité de dégradation augmente avec la densité de courant et la température, mais décroît lorsque la concentration en diclofénac ou le pH de l'eau augmentent. En conditions optimales, la limitation diffusionnelle à la surface des électrodes prévaut, de sorte que la cinétique d'élimination correspond à un pseudo-premier ordre.

En fin de compte, il apparaît que les procédés d'oxydation avancée sont sans conteste les plus efficaces pour abattre les micropolluants pharmaceutiques dans les eaux usées. Ils présentent cependant deux inconvénients majeurs :

- Leur coût économique, mais aussi énergétique, ainsi que leur empreinte environnementale sont défavorables.
- Ils sont susceptibles, comme tous les procédés d'oxydation (chloration...) de former des sous-produits parfois aussi ou plus toxiques que les molécules à traiter.

En conclusion, des alternatives compatibles avec les concepts du développement durable telles que la phycoremédiation peuvent être envisagées.

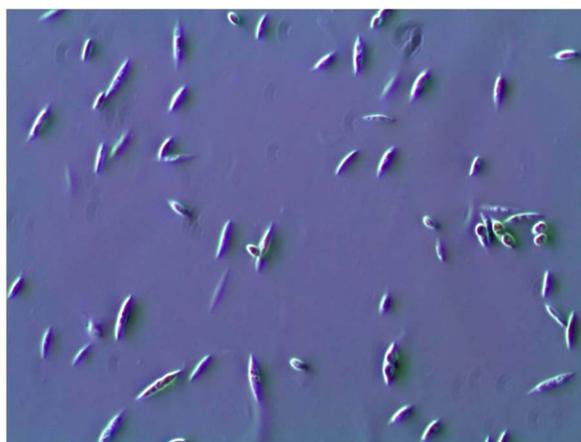
### 1.5.3 Phycoremédiation

#### 1.5.3.1 Définition

La *phycoremediation* est un procédé de bioremédiation qui consiste à utiliser une macro- ou une microalgue pour l'élimination ou la biotransformation d'un polluant des eaux usées, souvent en les couplant à la consommation de CO<sub>2</sub> de l'air, voire à la production d'énergie. Une revue sur le sujet est fournie par Rawat et al. (2011). La phycoremediation se pose comme une alternative écologique et durable aux procédés d'oxydation avancée et, dans une moindre mesure, au procédé à boues activées car elle peut être utilisée comme traitement complémentaire à ce dernier.

#### 1.5.3.2 Traitement par *Ankistrodesmus braunii*

*Ankistrodesmus braunii* est une algue verte unicellulaire de l'ordre des *Sphaeropleales* et de la classe des *Chlorophyceae*. Les cellules sont solitaires ou vaguement regroupées en paquets ou en touffes. Les cultures pures d'*Ankistrodesmus braunii* (Figure 1:15) ont montré des fluctuations continues de formes. Elles sont en forme d'aiguilles, de croissants, ou coniques étroites vers l'extrémité, parfois droites, souvent incurvées.



**Figure 1:15.** Micrographes de cellules d'*Ankistrodesmus braunii*.

Les algues vertes sont connues pour dégrader les phénols dans les eaux usées des usines de production d'huile d'olive (taux d'élimination supérieur à 70%). Ainsi, ces algues sont capables de transformer des phénols, en particulier l'acide sinapique, un composé phénolique modèle. En fait, deux souches de microalgues vertes ont été identifiées comme capables de biotransformer l'acide sinapique, à savoir *Stichococcus bacillaris* 155LTAP et *Ankistrodesmus braunii* C202.7a cultivées dans le milieu Bold's Basal. Lorsque l'acide sinapique est incubé dans une culture de l'algue *Ankistrodesmus braunii*, il est converti en 3,6-dihydroxy-2,4-diméthoxy-7H-benzocycloheptène-7-one, un composé formé par bioconversion de l'acide thomasidique (le produit d'oxydation primaire de l'acide sinapique). Les meilleures conditions de bioconversion ont été obtenues pour des cultures avec environ  $4 \times 10^6$  cellules/mL et une teneur en acide sinapique de 160 mg/L pendant 7 jours avec une photopériode de 16 heures de lumière assurée par une lampe fluorescente et de 8 heures d'obscurité par jour (Della Greca et al., 2003).

La capacité de biotransformation de 11 souches de microalgues a été testée sur l'éthinylestradiol (EE), l'œstrogène actif le plus utilisé dans le monde qui est également un micropolluant connu. Sept souches étaient inefficaces, tandis que *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus vacuolatus* et *Ankistrodesmus braunii* ont montré une capacité à biotransformer le substrat. EE a été converti par *S. capricornutum* en trois sous-produits (éthinylestradiol glucoside, 3-β-D-glucopyrannosyl-2-hydroxyéthinylestradiol et 3-β-D-glucopyrannosyl-6-β-oestradiol-hydroxyéthyle), respectivement avec 40 %, 5%, et 5 % de rendement. *S. quadricauda* a transformé l'EE en 17α-éthynyl-1,4-estradien-10,17β-diol-3-one (12%) et *A. braunii* a transformé l'EE en 6-α-hydroxy-éthinylestradiol (25 %). On retiendra également que l'EE est converti en éthinylestradiol glucoside avec un rendement de 92 % par *S. capricornutum* lorsque la densité des algues est optimale (Della Greca et al., 2008). Par ailleurs, Todd et al. (2002) ont démontré la biotransformation des polluants aromatiques plus complexes, comme le naphthalène et les éthers de diaryle, par des souches de *Chlorella*, *Ankistrodesmus* et *Scenedesmus*.

### 1.5.4 Conclusion

En résumé, la phycoremédiation constitue une alternative possible aux procédés d'oxydation avancée qui répond aux critères du développement durable tout en maintenant une bonne efficacité de traitement. Si l'étude de la capacité d'une microalgue, *A. braunii*, à éliminer le diclofénac est, en elle-même originale, notre intérêt pour cette algue est limité puisqu'il s'agira essentiellement dans nos travaux, d'utiliser les déchets de caroube comme substrat pour la croissance et la mise en œuvre d'*A. braunii*, ce qui n'a jamais été rapporté dans la littérature.

## 1.6 Conclusion générale

Dans ce chapitre, nous avons présenté le caroubier et son fruit, la caroube. Nous avons également présenté très succinctement le déchet solide de caroube issu de la préparation de la mélasse de caroube libanaise. Enfin, nous avons défini quatre voies de valorisation de ce déchet qui font appel à des bioprocédés :

- le bioéthanol et le biohydrogène dans le but d'une *valorisation énergétique* du déchet ;
- l'acide lactique pour une *valorisation matière* sous forme d'une molécule à haute valeur ajoutée ;
- la phycoremédiation avec une utilisation du déchet en qualité de source de carbone dans le traitement biologique des eaux.

Comme mentionné précédemment, aucune étude sur ce déchet n'a pu être trouvée dans la littérature. En ce qui concerne la caroube, seule la production de bioéthanol a été étudiée en détail, alors que les travaux sur l'acide lactique et le biohydrogène sont anecdotiques, et qu'aucun n'a pu être trouvé dans le domaine de la phycoremédiation. A partir de cette base, nous allons décrire dans le chapitre suivant les méthodes qui ont été mises au point afin de suivre les quatre pistes de valorisation que nous venons d'établir, en débutant par une description détaillée de la préparation industrielle du déchet.

### 1.7 Références

- Aafi, A. (1996). Note technique sur la caroubier (*Ceratonia siliqua L.*). *Centre Nationale de la Recherche Forestière. Rabat (Maroc). 10 p.*
- Abdel-Rahman, M. A., & Sonomoto, K. (2016). Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. *Journal of Biotechnology, 236*, 176-192.
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *Journal of Biotechnology, 156*(4), 286-301.
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances, 31*(6), 877-902.
- Abi Azar, R. (2007). *Complexation des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier : propriétés technologiques des coagulums obtenus* (Thèse de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, France).
- Aguinaco, A., Beltrán, F. J., García-Araya, J. F., & Oropesa, A. (2012). Photocatalytic ozonation to remove the pharmaceutical diclofenac from water: influence of variables. *Chemical Engineering Journal, 189*, 275-282.
- Albanell, E., Caja, G., & Plaixats, J. (1991). Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles. *Options Méditerranéennes. Série A : Séminaires Méditerranéens (CIHEAM)*.
- Aldiguié, A. S. (2006). *Activité bio-catalytique en haute densité cellulaire de Saccharomyces cerevisiae pour l'intensification de la production de bio-éthanol* (Thèse de l'INSA Toulouse, INSA Toulouse, France).
- Aldiguié, A. S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribelarrea, J. L., Guillouet, S. E., & Molina-Jouve, C. (2004). Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and biosystems engineering, 26*(4), 217-222.
- Alonso, S., Herrero, M., Rendueles, M., & Díaz, M. (2014). Physiological heterogeneity in *Lactobacillus casei* fermentations on residual yoghurt whey. *Process Biochemistry, 49*(5), 732-739.
- Al-Rajab, A. J., Sabourin, L., Lapen, D. R., & Topp, E. (2010). The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac is readily biodegradable in agricultural soils. *Science of the Total Environment, 409*(1), 78-82.

## Etude bibliographique

---

- Andreozzi, R., Campanella, L., Frayssé, B., Garric, J., Gonnella, A., Giudice, R. L., Marotta, R., Pinto, G., & Pollio, A. (2004). Effects of advanced oxidation processes (AOPs) on the toxicity of a mixture of pharmaceuticals. *Water Science and Technology*, 50(5), 23-28.
- Andreozzi, R., Caprio, V., Marotta, R., & Vogna, D. (2003). Paracetamol oxidation from aqueous solutions by means of ozonation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV system. *Water Research*, 37(5), 993-1004.
- Antunes, M., Esteves, V. I., Guégan, R., Crespo, J. S., Fernandes, A. N., & Giovanela, M. (2012). Removal of diclofenac sodium from aqueous solution by Isabel grape bagasse. *Chemical Engineering Journal*, 192, 114-121.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., & Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10), 1319-1330.
- Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I. K., & Oztekin, R. (2008). Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(7), 1813-1819.
- Arslan-Alaton, I., & Dogruel, S. (2004). Pre-treatment of penicillin formulation effluent by advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 112(1), 105-113.
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., & Monzani, A. (1997). Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2), 166-172.
- Ayaz, F. A., Torun, H., Glew, R. H., Bak, Z. D., Chuang, L. T., Presley, J. M., & Andrews, R. (2009). Nutrient content of carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) flour prepared commercially and domestically. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 286-292.
- Baccar, R., Sarrà, M., Bouzid, J., Fekic, M., & Blánquez, P. (2012). Removal of pharmaceutical compounds by activated carbon prepared from agricultural by-product. *Chemical Engineering Journal*, 211-212, 310-317.
- Bai, D. M., Wei, Q., Yan, Z. H., Zhao, X. M., Li, X. G., & Xu, S. M. (2003). Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid. *Biotechnology Letters*, 25(21), 1833-1835.
- Bai, D. M., Zhao, X. M., Li, X. G., & Xu, S. M. (2004). Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L (+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. *Biochemical Engineering Journal*, 18(1), 41-48.
- Bailly, M. (2002). Production of organic acids by bipolar electro dialysis: realizations and perspectives. *Desalination*, 144(1-3), 157-162.

- Balat, M., Balat, H., & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551-573.
- Barford, J. P., & Hall, R. J. (1981). A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a saturated respiratory capacity. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1735-62.
- Bartels, P., & von Tümpling, W. (2007). Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters. *Science of the Total Environment*, 374(1), 143-155.
- Batlle, I., & Tous, J. (1997). Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. IPGRI, Rome, Italy ([https://www.biodiversityinternational.org/uploads/tx\\_news/Carob\\_tree\\_Ceratonia\\_siliqua\\_L.\\_347.pdf](https://www.biodiversityinternational.org/uploads/tx_news/Carob_tree_Ceratonia_siliqua_L._347.pdf)).
- Bengoechea, C., Romero, A., Villanueva, A., Moreno, G., Alaiz, M., Millán, F., Guerrero, A., & Puppo, M. C. (2008). Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins. *Food chemistry*, 107(2), 675-683.
- Bhaskar, T., Balagurumurthy, B., Singh, R., & Poddar, M.K. (2013). Thermochemical Route for Biohydrogen Production. In *Biohydrogen* (1<sup>st</sup> Edition) (Chapter 12). Editeurs: Pandey, Chang, Hallenbeck, Larroche. Elsevier. Burlington, USA.
- Biner, B., Gubbuk, H., Karhan, M., Aksu, M., & Pekmezci, M. (2007). Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, 100(4), 1453-1455.
- Bolonos, M. (1955). Rapport sur le caroubier. *Instituto forestal de Investigaciones y experiencias Madrid (Espagne)*, 9p.
- Boniardi, N., Rota, R., Nano, G., & Mazza, B. (1997). Lactic acid production by electro dialysis part I: experimental tests. *Journal of Applied Electrochemistry*, 27(2), 125-133.
- Bonnin, C. (2006). *Etude cinétique de la chloration de quelques micropolluants aqueux : le diclofénac, l'acide salicylique et l'acide clofibrique* (Thèse de l'Université de Poitiers, Poitiers, France).
- Bouhadi, D., Hariri, A., Benattouche, Z., Sahnouni, F., & Ould Yerou (2017). Kinetic of batch production of lactic acid from carob pods syrup. *Banat's Journal of Biotechnology*, VIII(15), 5-65.
- Bulut, S., Elibol, M., & Ozer, D. (2004). Effect of different carbon sources on L (+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 21(1), 33-37.
- Buser, H. R., Poiger, T., & Müller, M. D. (1998). Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science & Technology*, 32(22), 3449-3456.
- Calabia, B. P., Tokiwa, Y., & Aiba, S. (2011). Fermentative production of L-(+)-lactic acid by an alkaliphilic marine microorganism. *Biotechnology letters*, 33(7), 1429-1433.

- Calixto, F. S., & Cañellas, J. (1982). Components of nutritional interest in carob pods (*Ceratonia siliqua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(12), 1319-1323.
- Chang, C. Y., Chang, J. S., Vigneswaran, S., & Kandasamy, J. (2008). Pharmaceutical wastewater treatment by membrane bioreactor process—a case study in southern Taiwan. *Desalination*, 234(1), 393-401.
- Chen, C. C., Chuang, Y. S., Lin, C. Y., Lay, C. H., & Sen, B. (2012). Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15540-15546.
- Cheng, J. J., & Timilsina, G. R. (2011). Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renewable Energy*, 36(12), 3541-3549.
- Cherik, D., Benali, M., & Louhab, K. (2015). Occurrence, ecotoxicology, removal of diclofenac by adsorption on activated carbon and biodegradation and its effect on bacterial community: A review. *World Scientific News*, (10), 116-144.
- Chu, C. F., Li, Y. Y., Xu, K. Q., Ebie, Y., Inamori, Y., & Kong, H. N. (2008). A pH-and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(18), 4739-4746.
- Coit, J. E. (1967). Carob varieties for the semi-arid southwest. *Fruit Varieties and Horticultural Digest*, 21, 5-9.
- Converti, A., Bargagliotti, C., Cavanna, C., Nicolella, C., & Del Borghi, M. (1996). Evaluation of kinetic parameters and thermodynamic quantities of starch hydrolysate alcohol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Engineering*, 15(2), 63-69.
- Cournac, L., Pruvost, J., & Legrand J. (2012). Production d'hydrogène par les micro-organismes photosynthétiques, Techniques de l'Ingénieur, BIO3352 v1, Lavoisier, France.
- Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal*, 23, 536-45.
- Cui, F., Li, Y., & Wan, C. (2011). Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1831-1836.
- Custódio, L., Escapa, A. L., Fernandes, E., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., Neng, N., Nogueira, M., & Romano, A. (2011). Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic activities of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) germ flour extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(1), 78-84.
- Dabrock, B., Bahl, H., & Gottschalk, G. (1992). Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4), 1233-1239.

- Das, D., & Veziroglu, T. N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046-6057.
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: A regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*, 44, 149-156.
- Della Greca, M., Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., & Temussi, F. (2003). Biotransformation of sinapic acid by the green algae *Stichococcus bacillaris* 155LTAP and *Ankistrodesmus braunii* C202. 7a. *Tetrahedron Letters*, 44(14), 2779-2780.
- Della Greca, M., Pinto, G., Pistillo, P., Pollio, A., Previtiera, L., & Temussi, F. (2008). Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae. *Chemosphere*, 70(11), 2047-2053.
- Dias P. M. F. (2015). *Hydrogen production by Clostridium butyricum: improving production yields and assessing changes in the cell lipid profile during adaptation to furans and gallic acid*. Master of Science Thesis, Técnico Lisboa, Lisbonne, Portugal ([https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/download-File/563345090414670/Thesis\\_MscBiotechnology\\_PedroDias\\_IST\\_79322.pdf](https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/download-File/563345090414670/Thesis_MscBiotechnology_PedroDias_IST_79322.pdf)).
- Di Credico, B., Bellobono, R., d'Arienzo, M., Fumagalli, D., Redaelli, M., Scotti, R., & Morazzoni, F. (2015). Efficacy of the reactive oxygen species generated by immobilized TiO<sub>2</sub> in the photocatalytic degradation of diclofenac. *International Journal of Photoenergy*, 2015, ID 919217, 13 p.
- Djidel, A. (2007). *Production d'acide lactique par Lactobacillus casei subsp. rhamnosus sur jus de datte : cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues*, Thèse de l'INPL, Nancy, France.
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., & Yu, Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 812-820.
- Duchiron, F., & Copinet, E. (2011). Fermentation en milieu solide (FMS) *Techniques de l'Ingénieur*, BIO620 V1, Lavoisier.
- Ercan, Y., Irfan, T., & Mustafa, K. (2012). Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresource Technology*, 135, 365-371.
- Fan, H., Li, J., Zhang, L., & Feng, L. (2014). Contribution of sludge adsorption and biodegradation to the removal of five pharmaceuticals in a submerged membrane bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 88, 101-107.
- Fargione, J., Hill, J., Tilman, D., Polasky, S., & Hawthorne, P. (2008). Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science*, 319(5867), 1235-1238.

- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122-159.
- Fountoulakis M., S., Dokianakis, S. N., Daskalakis, G., & Manios, T. (2014). Fermentative hydrogen production from carob pod: A typical Mediterranean forest fruit. *Waste and Biomass Valorization*, 5, 799-805.
- Gao, C., Ma, C., & Xu, P. (2011). Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*, 29(6), 930-939.
- Geddes, C. C., Nieves, I. U., & Ingram, L. O. (2011). Advances in ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 312-319.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73-95.
- Gnansounou, E. (2001). Les filières de production de bioéthanol (<https://lasen.epfl.ch/webdav/site/lasen/shared/bioethanol.pdf>).
- Grasmick, A., Cabassud, C., Sperandio, M., & Wisniewski, C. (2007). Bioréacteurs à membranes et traitement des eaux usées. Techniques de l'Ingénieur, W4140 v1, Lavoisier, France.
- Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., & Barceló, D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment international*, 36(1), 15-26.
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E. Carrère, H., & Steyer, J.-P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10660-10673.
- Haankuku, C., Eppin, F. M., & Kakani, V. G. (2015). Industrial sugar beets to biofuel: Field to fuel production system and cost estimates. *Biomass and Bioenergy*, 80, 267-277.
- Haddarah, A. (2013). *L'influence des cultivars sur les propriétés fonctionnelles de la caroube Libanaise* (Thèse de l'Université de Lorraine, Nancy, France).
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27(5), 287-297.
- Hariri, A., Ouis, N., Sahnouni, F., & Bouhadi, D. (2009). Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*, 37-55.

## Etude bibliographique

---

- Hartmann, J., Bartels, P., Mau, U., Witter, M., Tümping, W. V., Hofmann, J., & Nietzschmann, E. (2007). Degradation of the drug diclofenac in water by sonolysis in presence of catalysts. *Chemosphere*, 70(3), 453-461.
- Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2), 172-184.
- Heberer, T. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266(3), 175-189.
- Hillcoat, D., Lewis, G., & Verdcourt, B. (1980). A new species of *Ceratonia* (*Leguminosae-Caesalpinioideae*) from Arabia and the Somali Republic. *Kew Bulletin*, 35(2), 261-271.
- Hofmann, J., Freier, U., Wecks, M., & Hohmann, S. (2007). Degradation of diclofenac in water by heterogeneous catalytic oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Applied Catalysis B: Environmental*, 70(1-4), 447-451.
- Hölker, U., Höfer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 175-186.
- Hong, C., & Haiyun, W. (2010). Optimization of volatile fatty acid production with co-substrate of food wastes and dewatered excess sludge using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 101(14), 5487-5493.
- Huber, M. M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., McArdeell, C. S., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T. A., & von Gunten, U. (2005). Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study. *Environmental Science & Technology*, 39(11), 4290-4299.
- Irmak, S., Erbatur, O., & Akgerman, A. (2005). Degradation of 17 $\beta$ -estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 126(1), 54-62.
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 756-769.
- Ji, Z., Liu, T., & Tian, H. (2017). Electrochemical degradation of diclofenac for pharmaceutical wastewater treatment. *International Journal of Electrochemical Science*, 12, 7807-7816.
- Jones, R. P., Pamment, N., & Greenfield, P. F. (1981). Alcohol fermentation by yeasts--the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry*, 16, 42-9.
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, 103-112.

- Kadam, S. R., Patil, S. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., & Gokhale, D. V. (2006). Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*, 41(1), 120-126.
- Kallio, J. M., Lahti, M., Oikari, A., & Kronberg, L. (2010). Metabolites of the aquatic pollutant diclofenac in fish bile. *Environmental Science & Technology*, 44(19), 7213-7219.
- Khanal, S. K., Chen, W. H., Li, L., & Sung, S. (2004). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(11), 1123-1131.
- Kim, J. K., Nhat, L., Chun, Y. N., & Kim, S. W. (2008). Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(4), 499-504.
- Kimura, K., Hara, H., & Watanabe, Y. (2007). Elimination of selected acidic pharmaceuticals from municipal wastewater by an activated sludge system and membrane bioreactors. *Environmental Science & Technology*, 41(10), 3708-3714.
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., & Kassinos, D. (2008). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*, 35(2), 402-417.
- Konate, I. (2007). *Diversité phénotypique et moléculaire du caroubier (Ceratonia siliqua L.) et des bactéries endophytes qui lui sont associées* (Thèse de l'Université Mohammed V, Rabat, Maroc).
- Kosjek, T., Heath, E., Pérez, S., Petrović, M., & Barceló, D. (2009). Metabolism studies of diclofenac and clofibric acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Hydrology*, 372(1), 109-117.
- Kotay, S. M., & Das, D. (2008). Biohydrogen as a renewable energy resource prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(1), 258-263.
- Kovacs, K. L., Kovacs, A. T., Maróti, G., Bagi, Z., Csanádi, G., Perei, K., Bálint, B., Balogh, J., Fülöp, A., Mészáros L. S., Tóth, A., Dávid, R., Latinovics, D. Varga, A., & Rákhely, G. (2004). Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3(4), 321-330.
- Kovala-Demertzi, D. (2000). Transition metal complexes of diclofenac with potentially interesting anti-inflammatory activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 79(1), 153-157.
- Kumar, A., & Sarkar, S. (2011). *Biohydrogen production from bio-oil*. In *Biofuels* (1<sup>st</sup> Edition): Alternative Feedstocks and Conversion Processes (Chapter 21). Editeurs: Pandey, Larroche, Ricke, Dussap & Gnansounou. Academic Press, Elsevier. Oxford, UK.

- Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M. S., & Nakayama, T. (2002). Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 373-377.
- Kuo, Y. C., Yuan, S. F., Wang, C. A., Huang, Y. J., Guo, G. L., & Hwang, W. S. (2015). Production of optically pure L-lactic acid from lignocellulosic hydrolysate by using a newly isolated and D-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus paracasei* strain. *Bioresource Technology*, 198, 651-657.
- Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A. J., Hawkes, F. R., Premier, G. C., & Hawkes, D. L. (2007). Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(4), 759-770.
- Kylä-Nikkilä, K., Hujanen, M., Leisola, M., & Palva, A. (2000). Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNR32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3835-3841.
- Latrille, E., Trably, E., & Larroche, Ch. (2011). Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre, Techniques de l'Ingénieur, BIO3351 v1, Lavoisier, France.
- Lay, J. J., Lee, Y. J., & Noike, T. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research*, 33(11), 2579-2586.
- Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., & Taherzadeh, M. J. (2014). Integration of the first and second-generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource Technology*, 165, 3-8.
- Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1993). *Industrial microbiology : microorganisms for agro-industries*. Technique et Documentation. Lavoisier.
- Li, C., & Fang, H. H. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(1), 1-39.
- Limtong, S., Sringiew, C., & Yongmanitchai, W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, 98(17), 3367-3374.
- Lin W.-W., Yu H.Q. (2011). Biohydrogen production with high-rate bioreactor. In *Biofuels* (1<sup>st</sup> Edition): Alternative Feedstocks and Conversion Processes (Chapter 24). Editeurs: Pandey, Larroche, Ricke, Dussap & Gnansounou. Academic Press, Elsevier. Oxford, UK.
- Lin Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*, BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47 (2012) 395-401.

- Liu, G., & Shen, J. (2004). Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(4), 251-256.
- Lizardo, R., Cañellas, J., Mas, F., Torrallardona, D., & Brufau, J. (2002). L'utilisation de la farine de caroube dans les aliments de sevrage et son influence sur les performances et la santé des porcelets. *Journées de la Recherche Porcine*, 34, 97-101 (<http://www.journees-recherche-porcine.com/texte/2002/02txtAlim/a0206.pdf>).
- Lonappan, L., Brar, S. K., Das, R. K., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity-A review. *Environment International*, 96, 127-138.
- Loubière, P., Coccagn-Bousquet, M., Matos, J., Goma, G., & Lindley, N. D. (1997). Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 82(1), 95-100.
- Macherius, A., Lapen, D. R., Reemtsma, T., Römbke, J., Topp, E., & Coors, A. (2014). Triclocarban, triclosan and its transformation product methyl triclosan in native earthworm species four years after a commercial-scale biosolids application. *Science of the Total Environment*, 472, 235-238.
- Madhavan, A., Srivastava, A., Kondo, A., & Bisaria, V. S. (2012). Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(1), 22-48.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G., & Vicent, T. (2009). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1), 836-842.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 70-83.
- Martínez, E. A., Silva, S. S., e Silva, J. B. A., Solenzal, A. I., & Felipe, M. G. (2003). The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. *Process Biochemistry*, 38(12), 1677-1683.
- Mazaheri, D., Shojaosadati, S. A., Mousavi, S. M., Hejazi, P., & Saharkhiz, S. (2012). Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Applied energy*, 99, 372-378.
- Meng, Y., Xue, Y., Yu, B., Gao, C., & Ma, Y. (2012). Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus* sp. WL-S20. *Bioresource Technology*, 116, 334-339.

## Etude bibliographique

---

- Miyamoto, G., Zahid, N., & Uetrecht, J. P. (1997). Oxidation of diclofenac to reactive intermediates by neutrophils, myeloperoxidase, and hypochlorous acid. *Chemical Research in Toxicology*, 10(4), 414-419.
- Mohanty, S. K., Behera, S., Swain, M. R., & Ray, R. C. (2008). Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. *Applied Energy*, 86(5), 640-644.
- Moldes, A. B., Alonso, J. L., & Parajo, J. C. (2001). Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(3), 279-284.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F., & Boudrant, J. (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rahanosus*. *Bioresource Technology*, 78(2), 149-153.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., & Srivastava, A. (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(2), 167-178.
- Ndir, B., Lognay, G., Wathélet, B., Cornelius, C., Marlier, M., & Thonart, P. (2000). Composition chimique du n t tu, condiment alimentaire produit par fermentation des graines du caroubier africain *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 4(2), 101-105.
- Nguyen, L. N., Hai, F. I., Yang, S., Kang, J., Leusch, F. D., Roddick, F., Price, W. E., & Nghiem, L. D. (2013). Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *BioresourceTechnology*, 148, 234-241.
- Nguyen, C. M., Kim, J. S., Hwang, H. J., Park, M. S., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., & Kim, J. C. (2012). Production of L-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli. *Bioresource Technology*, 110, 552-559.
- Nigatu, A. (2000). Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rahanosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 969-978.
- Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. A., ... & Mahmood, S. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427(6975), 630-633.
- Ofuya, C. O., & Obilor, S. N. (1994). The effects of solid-state fermentation on the toxic components of cassava peel. *Process Biochemistry*, 29(1), 25-28.

## Etude bibliographique

---

- Oh, Y. K., Kim, S. H., Kim, M. S., & Park, S. (2004). Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(6), 690-698.
- Okano, K., Zhang, Q., Yoshida, S., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2010). D-lactic acid production from cellooligosaccharides and  $\beta$ -glucan using L-LDH gene-deficient and endoglucanase-secreting *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 643-650.
- Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, 41(12), 1727-1738.
- Packer, J. L., Werner, J. J., Latch, D. E., McNeill, K., & Arnold, W. A. (2003). Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibrac acid, and ibuprofen. *Aquatic Sciences*, 65(4), 342-351.
- Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process biochemistry*, 35(10), 1153-1169.
- Pandey, A., Soccol, C. R., & Larroche, C. (2008). Current developments in solid-state fermentation, Springer, Asiatech Publishers.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food chemistry*, 105(1), 1-14.
- Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H. R., Mellenthin, A., Haber, B., & Galensa, R. (2004). Identification and quantification of polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3784-3791.
- Passos de Carvalho, J. (1988). Carob pollination aspects. In *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain (pp. 281-291).
- Pérez-Estrada, L. A., Malato, S., Gernjak, W., Agüera, A., Thurman, E. M., Ferrer, I., & Fernández-Alba, A. R. (2005). Photo-Fenton degradation of diclofenac: identification of main intermediates and degradation pathway. *Environmental Science & Technology*, 39(21), 8300-8306.
- Pérez-Estrada, L. A., Maldonado, M. I., Gernjak, W., Agüera, A., Fernández-Alba, A. R., Ballesteros, M. M., & Malato, S. (2005). Decomposition of diclofenac by solar driven photocatalysis at pilot plant scale. *Catalysis Today*, 101(3), 219-226.
- Petit, D., & Pinilla, J. M. (1995). Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 145-152.
- Petrie, B., McAdam, E. J., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N., & Cartmell, E. (2013). Fate of drugs during wastewater treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 49, 145-159.

- Poiger, T., Buser, H. R., & Müller, M. D. (2001). Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2), 256-263.
- Poilpré, E. (2002). *Mécanisme d'adaptation rapide de Saccharomyces cerevisiae en métabolisme oxydatif : implication des sucres de réserve et de la capacité respiratoire* (Thèse de doctorat de l'INSA Toulouse, Toulouse, France).
- Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C., & Calamari, D. (2006). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. *Environmental Science & Technology*, 40(7), 2442-2447.
- Quintana, J. B., Weiss, S., & Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*, 39(12), 2654-2664.
- Radjenović, J., Petrović, M., & Barceló, D. (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water research*, 43(3), 831-841.
- Randhawa, M. A., Ahmed, A. N. W. A. A. R., & Akram, K. A. S. H. I. F. (2012). Optimization of lactic acid production from cheap raw material: sugarcane molasses. *Pakistan. Journal of Botany*, 44(1), 333-338.
- Ravina, M., Campanella, L., & Kiwi, J. (2002). Accelerated mineralization of the drug diclofenac via Fenton reactions in a concentric photo-reactor. *Water research*, 36(14), 3553-3560.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411-3424
- Reddy, L. V., Park, J. H., & Wee, Y. J. (2015). Homofermentative production of optically pure L-lactic acid from sucrose and mixed sugars by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(6), 1099-1105.
- Refat, M. S., Mohamed, G. G., Ibrahim, M. Y., Killa, H. M. A., & Fetooh, H. (2014). Synthesis and characterization of coordination behavior of diclofenac sodium drug toward Hg (II), Pb (II), and Sn (II) metal ions: Chelation effect on their thermal stability and biological activity. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 44(2), 161-170.
- Rejeb, M. N. (1995). Le caroubier en Tunisie : Situations et perspectives d'amélioration (pp. 79-85). *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?*, Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales de l'UREF (Namur, Belgique). John Libbey Eurotext, Paris.
- Rifkin, J. (2002). *L'économie hydrogène*. Traduit par N. Guilhot, La Découverte, France, 330 p.

## Etude bibliographique

---

- Rodarte-Morales, A. I., Feijoo, G., Moreira, M. T., & Lema, J. M. (2012). Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply. *Biodegradation*, 23(1), 145-156.
- Roukas, T. (1993). Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(3), 296-301.
- Sánchez, S., Lozano, L. J., Godínez, C., Juan, D., Pérez, A., & Hernández, F. J. (2010). Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas. *Applied Energy*, 87(11), 3417-3424.
- Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., & Quinn, B. (2011). Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, 62(7), 1389-1395.
- Schmitt-Jansen, M., Bartels, P., Adler, N., & Altenburger, R. (2007). Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1389-1396.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., & Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 141-150.
- Singh, L., & Wahid, Z. A. (2015). Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: a review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 70-80.
- Sirisansaneeyakul, S., Luangpipat, T., Vanichsiratana, W., Srinophakun, T., Chen, H. H. H., & Chisti, Y. (2007). Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(5), 381.
- Skoumal, M., Cabot, P. L., Centellas, F., Arias, C., Rodríguez, R. M., Garrido, J. A., & Brillas, E. (2006). Mineralization of paracetamol by ozonation catalyzed with Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and UV-A light. *Applied Catalysis B: Environmental*, 66(3), 228-240.
- Sonnleitner, B., & Käppeli, O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 927-937.
- Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., & Lema, J. M. (2008). How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7(2), 125-138.
- Talukder, M. M. R., Das, P., & Wu, J. C. (2012). Microalgae (*Nannochloropsis salina*) biomass to lactic acid and lipid. *Biochemical Engineering Journal*, 68, 109-113.

- Tanyıldızı, M. Ş., Bulut, Ş., Selen, V., & Özer, D. (2012). Optimization of lactic acid production with immobilized *Rhizopus oryzae*. *African Journal of Biotechnology*, 11(34), 8546-8552.
- Taskin, M., Esim, N., & Ortucu, S. (2012). Efficient production of L-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 773-779.
- Tawfik, A., & El-Qelish, M. (2012). Continuous hydrogen production from co-digestion of municipal food waste and kitchen wastewater in mesophilic anaerobic baffled reactor. *Bioresource Technology*, 114, 270-274.
- The Drugs Controller General (2006). *I. Diclofenac for veterinary use: regarding*. Services D.G.o.H. FNo18-03/2006-DC. New Delhi.
- Theodorou, A., Demertzis, M. A., Kovala-Demertzi, D., Lioliou, E. E., Pantazaki, A. A., & Kyriakidis, D. A. (1999). Copper (II) complexes of diclofenac: Spectroscopic studies and DNA strand breakage. *BioMetals*, 12(2), 167-172.
- Todd, S. J., Cain, R. B., & Schmidt, S. (2002). Biotransformation of naphthalene and diaryl ethers by green microalgae. *Biodegradation*, 13(4), 229-238.
- Torija, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2002). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80(1), 47-53.
- Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H. R., & Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 68(2), 151-166.
- Tucker, S. C. (1992). The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae). *American Journal of Botany*, 79(3), 318-327.
- Turhan, I., Bialka, K. L., Demirci, A., & Karhan, M. (2010a). Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 101(14), 5290-5296. *Food Biotechnology*, 24:364–374, 2010
- Turhan, I., Bialka, K. L., Demirci, A., & Karhan, M. (2010b). Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using invertase pretreatment. *Food Biotechnology*, 24, 364-374.
- Vaheed, H., Shojaosadati, S. A., & Galip, H. (2010). Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(1), 101-111.

- Valdez-Vazquez, I., & Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Alkalinity and high total solids affecting H<sub>2</sub> production from organic solid waste by anaerobic consortia. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(9), 3639-3646.
- Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F., & Poggi-Varaldo, H. M. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(13), 1383-1391.
- Van Ginkel, S., & Logan, B. E. (2005). Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environmental Science & Technology*, 39(23), 9351-9356.
- Vane, J. R., & Botting, R. M. (1998). Mechanism of action of anti-inflammatory drugs: an overview. In *Selective COX-2 Inhibitors* (chapter 1, pp. 1-17). Springer Netherlands.
- Venkata Mohan, S., Mohanakrishna, G., & Srikanth, S. (2011). Biohydrogen production from industrial effluents. In *Biofuels (1<sup>st</sup> Edition): Alternative Feedstocks and Conversion Processes* (Chapter 22). Editeurs: Pandey, Larroche, Ricke, Dussap & Gnansounou. Academic Press, Elsevier. Oxford, UK.
- Venkata Mohan, S., & Pandey, A. (2013). Biohydrogen Production: An Introduction. In *Biohydrogen (1<sup>st</sup> Edition)* (Chapter 1). Editeurs: Pandey, Chang, Hallenbeck, Larroche. Elsevier. Burlington, USA.
- Vijayakumar, J., Aravindan, R., & Viruthagiri, T. (2008). Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(2), 245-264.
- Vogna, D., Marotta, R., Napolitano, A., Andreozzi, R., & d'Ischia, M. (2004). Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozone. *Water Research*, 38(2), 414-422.
- Vona, A., di Martino, F., Garcia-Ivars, J., Picó, Y., Mendoza-Roca, J. A., & Iborra-Clar, M. I. (2015). Comparison of different removal techniques for selected pharmaceuticals. *Journal of Water Process Engineering*, 5, 48-57.
- Wang, Y., Liu, H., Liu, G., & Xie, Y. (2013). Oxidation of diclofenac by aqueous chlorine dioxide: identification of major disinfection byproducts and toxicity evaluation. *Science of The Total Environment*, 473, 437-445.
- Wang, J., & Wan, W. (2008). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12), 2934-2941.
- Wang L1, Zhao B, Liu B, Yu B, Ma C, Su F, Hua D, Li Q, Ma Y, & Xu P. (2010). Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing *Bacillus* sp. strain. *Bioresource Technology*, 101(20), 7908-7915.

- Wee, Y. J., Yun, J. S., Kim, D., & Ryu, H. W. (2006). Batch and repeated batch production of L (+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 431-435.
- Winter, J. (1988). *Fermentation alcoolique par Saccharomyces cerevisiae: contribution à l'étude du contrôle de la dynamique fermentaire par l'inhibition et les facteurs nutritionnels* (Thèse de doctorat de l'INSA Toulouse, Toulouse, France).
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Chang, Z., & Woolsey, J. (2006). DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl. 1), D668-D672.
- Yasin, N. H. M., Mumtaz, T., & Hassan, M. A. (2013). Food waste and food processing waste for biohydrogen production: a review. *Journal of Environmental Management*, 130, 375-385.
- Yu, J., & Tan, T. (2008). Ethanol production by solid state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast strain. *Fuel Processing Technology*, 89(11), 1056-1059.
- Zhang, Z. Y., Jin, B., & Kelly, J. M. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*. *Biochemical Engineering Journal*, 35(3), 251-263.
- Zhang, Y., Liu, G., & Shen, J. (2005). Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(8), 855-860.
- Zhou, X., Ye, L., & Wu, J. C. (2013). Efficient production of L-lactic acid by newly isolated thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4 with high glucose tolerance. *Applied microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4309-4314.
- Zhou, S., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2003). Functional replacement of the *Escherichia coli* D(-)-lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L(+)-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2237-2244.
- Zong, W., Yu, R., Zhang, P., Fan, M., & Zhou, Z. (2009). Efficient hydrogen gas production from cassava and food waste by a two-step process of dark fermentation and photo-fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 33(10), 1458-1463.
- Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., & Fanelli, R. (2000). Presence of therapeutic drugs in the environment. *The lancet*, 355(9217), 1789-1790.
- Zupanc, M., Kosjek, T., Petkovšek, M., Dular, M., Kompare, B., Širok, B., Blažeka, Ž., & Heath, E. (2013). Removal of pharmaceuticals from wastewater by biological processes, hydrodynamic cavitation and UV treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1104-1112.

## Etude bibliographique

---

Zwiener, C., & Frimmel, F. H. (2000). Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Research*, 34(6), 1881-1885.

Zwiener, C., & Frimmel, F. H. (2003). Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen, and diclofenac. *Science of The Total Environment*, 309(1-3), 201-211.

## Chapitre 2. Matériels et méthodes

Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord les modes de production de la mélasse de caroube, ainsi que du déchet solide qui en résulte et qui est au centre des travaux de cette thèse. Nous nous intéresserons ensuite aux différentes méthodes d'analyse de la caroube et du déchet qui ont été mises au point. Ensuite, nous résumerons les méthodes d'extraction des sucres qui ont été proposées et comparées dans nos travaux. Enfin, nous déclinons les méthodes développées pour la valorisation du déchet, avec ou sans extraction préalable, respectivement sous forme de bioéthanol, d'acide lactique, ou encore comme substrat dans une application de phycoremédiation et pour la production de biohydrogène par fermentation sombre.

### 2.1 Production du déchet de caroube

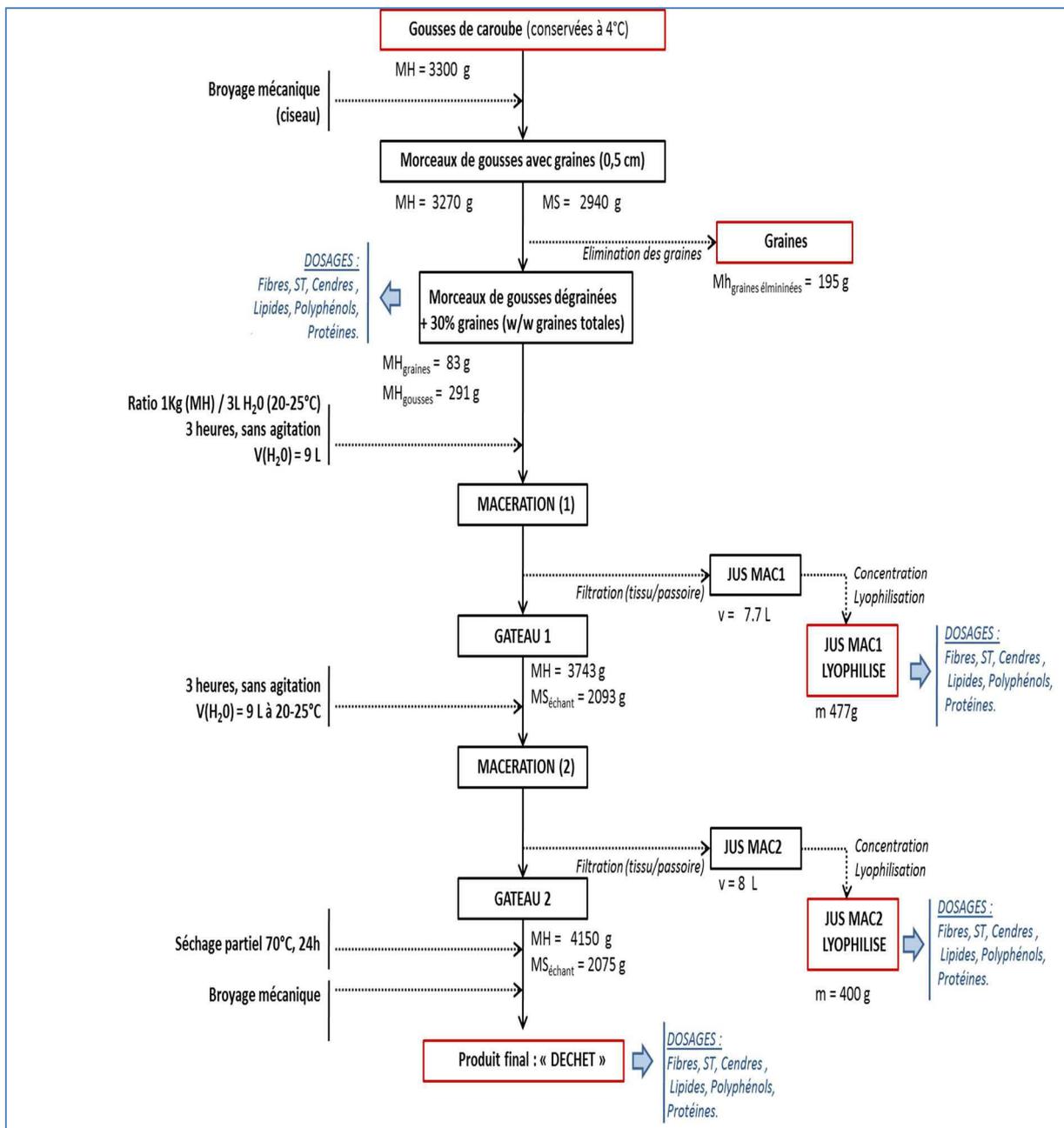
Le sous-produit de caroube que nous cherchons à valoriser, également appelé « déchet » dans ce travail, est issu de la production de mélasse, plus connue au Liban sous la dénomination de *Dibs*, un sirop sucré très populaire dans ce pays. En nous basant sur les informations de production de *Dibs* fournies par la société libanaise *Salloum Ekhwan*, nous allons tout d'abord résumer les différentes étapes conduisant à l'obtention de cette mélasse et du déchet correspondant. Le protocole général est décrit sur la Figure 2:1. Celle-ci montre que la préparation de la mélasse consiste, après avoir séparé mécaniquement les graines et broyé les gousses, en une double macération à température ambiante dans l'eau. A l'issue de chacune de ces macérations, le jus récupéré par filtration sert de matière première à la mélasse, tandis que la matière sèche du rétentat de filtration ou « gâteau » de la seconde macération constitue l'essentiel du déchet.

Afin de réaliser un bilan matière qui décrit la répartition de la masse totale (MH) et de la masse sèche (MS) lors des différentes opérations de séparation, nous avons reproduit le traitement industriel au sein du laboratoire jusqu'à l'obtention du déchet. En effet, ce type de bilan n'est pas disponible chez l'industriel. Au Liban, neuf variétés de caroubes sont présentes. Un mélange de ces différentes variétés a été utilisé pour la préparation du déchet type. La Figure 2:1 établit le bilan matière et indique également les fractions qui ont été dosées à partir des méthodes d'analyse de la composition qui seront décrites dans la section suivante.

Le protocole qui a été suivi peut être résumé comme suit. Les gousses de caroube ont été conservées à 4°C, avant d'être découpées en morceaux d'environ 0,5 cm et débarrassées partiellement de leurs graines, la teneur résiduelle en graines étant de l'ordre de 30% (p/p de graines totales). La macération conduisant à la production de mélasse a été réalisée en deux étapes parfaitement identiques. Le rapport massique d'extraction liquide/solide (noté L/S) est de 3, soit 1 kg de morceaux de

## Matériels et méthodes

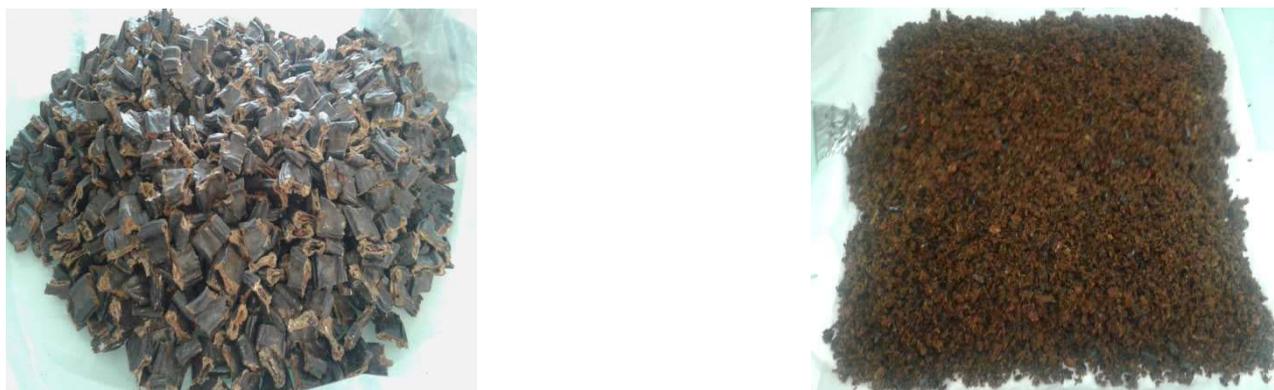
gousses de caroube dégrainées à 70% dans 3 litres d'eau. Pour respecter le protocole industriel, la température n'est pas régulée (comprise entre 20 et 25°C) et la durée de macération est de 3 heures sans agitation. Lors de chacune des deux étapes de macération, le jus de macération (MAC) est séparé de la matière solide (GATEAU) par filtration (tissu/passoire), puis concentré et lyophilisé. Selon le protocole industriel, les jus de macération MAC1 et MAC2 sont chauffés pour évaporer l'eau jusqu'à obtention de la mélasse. Le déchet que nous avons conservé est obtenu à partir du GATEAU 2 issu de la seconde étape de macération. Il est le produit que nous cherchons à valoriser. Il a été séché partiellement à l'étuve pendant 24 heures à 70°C, puis broyé.



**Figure 2:1.** Protocole de préparation du déchet de caroube (MH : masse totale ; MS : matière sèche).

Parmi les analyses effectuées afin de compléter le bilan matière de la Figure 2:1, on retiendra les dosages des sucres totaux (ST), cendres, lipides, polyphénols et protéines qui ont été effectués sur la poudre de caroube initiale, le déchet en poudre, ainsi que sur les jus MAC1 et MAC2.

Des photos représentant la caroube et le déchet sont présentées ci-dessous (Figure 2:2).



**Figure 2:2.** Photos de la caroube (à gauche) et du déchet (à droite).

## 2.2 Analyses chimiques de la caroube et du déchet

Les dosages décrits dans cette section nous ont permis de caractériser la composition des produits intermédiaires obtenus à chaque étape du protocole de production du déchet (Figure 2:1), mais ils seront également employés par la suite lors de l'étude de l'extraction des sucres contenus dans les déchets. Seront décrits successivement les dosages des polyphénols, des sucres réducteurs et totaux, des lipides, des fibres, de l'humidité résiduelle et des cendres. Lorsque cela a été nécessaire, un protocole d'extraction destiné à l'analyse (qui peut donc fortement différer de ceux étudiés par la suite en vue d'une application industrielle) a été mis au point dans le cas des produits secs (par exemple la poudre de caroube et la poudre de déchet).

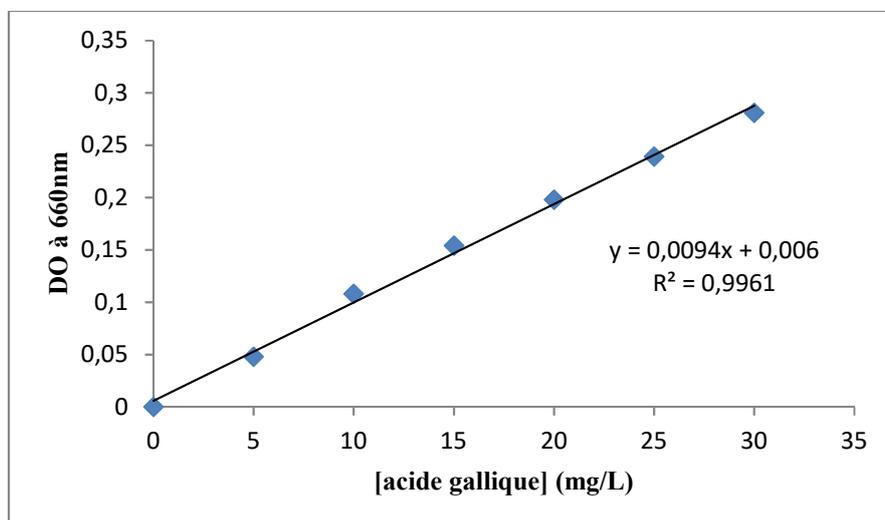
### 2.2.1 Dosage des polyphénols

Les polyphénols totaux ont été extraits et dosés selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton et Rossi (1965). L'acide gallique a servi de standard de référence.

Protocole d'extraction : 1 g de poudre de caroube ou de déchet de caroube est extrait avec 40 mL d'un mélange acétone/eau (50% v/v) dans un réacteur agité à température ambiante (20-22°C) pendant 60 minutes. L'opération est répétée jusqu'à décoloration du mélange. Après centrifugation (10 min, 8000 tr/min) le surnageant est collecté, le solvant est évaporé sous vide et le volume perdu est remplacé par de l'eau distillée. Ensuite, l'échantillon est dilué selon les besoins.

Protocole de dosage : Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution-mère d'acide gallique à 40 mg/L. Le protocole de dosage consiste à mélanger 1 mL de la solution étalon ou d'échantillon à doser avec 1 mL d'une solution de carbonate de sodium (100g/L). Le mélange est chauffé à 38°C

pendant 10 min, puis on ajoute 1 mL d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au tiers. Après avoir vortexé, les échantillons sont stockés à température ambiante et à l'obscurité pendant 15 min. La mesure de la densité optique (DO) est réalisée à 660 nm contre un témoin sans extrait. La courbe d'étalonnage correspondante est représentée sur la Figure 2:3.



**Figure 2:3.** Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols.

### 2.2.2 Dosage des sucres réducteurs

En raison de la présence de groupements carbonyle libres (C=O), les sucres réducteurs (tels que le glucose et le fructose) réagissent avec l'acide dinitrosalicylique (DNS) en le réduisant en acide 3-amino-5-nitrosalicylique qui forme une coloration rouge-orangée à chaud (Miller, 1959).

Protocole de dosage : Le réactif DNS est préparé de la façon suivante pour 250 mL d'eau distillée :

- 2,5 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique
- 75 g de tartrate double de sodium potassium
- 4 g d'hydroxyde de sodium

Le réactif est conservé à l'obscurité à 4°C et a une durée de vie de 15 jours. Une gamme étalon est préparée avec une solution-mère à 2 g/L constituée de 50 % de glucose et 50% de fructose. Les échantillons sont dilués selon les besoins. On mélange 1 mL de gamme étalon ou d'échantillon à doser et 1 mL de réactif DNS. Après homogénéisation, les tubes sont incubés au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes, puis refroidis dans un bain de glace et additionnés de 10 mL d'eau distillée. La densité optique est mesurée à 540 nm contre un témoin sans extrait.

### 2.2.3 Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux a été réalisé selon la méthode de Dubois et al. (1956). La courbe d'étalonnage est construite à partir d'une solution-mère de glucose de concentration 100 mg/L qui a subi une série de dilutions (Figure 2:4).

Protocole de dosage : 1 g d'échantillon est dilué dans 40 mL d'eau distillée, puis redilué afin de ramener la concentration en sucre dans la gamme du dosage. On mélange 200  $\mu$ L de la solution à doser (ou solution étalon), 200  $\mu$ L de solution phénolique à 5% (p/v) et 1 ml d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 98%. Après avoir vortexé, les tubes sont mis à incuber dans un bain-marie à 100°C pendant 5 minutes. Le mélange est laissé 30 minutes à l'obscurité et la densité optique est lue à 480 nm contre un témoin sans extrait.

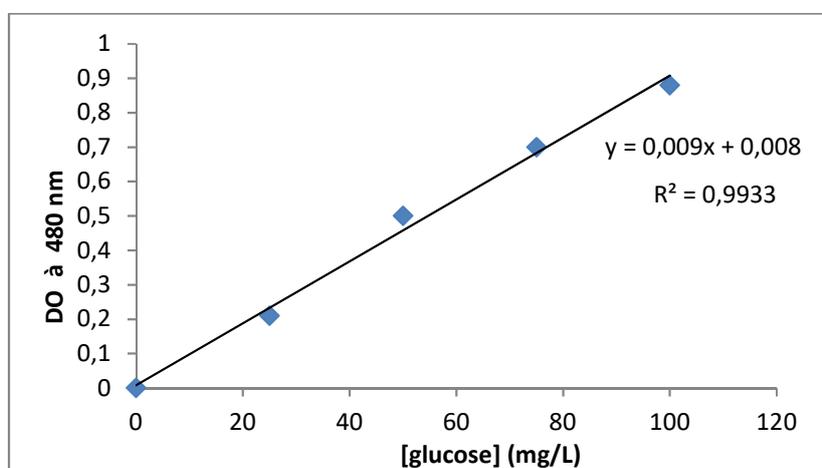


Figure 2:4. Courbe d'étalonnage du dosage des sucres totaux.

### 2.2.4 Dosages des lipides

La méthode décrite par Bligh et Dyer (1959) a été utilisée pour doser les lipides totaux.

Protocole de dosage : 0.5 g d'échantillon broyé (poudre de caroube ou de déchet) est mis en suspension dans un mélange constitué de 4 mL de chloroforme + 2 mL méthanol + 1 mL d'eau distillée. Après avoir vortexé, trois phases apparaissent :

- La phase supérieure : elle contient principalement méthanol + eau + les produits hydrosolubles (glucides, composés phénoliques) ;
- La phase intermédiaire : elle correspond aux restes solides de l'échantillon ;
- La phase inférieure : elle contient en gros le chloroforme + les lipides.

Le mélange est vortexé, puis centrifugé à 2.000 g pendant 10 minutes.

La phase inférieure contenant les lipides est prélevée dans des tubes à hémolyse pré-pesés et ceux-ci sont passés au *Speedvac* pendant 2h30 à 40°C, puis pesés lorsque la phase liquide a été éliminée.

La teneur en lipides est calculée à partir du rapport de la masse résiduelle obtenue sur la masse initiale d'échantillon.

### 2.2.5 Dosage des fibres

Les fibres insolubles ont été dosées selon la méthode développée par de Pádua et al. (2004) et adaptée par Pierre et al. (2011).

Protocole de dosage : 4 g de poudre de caroube sont digérés dans 200 mL d'acide chlorhydrique HCl à 5% pendant 30 min. Le mélange est filtré et lavé à l'eau chaude. Ensuite, le résidu est digéré par 200 mL d'une solution de soude NaOH à 5% sous reflux pendant 30 min. Le mélange est filtré et lavé à l'eau jusqu'à atteindre la neutralité du pH, puis lavé avec 20 mL d'éthanol et 20 mL d'éther éthylique. Le résidu est séché à 100°C pendant 2 heures. La masse résiduelle pesée est assimilée aux fibres.

### 2.2.6 Mesure de l'humidité

La méthode consiste à placer 5 g d'échantillon (poudre de caroube ou poudre de déchet) dans des coupelles en aluminium pré-pesées, puis à les placer dans une étuve réglée à 105°C pendant 6 heures. Les coupelles sont alors refroidies dans un dessiccateur, puis pesées. Le taux d'humidité est déduit des pertes de masse de l'échantillon après séchage :

$$\text{Humidité (\%)} = 100 \times \frac{\text{Masse initiale d'échantillon (g)} - \text{Masse d'échantillon séché (g)}}{\text{Masse initiale d'échantillon (g)}}$$

### 2.2.7 Dosage des cendres

La teneur en cendres a été déterminée selon la méthode officielle AOAC 972.15 (AOAC, 2006).

Protocole de dosage : 2 g d'échantillon sont pesés dans des creusets en porcelaine pré-pesés. Les creusets sont ensuite placés une nuit dans un four préchauffé à 600°C. Les creusets sont refroidis dans un dessiccateur avant pesée et la teneur en cendres est déterminée à partir du rapport suivant :

$$\text{Cendres (\%)} = 100 \times \frac{\text{Masse creuset après incinération (g)} - \text{Masse creuset vide (g)}}{\text{Masse initiale d'échantillon (g)}}$$

## 2.3 Extraction des sucres contenus dans le déchet de caroube

Le but de l'extraction des sucres du déchet est, par exemple, de mettre à disposition de la levure la source de carbone sous forme soluble, étape nécessaire pour la fermentation alcoolique. Des conditions d'hydrolyse acide ou d'extraction aqueuse ont été définies sur trois formes différentes du déchet de caroube afin d'optimiser l'extraction des sucres :

- Le déchet en poudre séché de taille moyenne 0,5 mm ;
- Le déchet humide de taille moyenne 2,5 mm ;
- Le déchet humide de taille moyenne environ 5 mm.

En effet, la taille des particules est un facteur clé lors des opérations d'extraction liquide/solide. L'ensemble des conditions testées est résumé sur la Figure 2:5.

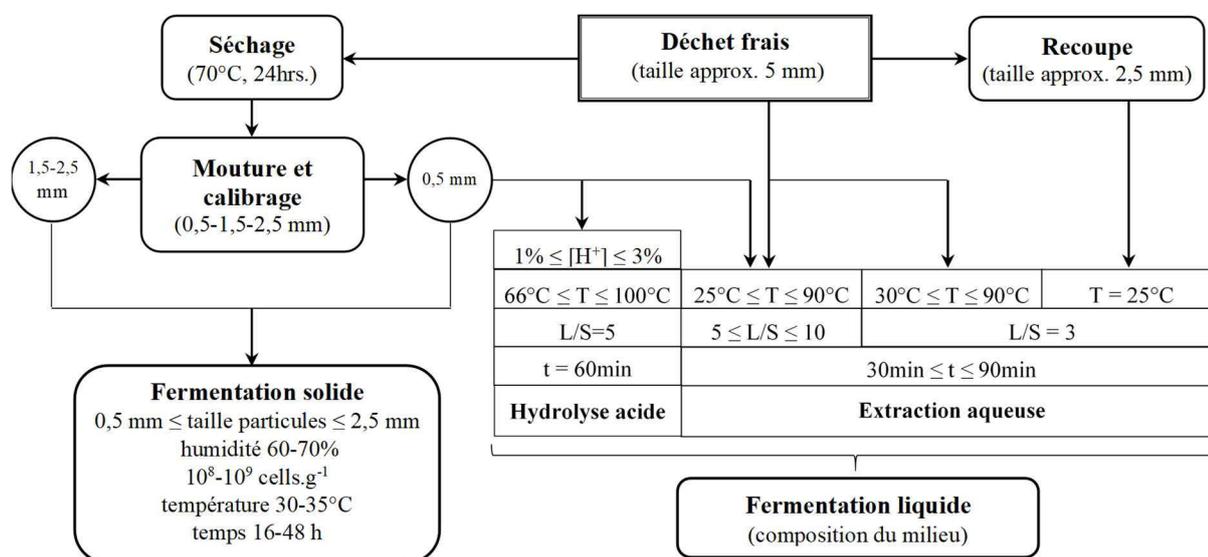


Figure 2:5. Protocole complet des essais d'extraction des sucres du déchet de caroube.

### 2.3.1 Hydrolyse acide

L'extraction des sucres par hydrolyse acide a été réalisée sur le déchet de caroube séché et broyé à une taille moyenne de 0,5 mm. L'extraction a été conduite sous reflux et sous agitation mécanique pendant une heure, en fixant le rapport massique de la solution d'acide sur le déchet (L/S) à 5. Les effets respectifs de trois niveaux de température T (66, 83 et 100°C) et de trois niveaux de concentrations en acide sulfurique (1, 2 et 3% v/v) ont été étudiés. Pour chaque essai, l'hydrolysate a été filtré, puis centrifugé, avant de quantifier les sucres totaux par la méthode de Dubois et al. (1956), et les sucres réducteurs par la méthode de Miller (1959), comme décrites dans les paragraphes 2.2.2 et 2.2.3. Chaque traitement a été répliqué trois fois, et un plan factoriel complet à deux facteurs et trois niveaux a été appliqué pour mesurer rigoureusement l'effet des facteurs T et H<sup>+</sup> (teneur en acide) sur l'extraction des sucres.

### 2.3.2 Extraction aqueuse

L'extraction des sucres en milieu acide est une méthode connue pour son efficacité à l'échelle industrielle, mais également pour générer des composés susceptibles de jouer le rôle d'inhibiteurs de la fermentation (Sánchez et al., 2010). Pour éviter ce problème, mais également dans le but de sélectionner une méthode d'extraction efficace et peu coûteuse, différentes conditions d'extraction aqueuse ont été testées sur le déchet séché de taille 0,5 mm, ainsi que sur le déchet frais de tailles 2,5 et 5 mm.

Pour le déchet sec de taille 0,5 mm, nous avons constaté que l'extraction ne peut pas être réalisée pour un rapport L/S inférieur à 5 en raison d'un gonflement de la poudre. Sur le déchet sec de taille 0,5 mm et sur le déchet frais initial (taille environ 5 mm), l'extraction a été réalisée pour  $5 \leq L/S \leq 10$ , avec une gamme de température T comprise entre 25 et 90°C et une durée d'extraction t comprise entre 30 et 90 minutes. Puis, chaque échantillon a été filtré et utilisé pour l'analyse de sucres totaux, comme déjà décrit dans le paragraphe 2.2.3. Chaque expérience a été répliquée trois fois et un plan factoriel fractionnaire  $3^{3-1}$  a été mis en œuvre pour les facteurs principaux L/S, T et t.

En parallèle, l'extraction aqueuse a été réalisée sur le déchet frais de taille 5 mm pour un rapport massique L/S=3 en prenant en compte l'effet de la température et de la durée d'extraction avec les mêmes niveaux que précédemment pour les facteurs principaux.

Finalement, afin d'étudier l'effet de la réduction de taille, l'extraction aqueuse a été réalisée pour un ratio L/S=3 sur le déchet frais de 2,5 mm à la température ambiante et sur un intervalle de temps compris entre 30 et 90 minute avec trois répliquations pour chaque condition.

## 2.4 Production de bioéthanol

Suite aux essais d'optimisation de l'extraction des sucres, les conditions optimales d'extraction ont été retenues afin d'étudier la mise en œuvre d'un procédé de fermentation alcoolique en phase liquide. Toutefois, un procédé alternatif de fermentation en milieu solide sera également développé.

### 2.4.1 Souche de *Saccharomyces cerevisiae*

Le micro-organisme choisi pour cette étude est la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui est économiquement, le micro-organisme le plus exploité par l'Homme. Cette levure est largement utilisée en agroalimentaire, notamment pour la production d'aliments fermentés (bière, pain, vin, boissons diverses...). La souche utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, couramment utilisée en panification.

### 2.4.2 Pré-cultures

La souche de levure est fournie sous forme de lyophilisat, reprise dans de l'eau stérile et étalée sur gélose YM-agar (Yeast Medium, Difco 0712-01-8), puis incubée 48 heures à 28°C. La souche est ensuite conservée à 4°C et repiquée sur boîte de Pétri 24 heures avant d'être utilisée en milieu liquide.

### 2.4.3 Cultures en milieu liquide

La fermentation en milieu liquide a été réalisée dans un réacteur de volume 500 mL (Infors HT, Multifors 2), avec un volume de travail de 450 mL (Figure 2:6).

Pour ces cultures, deux types d'essais ont été réalisés :

- La fermentation du jus extrait du déchet seul afin de tester la capacité de ce jus à permettre la croissance de la levure et la fermentation alcoolique (contrôle).
- La fermentation du jus extrait du déchet avec enrichissement par les éléments décrits par Kristiansen (1994) pour la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu minimum.

Après stérilisation en autoclave à 121°C pendant 20 minutes, un volume de 3% (v/v) de pré-culture est ajouté d'une façon stérile au milieu de fermentation. La température de fermentation est toujours fixée à 30°C et la vitesse d'agitation à 200 tpm sans aération. Le pH du milieu est ajusté à 5 en cours de culture par addition automatique d'une solution à 2 N de soude.

Des prélèvements sont ensuite effectués toutes les 2 heures durant les 16 premières heures de culture, puis toutes les 8 heures. Après dilution suffisante, la densité optique à 540 nm est lue immédiatement et le reste de l'échantillon est centrifugé. Les surnageants sont récupérés et congelés, les différents dosages pouvant être réalisés ultérieurement.



**Figure 2:6.** Réacteur de 500 mL utilisé pour la fermentation alcoolique en phase liquide.

### 2.4.4 Cultures en milieu solide

La fermentation en milieu solide constitue une alternative possible à la fermentation en milieu liquide. Elle utilise le déchet de caroube séché à 70°C pendant 24 h. Cinq facteurs ont été choisis pour cette étude car ils sont susceptibles d'avoir un effet significatif sur la croissance de la levure et la production d'éthanol :

- La taille des particules : elle détermine la surface de contact disponible et l'accessibilité de la levure aux nutriments (source de carbone, azote...). Une gamme de taille de particules comprise entre 0,5 et 2,5 mm a été choisie dans cette étude. Après séchage du déchet à 70°C pendant 24 h, ce dernier a été broyé mécaniquement, puis tamisé pour obtenir les tailles de 1,5 et 2,5 mm.
- L'humidité : c'est le paramètre a priori le plus influent sur les performances de la fermentation solide ; un taux d'humidité optimal est nécessaire pour assurer une croissance maximale des micro-organismes et, par la suite, optimiser la fermentation alcoolique. Dans cette étude, le taux d'humidité est choisi entre 60 et 70 %. L'humidité a été mesurée au moyen d'une balance infrarouge (Precisa 310M).
- Le volume de l'inoculum : il joue a priori un rôle important sur la cinétique de fermentation. Une gamme de concentration initiale de cellule a été choisie entre  $10^8$  et  $10^9$  cellules/g de déchet.
- La durée de la culture : la durée de la fermentation a été choisie entre 16 et 48 heures.
- La température : elle est considérée parmi les facteurs les plus déterminants sur la croissance des micro-organismes. Une gamme de température comprise entre 30 et 35°C a été retenue.

Les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 10 g de déchet de caroube additionnés de 1% (p/p) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Sigma Aldrich, A9434). L'humidité est amenée à la valeur voulue par ajout d'eau. Le pH initial est ajusté à  $5,0 \pm 0,1$ , le pH optimal pour la croissance de la levure et la fermentation alcoolique. Les flacons sont stérilisés en autoclave à 121°C pendant 20 min, et chaque condition est répliquée trois fois. En fin de fermentation, le substrat fermenté est repris dans 80 mL d'eau distillée ; le mélange est agité pendant 30 minutes à 250 tpm sur une plaque d'agitation, puis centrifugé 10 minutes à 4.000 g. Le culot solide est de nouveau repris dans l'eau distillée pour l'extraction de l'éthanol résiduel. Les deux extraits liquides sont combinés et utilisés pour déterminer le taux d'éthanol par chromatographie en phase liquide (HPLC), ainsi que la quantité de sucres résiduels.

Un plan de criblage  $2^{5-3}$  a été utilisé dans un premier temps pour évaluer l'impact des facteurs sélectionnés sur le rendement en éthanol qui est considéré comme la réponse. Ensuite, la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) a été mise en œuvre sur les trois facteurs retenus comme les

plus influents, suite au plan de criblage. Un plan composite centré a été appliqué afin de définir les conditions optimales de production d'éthanol.

### 2.4.5 Culture en milieu semi-solide

Des essais de production d'éthanol ont été conduits en utilisant directement le déchet de caroube humide (GATEAU 2 de la Figure 2:1) immergé dans une phase liquide afin d'éviter une étape intermédiaire de séchage. Le milieu de culture utilisé est constitué des éléments décrits par Kristiansen (1994). Pour étudier l'effet de la taille du déchet de caroube sur la production d'éthanol, une réduction de taille de 5 à 2,5 mm a été réalisée par coupure mécanique du déchet frais. Une concentration initiale en sucres totaux dans le réacteur de l'ordre de 44 g/L peut être obtenue en additionnant 360 mL de milieu de culture à 80 g de déchet de caroube, en considérant que le GATEAU 2 contient 50 % d'humidité.

La fermentation a été réalisée dans le réacteur (de volume 500 mL correspondant à un volume de travail de 400 mL déjà présenté sur la Figure 2:6 : type Infors HT, Multifors 2). La pré-culture a été préparée de la même manière que précédemment (paragraphe 2.4.2). Pour les essais avec stérilisation, on place le réacteur dans un autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Un volume d'inoculum correspondant à 3% (v/v) est ajouté au milieu de fermentation. La température de fermentation reste fixée à 30°C et la vitesse d'agitation à 200 tpm sans aération. Le pH est ajusté à 5 en cours de culture par addition automatique d'une solution de soude de concentration 2 N.

### 2.4.6 Culture en réacteur de volume supérieur

Un test de fermentation en milieu liquide a été réalisé sur le jus extrait du déchet de caroube dont la concentration initiale en sucre est de 65 g/L dans un fermenteur de 6 L de marque B. Braun avec un volume de travail de 3 L (Figure 2:7). La pré-culture a été préparée selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.4.2. Après stérilisation en autoclave à 121°C pendant 20 minutes, 3% (v/v) de pré-culture est ajouté au milieu de fermentation. La température de fermentation est toujours fixée à 30°C et la vitesse d'agitation à 200 tpm sans aération. Le pH du milieu est ajusté à 5 en cours de culture par addition automatique d'une solution de soude de concentration 2 N.

### 2.4.7 Méthodes analytiques

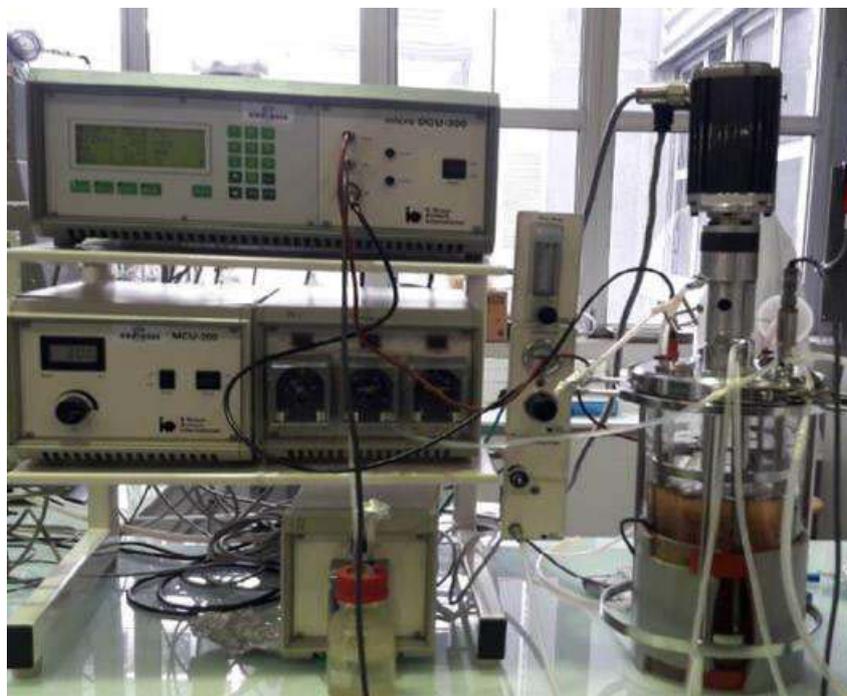
La présence de biomasse est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible JENWAY 6405 (France) représenté sur la Figure 2:8. La densité optique (DO) mesurée traduit le pourcentage de lumière non transmise par la suspension de levures. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de biomasse présente dans l'échantillon, à condition d'effectuer une dilution suffisante ( $DO < 0,4$ ).

Pour obtenir la quantité de biomasse sèche présente dans l'échantillon, une mesure de poids sec est effectuée, en filtrant un volume connu de prélèvement sur membrane de porosité déterminée (acétate de cellulose 0,45  $\mu\text{m}$ ). La différence de poids sec de la membrane avant et après filtration ramenée au volume filtré, permet d'estimer la concentration en biomasse sèche.

Une corrélation linéaire a été établie entre la densité optique et la concentration de biomasse :

$$X = 0,8487 + 2,098 Y$$

où  $X$  est la concentration en biomasse (g/L) et  $Y$  l'absorbance à 550 nm.



**Figure 2:7:** Réacteur de 6 L utilisé pour la fermentation alcoolique en phase liquide.

L'éthanol et les acides gras volatils (VFA) sont mesurés à l'aide d'une chaîne de chromatographie en phase liquide (HPLC). L'appareil (système HP LC 1260 Incentral Quaternary LC, Agilent Technologies, USA), représenté sur la Figure 2:8, est équipé de deux colonnes d'exclusion connectées en série (Rezex ROA 300x7,8 mm, Phenomenex, USA). La phase mobile est une solution d'acide sulfurique 2 mM dans de l'eau ultrapure (Millipore, MilliQmore) dont le débit est fixé à 0,7 mL/min. Les produits sont détectés à l'aide d'un réfractomètre (série HP 1100, Agilent Technologies, USA). Avant l'analyse, les échantillons sont déprotéinisés pour éviter le colmatage de la colonne. Le protocole de déprotéinisation est le suivant : 250  $\mu$ L de solution d'hydroxyde de baryum ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$  ; 0,3 M) et 250  $\mu$ L de solution de sulfate de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$ , 5% p/v) sont ajoutés à 2 mL d'échantillon. Après centrifugation pendant 5 min à 10 000 tpm, le surnageant est filtré sur filtre d'acétate de cellulose de 0,45  $\mu$ m.

En parallèle, les concentrations en sucres résiduels ont été déterminées par la méthode au DNS décrite précédemment (section 2.2.2).

Dans le cas de la fermentation semi-solide, le dosage des sucres est effectué de la manière suivante. Le déchet résiduel est séché à l'étuve à 70°C pendant 24h, puis broyé en poudre à l'aide d'un broyeur. Une suspension est préparée par mélange de 50 mL d'eau distillée à 0,7 g de la poudre de

déchet obtenue. Le mélange est centrifugé et le surnageant est récupéré pour le dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois et al. (1956) décrite dans le paragraphe 2.2.3. De même, en fin de culture, on dose les sucres résiduels du moût de fermentation par la même méthode. La quantité de sucre restante dans le moût de fermentation et la quantité de sucre restante dans le déchet en fin de fermentation représente la quantité de sucres totaux résiduels.



**Figure 2:8.** Spectrophotomètre (à gauche) et chaîne HPLC (à droite) utilisés.

## 2.5 Production d'acide lactique

### 2.5.1 Souche

La souche de Lactobacilles utilisée est *Lactobacillus rhamnosus* (GGATCC 53103). Cette bactérie est cultivée à 37°C pendant 48 heures dans un milieu dont la composition est la suivante : 20 g de glucose, 4 g extrait de levure, 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,05 g de  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5 g de  $K_2HPO_4$ , 5 g d'acétate de sodium, et 0,5 g de  $KH_2PO_4$  par litre d'eau déminéralisée. Puis, la culture est conservée sur boîte de Pétri à 4°C et repiquée chaque semaine. Pour une conservation de longue durée, la culture est stockée dans une solution aqueuse à 20% de glycérol à -80°C.

### 2.5.2 Extraction des sucres à partir du déchet de caroube

Le sous-produit de caroube humide issu de la production de mélasse et dont la taille est réduite à 2,5 mm (comme décrit précédemment au paragraphe 2.1) a été utilisé pour l'extraction de sucre par une macération à la température ambiante, pour un rapport eau/masse de déchet (L/S=3), sans agitation pendant 90 minutes.

### 2.5.3 Milieu de pré-culture

La culture conservée à 4°C est utilisée pour la préparation de la pré-culture avec un volume d'inoculation de 5% (v/v) pour 24 heures à 37°C. La pré-culture est préparée sur milieu MRS dont la composition est la suivante : peptone 10 g ; extrait de viande 8 g ; extrait de levure 4 g ; glucose 20 g ;

acétate de sodium trihydraté 5 g ; citrate d'ammonium 2 g ; Tween 80 1 mL ; hydrogénophosphate de potassium 2 g ; sulfate de magnésium heptahydraté 0,2 g et sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05 g dans un litre d'eau déminéralisée.

### 2.5.4 Immobilisation de *Lactobacillus rhamnosus*

L'immobilisation des micro-organismes durant la fermentation entraîne une amélioration de la productivité, réduit la possibilité de contamination et offre l'opportunité de réutiliser les cellules plusieurs fois. Pour préparer les cellules immobilisées dans l'alginate, plusieurs étapes sont nécessaires.

Tout d'abord, l'inoculum de la fermentation est préparé 24 heures avant la fermentation lactique dans le milieu MRS. Pour tester l'effet du volume de l'inoculum sur la production d'acide lactique, trois volumes de pré-culture (2, 4 et 6 % par rapport au volume du travail du réacteur) sont utilisés.

Le volume de pré-culture est centrifugé dans des tubes stériles de 50 mL à 3800 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le culot est mélangé avec 20 mL de solution d'alginate de sodium (SAFC Sigma w 201502) dans un tube stérile de 50 mL ; la solution d'alginate est stérilisée au préalable par autoclave à 121°C pendant 5 minutes. Trois concentrations en alginate sont utilisées (2, 3 et 4 % p/v) pour tester l'effet de ce paramètre qui affecte la consommation des substrats (glucose et fructose) par la bactérie.

La suspension bactéries/alginate est mélangée par vortex, puis les bactéries sont immobilisées dans les billes d'alginate par la méthode d'extrusion/gélification. La solution est pompée à l'aide d'une pompe péristaltique (*Gilson-Minipuls 2*, France) dans une aiguille (type 20G, 0.9×40mm), ce qui produit des billes d'environ 5 mm de diamètre. La gélification des billes se fait dans une solution stérile de CaCl<sub>2</sub> 4% (m/m). Le principe de la formation de ces billes est basé sur le fait que l'alginate de sodium est une longue chaîne comportant des charges négatives sous forme de groupements carboxyles COO<sup>-</sup> dont la charge est contrebalancée par la charge positive de l'ion sodium Na<sup>+</sup>. Lorsque l'alginate soluble chargé négativement rencontre du calcium, les ions calcium Ca<sup>2+</sup> déplacent les ions sodium. Les ions calcium étant divalents, chaque ion calcium peut interagir avec deux charges négatives, soit deux groupements COO<sup>-</sup> et il y a donc formation d'un réseau car les ions calcium permettent de « lier » deux chaînes d'alginate entre elles. Cette polymérisation des chaînes d'alginate crée le gel ; le liquide contenant l'alginate devient épais, durcit et c'est ainsi que se forme une peau souple à la surface de la sphère. Les billes sont laissées 4 heures dans la solution de chlorure de calcium pour durcir, puis elles sont lavées par une solution stérile de CaCl<sub>2</sub> pour éliminer les ions calcium et les cellules libres.

### 2.5.5 Production en bioréacteur

La fermentation est réalisée dans des réacteurs de 500 mL de volume total (Infors HT, Multifors 2), avec un volume de travail de 400 mL (Figure 2:6).

Pour tester la capacité de *Lactobacillus rhamnosus* à pousser et produire du lactate sur le jus extrait du déchet, deux compositions de milieu de culture ont été testées :

## Matériels et méthodes

---

- Le premier est un contrôle ou seul le jus extrait du déchet est mis en culture avec *Lactobacillus rhamnosus* ;
- Le jus extrait du déchet est supplémenté avec l'extrait de levure, 10 g/L ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5 g/L ;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,03 g/L ;  $K_2HPO_4$ , 3 g/L ;  $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ , 2 g/L et Tween 80, 1 mL/L.

Après la préparation du milieu de culture, ce dernier est stérilisé par autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Les billes d'alginate sont transférées stérilement dans le réacteur. La température est fixée à 37°C pour tous les essais et le pH est ajusté à l'un des trois niveaux choisis pour le plan d'expériences par addition automatique d'une solution de soude NaOH à 5 M. La fermentation lactique est suivie pendant 24 heures : un prélèvement est effectué toutes les 2 heures durant les 12 premières heures, puis toutes les 6 heures. Les échantillons prélevés sont stockés pour l'analyse des concentrations en acide lactique et en sucres résiduels.

Quatre facteurs sont sélectionnés pour tester leur effet sur la fermentation lactique :

- La concentration en alginate : pour le processus d'immobilisation, la concentration d'alginate est essentielle car elle affecte la disponibilité et la diffusion des nutriments (glucose et fructose) pour la bactérie. Dans ce but, trois concentrations en alginate ont été choisies (2 ; 3 et 4%).
- Le pH : il a une influence sur la cinétique des réactions enzymatiques et, par conséquent, sur le métabolisme cellulaire. Le pH optimal de croissance des lactobacilles se situant entre 4,5 et 6,5, les 3 valeurs sélectionnées sont : 4,5, 5,5 et 6,5.
- La vitesse d'agitation : il s'agit d'un paramètre important pour améliorer le transfert de nutriments entre le milieu de culture et les bactéries immobilisées (Liu et Shen, 2008). Pour étudier l'effet de ce paramètre sur la production d'acide lactique, trois niveaux d'agitation ont été choisis : 50, 100 et 200 tpm.
- Le volume de l'inoculum (ACEB) : celui-ci affecte la cinétique et le rendement de la fermentation. Pour cette étude, trois niveaux (2, 4 et 6 % par rapport au volume de travail dans le réacteur) ont été sélectionnés.

La réutilisation des cellules immobilisées sur plusieurs cycles est l'un des intérêts majeurs de la technique d'immobilisation. Pour cela, les cycles de culture en batch sont réalisés dans le même réacteur. Le milieu de fermentation est éliminé après 24 heures et remplacé par la même quantité de milieu de culture stérile. Des échantillons sont prélevés pour mesurer la production d'acide lactique et la teneur en sucres résiduels.

Le jus du déchet de caroube est constitué de trois sucres principaux : glucose, fructose et saccharose. En présence de glucose et fructose, la bactérie lactique est incapable de consommer le saccharose présent dans le milieu de culture. Pour cela, une hydrolyse du saccharose par une voie enzymatique (invertase) est envisagée, ce qui permettrait une consommation complète des sucres et

une amélioration du rendement de production d'acide lactique. Dans ce but, l'enzyme invertase (Sigma-Aldrich, I4504) 60 U/mg a été utilisée. Après stérilisation du milieu de fermentation, la température a été ajustée à 55°C et le pH à 5,5 (*i.e.* le pH initial du milieu de fermentation). L'enzyme invertase est ajoutée pour un temps de réaction d'environ une heure. Durant cette période, des prélèvements sont effectués pour analyser la quantité de sucres réducteurs par la méthode DNS. Après une heure, la totalité du saccharose est converti en glucose et fructose, et la pré-culture est ajoutée au milieu de fermentation. Un prélèvement est effectué toutes les deux heures durant les 12 premières heures puis toutes les six heures pour le reste de la culture.

### 2.5.6 Méthodes d'analyses

Après une étape d'hydrolyse acide qui permet d'hydrolyser le saccharose en glucose et fructose, les échantillons prélevés sont utilisés pour l'analyse des sucres réducteurs par la méthode DNS décrite au paragraphe 2.2.2. L'acide lactique est dosé par HPLC selon la méthode déjà décrite au paragraphe 2.4.7.

## 2.6 Traitement du diclofénac par *Ankistrodesmus braunii*

### 2.6.1 L'algue *Ankistrodesmus braunii*

L'algue utilisée dans cette étude est *Ankistrodesmus braunii* CCAP 202/7a, connue pour sa capacité à traiter les polluants ; c'est une algue verte unicellulaire, dont les cellules sont solitaires ou vaguement regroupées en paquets ou en touffes.

### 2.6.2 Milieu de culture

Deux milieux de culture sont utilisés pour tester la croissance d'*Ankistrodesmus braunii*, ainsi que la capacité de cette algue à éliminer le diclofénac (Sigma-Aldrich, USA).

- Le premier milieu est le protéose peptone (PP) pour la croissance en autotrophie, dont la composition est la suivante : 20 mL de chaque solution en stock ( $\text{MgSO}_4$  (1 g/L) ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 g/L) ;  $\text{KNO}_3$  (10 g/L)) et 1 g de protéose peptone en poudre (OXOID LP0085).
- Le second milieu permet de créer des conditions de mixotrophie, où le carbone organique (glucose, fructose et saccharose) est la source de carbone utilisée par *Ankistrodesmus braunii*. Différentes concentrations de sucres totaux (5 – 10 et 26 g/L) ont été testées afin de déterminer la concentration optimale pour la croissance de l'algue. Dans ce but, une étape d'extraction des sucres a été nécessaire : un rapport masse d'eau sur masse de sous-produit de caroube frais L/S=5 a été utilisé pour l'extraction des sucres à partir du déchet de caroube de taille 0,5 cm à la température ambiante, sans agitation pendant 30 minutes. Ces conditions d'extraction donnent une concentration finale en sucres totaux de 26 g/L. Le surnageant est centrifugé (HERAEUS, BIOFUGE PRIMOR centrifuge) à 8.900 g pendant 10 minutes à 4°C. Deux dilutions du jus initial ont été réalisées pour obtenir deux concentrations

inférieures, respectivement de 10 et 5 g/L. Le jus de déchet de caroube a été complété de  $\text{MgSO}_4$  (0,3 g/L), de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,3g/L) et d'extrait de levure (2 g/L). Le pH a été ajusté à 7 par addition d'une solution de NaOH 1 N, puis le milieu de culture a été stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

### 2.6.3 Pré-culture et culture en présence de diclofénac

La pré-culture est réalisée dans un Erlenmeyer de 100 mL. Un volume de 5 mL de la suspension d'algue est inoculé dans 50 mL de milieu protéose peptone, puis mis à l'étuve (INFROS, Suisse) à 23°C, sous éclairage avec une irradiance de  $100 \mu\text{Es}^{-1}.\text{m}^{-2}$  et avec une alternance de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité. Lorsque la pré-culture est en phase exponentielle, un volume de 20 mL de pré-culture est utilisé pour inoculer 50 mL de milieu à base de déchet de caroube : ceci correspond à la phase d'adaptation de l'algue *Ankistrodesmus braunii* à la source de carbone organique : glucose, fructose et saccharose.

Pour étudier l'élimination du diclofénac par la microalgue, les expériences ont été réalisées dans des Erlenmeyers de volume 500 mL avec un volume de travail de 250 mL. Le diclofénac est ajouté à des concentrations finales de 10 ou 20 mg/L. Suite à l'étape de stérilisation par autoclave, on s'assure, par un dosage en HPLC, que le traitement thermique n'est pas à l'origine de la disparition du polluant.

### 2.6.4 Suivi de croissance

Le suivi de la croissance d'*Ankistrodesmus braunii* dans les deux milieux de culture en absence et en présence de diclofénac est réalisé par comptage sur cellule de Malassez. L'observation microscopique par microscopie optique utilisée pour le comptage est également importante pour suivre le polymorphisme et le changement de forme de l'algue entre les deux milieux de culture (autotrophe et mixotrophe).

### 2.6.5 Procédures analytiques

Elles consistent en trois étapes. Les deux premières sont des méthodes chromatographiques appliquées à la phase liquide. La troisième met en jeu un prétraitement des cellules permettant d'analyser le diclofénac potentiellement stocké dans les cellules.

Analyse par HPLC : Pour suivre l'évolution de la concentration en diclofénac, les échantillons prélevés tous les deux jours ont été filtrés sur filtres polyester (Chromafil Xtra PET, 0.45  $\mu\text{m}$ , 25 mm diamètre), puis injectés dans la chaîne HPLC (Waters 2410, France) équipée d'une colonne C18 (Waters, Symmetry : 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  250 mm) et de deux détecteurs (réfractomètre et spectrophotomètre UV-visible). La phase mobile est un mélange d'acétonitrile (Sigma-Aldrich) et d'eau ultrapure à 70:30 (v/v). Le débit est 1 mL/min et la longueur d'onde de 220 nm. Le temps de rétention du diclofénac est de 9,7 minutes.

Identification des sous-produits dérivés du diclofénac : Une chaîne de chromatographie liquide à ultra-performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (UPLC-MS MS) disponible à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR) a été utilisée pour identifier les métabolites issus de la dégradation du diclofénac. Les analyses ont été effectuées avec un système Acquity™ UHPLC H-Class (Waters France) couplé à un spectromètre de masse quadrupole triple (MS/MS) Waters Acquity™ équipé d'une source d'ionisation par électro spray. La séparation a été obtenue avec une colonne de phase inversée BEH C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm) placée dans un four à 45°C. L'élution a été effectuée avec un mélange acétonitrile/eau ultrapure (rapport 30/70) contenant 0,1% (v/v) d'acide formique, en mode isocratique avec un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Pour l'analyse, un volume d'échantillon de 5 μL a été utilisé. Les analyses par spectrométrie de masse MS ont été effectuées en mode positif d'ionisation par électro-pulvérisation.

Identification du mécanisme d'élimination du diclofénac : Pour vérifier que le diclofénac a été dégradé et pas seulement stocké en intracellulaire, les cellules d'algues sont éclatées à 239 MPa dans un broyeur haute pression (Constant Systems, G.-B.), puis la concentration en diclofénac a été mesurée par HPLC comme précédemment.

## 2.7 Production d'hydrogène par fermentation sombre

### 2.7.1 Préparation des boues activées

Les boues anaérobies sont collectées de la station de traitement des eaux usées de Clermont-Ferrand (France). Dans le but d'inactiver les bactéries méthanogènes et les bactéries consommatrice d'hydrogène ; ces boues sont traitées en présence de sodium 2-bromoethanesulfonate en utilisant la méthode décrite par Bullock et Kristiansen (1989). Après ce prétraitement, le consortium microbien est inoculé dans un milieu de culture pour un volume de 10% pour 16 h à 37°C.

### 2.7.2 Milieux de culture

Des essais de production d'hydrogène par le consortium bactérien ont été conduits en utilisant le déchet de caroube humide comme source de carbone (GATEAU 2 – Figure 2:1). Une quantité déterminée de ce déchet est reprise dans un milieu liquide pour lequel trois compositions différentes ont été testées :

- Le premier est un milieu complet dont la composition est la suivante (en g/L) : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,86 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,22 ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,22 ; FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1,13 ; NaCl, 0,81 ; ZnSO<sub>4</sub>, 0,37 ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,27 ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,13 ; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,12 ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 8,1·10<sup>-2</sup> ; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 8,1·10<sup>-2</sup> ; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 6,8·10<sup>-2</sup> ; hémine bovine, 10<sup>-3</sup> ; biotine, 2·10<sup>-4</sup> ; PABA, 10<sup>-4</sup> ; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6·10<sup>-5</sup> ; MnSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2,3·10<sup>-5</sup> ; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2,3·10<sup>-6</sup>.
- Le deuxième milieu est limité à l'apport de fer : FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1,13 g/L.

- Le troisième milieu contient les sources de fer et d'azote :  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,13 g/L et  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4,86 g/L.

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

Pour étudier l'effet de la taille du déchet sur la disponibilité du sucre et la production d'hydrogène par le consortium utilisé, une réduction de taille de 5 à 2,5 mm a été réalisée par coupure mécanique du déchet frais.

Le milieu de culture final est obtenu en additionnant 1900 mL d'un des trois milieux liquides décrits à 200 g de déchet de caroube (GATEAU 2 à 50% d'humidité). La concentration initiale en sucres totaux dans le réacteur est de l'ordre de 22 g/L.

### 2.7.3 Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé de la manière suivante : 10 mL de consortium traité est transféré dans 90 mL de milieu de pré-culture dont la composition est décrite dans le paragraphe précédent. Après inoculation, le milieu de pré-culture est incubé dans une étuve (Memmert IN 110) à 37°C pendant 12 heures et sous une agitation de 120 tpm.

### 2.7.4 Culture en discontinu

La culture en discontinu est réalisée dans un réacteur maintenu en anaérobiose. Le volume de travail du réacteur est de 2 litres (Figure 2:9) ; l'inoculum est ajouté en début de culture avec un volume de 10% par rapport au volume de travail.



**Figure 2:9.** Réacteur utilisé pour la production d'hydrogène de deuxième génération à partir de déchet de caroube.

Après autoclave, le milieu de culture est purgé par du CO<sub>2</sub> et de la L-cystéine est ajoutée pour éliminer les traces d'oxygène. Le pH est ajusté à 6 par ajout de KOH à 5M.

Après ajout de la pré-culture, la culture se déroule en phase sombre à 37°C, l'agitation est réglée à 120 tpm. Après une phase de culture d'environ 10 heures, des échantillons sont prélevés toutes les heures pour une durée minimale de 18 heures.

### 2.7.5 Méthodes analytiques

Les acides gras volatils et l'éthanol dans le digestat (phase liquide) sont dosés par HPLC après prélèvement, comme décrit dans le paragraphe 2.4.7. Le dosage de sucres totaux est réalisé comme décrit dans le paragraphe 2.2.2.

L'analyse qualitative du biogaz collecté en sortie de réacteur est réalisée par une micro-GC (Agilent 3000A, Agilent Technologies, USA), équipée de 2 voies d'analyses et d'un détecteur de conductivité thermique (Figure 2:10). La première voie est équipée d'un tamis moléculaire (colonne MS5A) pour déterminer la composition en H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>. L'argon est utilisé comme gaz porteur à une pression de 30 psi. Les températures de fonctionnement du port d'injection et de la colonne sont respectivement de 80°C et de 90°C. La seconde voie est équipée d'une colonne PoraPlot U pour déterminer la composition en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>S. L'hydrogène est utilisé comme gaz porteur à une pression de 30 psi. Les températures de fonctionnement du port d'injection et de la colonne sont respectivement de 90°C et 60°C. Les résultats sont traités par le logiciel Soprane (SRA Instruments, France).

Le volume de biogaz produit a été mesuré au moyen d'un compteur volumétrique (TG05, Ritter, Allemagne). Il est présenté sur la Figure 2:10. Le logiciel Rigamo (v. 3.1) permet une acquisition des données au cours du temps pendant toute la durée de la culture.



**Figure 2:10.** Chaîne micro-GC (à gauche) et compteur volumétrique (à droite) utilisés pour la mesure de la production et de la composition du biogaz.

En combinant les données de débit volumique de biogaz produit au cours du temps avec celles de composition du biogaz obtenues par micro-GC, la loi des gaz parfaits permet d'estimer les débits

molaires et massiques de H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> produits à chaque instant, ainsi que les volumes cumulés sur l'ensemble d'une culture.

## 2.8 Conclusion

En conclusion, nous disposons maintenant de l'ensemble des méthodes d'analyses permettant de caractériser la composition de la caroube, ainsi que celle du déchet solide résultant de la production de mélasse qui est le centre d'intérêt de ce travail. Nous disposons également des opérations unitaires associées à l'extraction des sucres résiduels de ce déchet (broyage, filtration, séchage, mélange...), de leurs gammes de conditions opératoires, ainsi que des matériels permettant de valoriser ces sucres, voire directement le déchet, tout d'abord par fermentation sous la forme de bioéthanol, d'acide lactique ou de biohydrogène, mais encore comme substrat dans une application de phycoremédiation. Dans toutes les opérations unitaires et les étapes de fermentation mises en œuvre dans les chapitres suivants, les méthodologies décrites dans le présent chapitre (méthodes d'analyses, approche par plans d'expériences...) joueront un rôle clé sur la qualité des estimations des rendements et des productivités et donc sur les conclusions qui pourront être obtenues à partir des essais sur les voies de valorisation potentielles du déchet considéré.

## 2.9 Références

- AOAC (2006). Official methods of Analysis of AOAC International Gaithersburg. Maryland. AOAC 2006, 31:931.04, 972.15.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Bullock, J. D., & Kristiansen, B. (1987). Saunders College Publishing/Harcourt Brace, Academic Press, London. *Basic Biotechnology*.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Kristiansen, B. (1994). Integrated Design of a Fermentation Plant. The production of Baker's Yeast. VCH, Weinheim.
- Liu, R., & Shen, F. (2008). Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresource Technology*, 99(4), 847-854.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

- Pádua, M. D., Fontoura, P. S. G., & Mathias, A. L. (2004). Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützting) bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fascita* (Delile). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(1), 49-55.
- Pierre, G., Sannier, F., Goude, R., Nouviaire, A., Maache-Rezzoug, Z., Rezzoug, S. A., & Maugard, T. (2011). Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 305-310.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

# Chapitre 3. Valorisation du déchet de caroube en bioéthanol 2G

## 3.1 Introduction

Comme mentionné dans le chapitre 1, la production de bioénergies et en particulier, de biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération, constitue l'une des pistes possibles pour la substitution des combustibles fossiles liquides, soit directement dans un moteur thermique, soit pour la production d'électricité par voie thermique ou par une pile à combustible à éthanol direct. De plus, l'éthanol est à la fois un solvant et un intermédiaire essentiel à la synthèse de nombreuses molécules d'intérêt. Si la production de bioéthanol de deuxième génération n'est pas encore concurrentielle par rapport aux biocarburants de première génération, elle compense ce coût par son meilleur bilan environnemental et sociétal.

Dans le cas du déchet de caroube, on dispose d'une matière première relativement riche en sucre par rapport aux substrats alternatifs, par exemple d'origines agricole, forestière ou alimentaire, qui ne nécessite donc pas de prétraitement physicochimique poussé. Ceci constitue un avantage technologique et économique essentiel, même si la disponibilité de la caroube limite son utilisation aux pays producteurs.

Le travail réalisé au cours de cette thèse sur la production d'éthanol 2G a fait l'objet d'une publication acceptée au journal *Bioresource Technology*. Il a consisté à caractériser le déchet issu la préparation de la mélasse de caroube, puis à étudier l'extraction des sucres de ce déchet solide en vue de leur fermentation par *S. cerevisiae*. Un des défauts de ce procédé, par ailleurs général à la production de biocarburants 2G par voie fermentaire, est sa consommation en eau élevée par rapport aux procédés 2G alternatifs fondés sur la voie thermochimique. C'est pour cette raison que nos travaux incluent également l'étude d'un procédé alternatif de production de bioéthanol 2G par fermentation en milieu solide qui limite les besoins en eau, sans toutefois les supprimer en totalité, puisqu'une extraction de l'éthanol du solide est alors nécessaire en fin de fermentation.

Les résultats démontrent que le déchet de caroube libanaise constitue un substrat intéressant pour la production de bioéthanol 2G, en particulier pour la fermentation en milieu solide.

## 3.2 Article publié dans Bioresource Technology

### VALORIZATION OF CAROB WASTE: DEFINITION OF A SECOND-GENERATION BIO-ETHANOL PRODUCTION PROCESS

Hajar Bahry<sup>1,2,3</sup>, Agnès Pons<sup>1,2</sup>, Rawa Abdallah<sup>3</sup>, Guillaume Pierre<sup>1,2</sup>, Cédric Delattre<sup>1,2</sup>, Nidal Fayad<sup>1,2</sup>, Samir Taha<sup>3</sup>, Christophe Vial<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup>CNRS - UMR 6602, IP, F-63178 Aubière, France.

<sup>3</sup>Lebanese University; AZM Centre for Research in Biotechnology and its Applications; Laboratory of Applied Biotechnology for Biomolecules, Biotherapy and Bioprocess; El Mitein street, Tripoli, Lebanon.

#### Abstract

The aim of this work was to develop a strategy for second-generation ethanol production from carob solid waste issued from Lebanese food industry. The pros and cons of submerged (SF) and solid-state fermentations (SSF) using *S. cerevisiae* on ethanol yield and productivity were compared, including the respective roles of upstream and downstream processes, such as the size reduction, or sugar and ethanol recovery processes. The design of experiments methodology was applied. Experimental results demonstrated that SSF applied to cut carob waste from carob syrup preparation was simpler to operate and more cost-effective, maintained yield and productivity (0.458 g ethanol/g consumed sugar and 4.3 g/(kg waste)/h) in comparison to SF (0.450 g ethanol/g consumed sugar and 5.7 g/(kg waste)/h), and was able to achieve ethanol production up to 155 g/(kg waste) at low water demand, while SF reached only 78 g/(kg waste) due to the limitations of the sugar extraction pretreatment.

**Keywords:** carob by-product, second generation bioethanol, sugar extraction, solid-state fermentation, submerged fermentation

#### 1. Introduction

The carob tree, also referred to as locust bean tree, belongs to the legume family, is widely cultivated in Mediterranean countries for its indisputable ecological, industrial and ornamental importance (Race et al., 1999; Zengin et al., 2008). In Lebanon, carob trees are abundant and distributed along the coastal lower hills. For millennia, parts of the carob tree were used to treat diseases (Sidina et al., 2009), such as bark and leaves that are effective in folk medicine as an antidiarrheal treatment and against gastroenteritis in infants (Dhaouadi et al., 2014). In carob pods, the seeds are used for extracting galactomannan (Haddarah et al., 2013) and the pulp, rich in sugar, is used in the

---

<sup>1</sup> Corresponding author: [hajar-bahry91@outlook.com](mailto:hajar-bahry91@outlook.com)

preparation of sweet juice, cacao and as a chocolate substitute. In recent years, carob pods have gained considerable attention because of their high carbohydrate and mineral content: Many high value-added products, such as lactic acid, mannitol, citric acid, and pullulans were produced from carob fermentation (Germec et al., 2015).

In parallel, carob pods have been used as a resource for bioethanol production. As a matter of fact, the consumption of energy in the world is constantly increasing, which encourages to seek renewable and sustainable energy resources and to use environment-friendly production processes for replacing progressively fossil fuels. Bioethanol fuel is a biodegradable product, less toxic than methanol; its combustion leads to a decrease in carbon dioxide emissions and is associated with a lower risk of ozone formation than gasoline and diesel (Thangavelu et al., 2016). Thus, it constitutes an alternative low-cost attractive energy vector able to replace fossil fuels. The most efficient microorganisms for bioethanol production are *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* (Brethauer and Wyman, 2010), either using the fermentation of biomass rich in fermentable sugars, or from lignocellulosic biomass and polysaccharides which require several pretreatment steps of hydrolysis to obtain fermentable sugars. Submerged fermentation (SF) and solid-state fermentation (SSF) can both be used for ethanol production. SSF is defined as a fermentation process occurring in the absence or near absence of free water. Even though SF is the most widely used, SSF offers some advantages: no extraction step, low water requirements (which is particularly interesting when water is scarce), lower mechanical energy input, and reduced investment cost.

In Lebanon, carob pulp is mainly used for the preparation of carob syrup or carob molasses denoted "dibs", which is consumed by Lebanese population as a sweetener (Haddarah et al., 2013). The traditional method used by Lebanese industries involves a double maceration of carob pods cut into pieces in water at room temperature with a mass ratio of liquid to solid L/S=3, without agitation, for 3 hours. Then, water is evaporated to obtain the final molasses. Currently, this solid waste is not subject to any type of recovery, and only a fraction is used for animal feed. With such a traditional process, a significant amount of sugars remains in the solid waste after the maceration step.

Consequently, the objective of this work was to set up a biofuel production process from the carbohydrates remaining in the solid carob solid waste from dibs production, by producing second generation bioethanol. To our knowledge, research works concerning the valorization of waste from carob molasses production had never been conducted yet. First, the composition of the carob waste was characterized and compared to that of carobs pulp used initially in the dibs production process. Then, solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SF) using *Saccharomyces cerevisiae* were optimized and compared using design of experiments methodology. In SF, sugar extraction usually constitutes a costly pretreatment. For the carob waste, this was optimized by investigating the respective effects of pH, temperature, particle size, liquid to solid mass ratio and contact time. For SSF, both the fermentation parameters (cell density, temperature, humidity, particle size and operation time) and ethanol recovery were analyzed. Finally, the conclusions defined a

compromise between bioethanol productivity and yield, process simplicity and robustness, and environmental aspects.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Analysis of the composition of carob pulp and carob waste

In Lebanon, nine carob varieties are available; a mixture of these varieties was used to analyze the composition of the carob pulp. Carobs and waste (in the form of 5 mm pieces) were both obtained from the Lebanese industry *Salloum Ekhwan*. Both were dried (70°C, 24 h) and mechanically milled into fine particles using a Universal Machine UMC-5 (*Stephan Machinery GmbH*, Germany) equipped with knives (operating conditions: 500 g solid, 1500 rpm, 2.5 min). After sieving, the fraction of approximate size 0.5 mm was recovered for composition analysis.

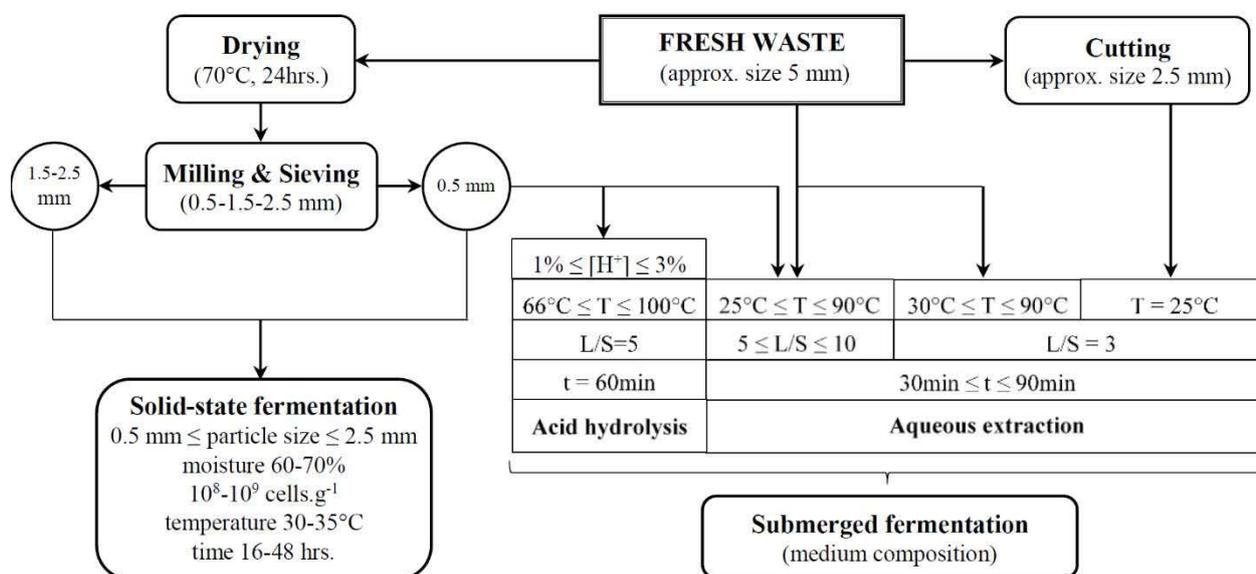
Lipids were extracted using chloroform, mixing 0.5 g of ground sample with 4 mL chloroform, 2 mL methanol and 1 mL distilled water. The mixture was vortexed, and then, centrifuged at 2000 *g* for 10 minutes. The lower phase was recovered and the solvent was evaporated in a vacuum concentrator at 40°C before weighing (Bligh and Dyer, 1959). Total sugars were determined using the colorimetric Dubois method with glucose as the standard (Dubois et al., 1956). Insoluble fiber content was analyzed using the method adapted from Pádua et al. (2004) and Pierre et al. (2011); this consisted, first, in digesting 4 g carob powder in a 5% HCl solution (200 mL) during 30 min. under reflux. After subsequent filtration and washing, a second digestion step was carried out on the residue in a 5% NaOH solution (200 mL) during 30 min. under reflux. Then, the mixture was filtered, neutralized, and washed with ethanol and ethyl ether. Finally, the residue was dried at 100°C for 2 hours, and the residual mass was considered the insoluble fiber content, which should mainly consist of cellulose. Moisture content was estimated by the measure of the mass loss of 5 g of carob powder heated at 105°C for 6 h., and the ash content using the AOAC 972.15 official method (AOAC. 2006). Total phenolic compounds were determined colorimetrically at 660 nm, and expressed as gallic acid equivalent (Singleton and Rossi, 1965). Total nitrogen was determined using the AOAC official method 945.46 (AOAC. 2007), which involved a Macro Kjeldahl unit for digestion and distillation.

### 2.2. Sugar extraction for submerged fermentation

#### 2.2.1. Acid hydrolysis and extraction on dried waste

Extraction and hydrolysis with sulfuric acid was applied to the 0.5 mm size fraction of the dried and milled carob waste, obtained as described in section 2.1. Experiments were carried out in a batch extraction device with total reflux under mechanical shaking during 1 hour. The acid solution to carob waste mass ratio L/S was 5. Runs were conducted as a function of temperature (66, 83 and 100°C) and acid concentration (1, 2 and 3% v/v), as summarized in Figure 3:1. Design of experiments methodology was applied. A full factorial design with two factors and three levels was used to measure the effect of these parameters on the amount of extracted sugar. Each treatment was replicated three times, and total sugars ( $R_t$ ) and reducing sugars ( $R_r$ ) were chosen as the dependent variables.

Total sugars were determined using the method of Dubois et al. (1959), and the reducing sugars were analyzed using the DNS method of Miller (1959).



**Figure 3:1.** Summary of the experimental conditions of this work for sugar extraction prior to submerged fermentation, and for solid-state fermentation.

### 2.2.2. Aqueous extraction on dried and fresh waste

Acid extraction requires further neutralization and is known to potentially produce fermentation inhibitors (Kuila, 2011). An alternative consists in reducing particle size for enhancing extraction at natural pH. However, the ability to reduce particle size depends on the moisture content in the waste. First, the fresh waste (approx. size 5 mm) could not be milled without forming a pasty medium. Thus, it could only be mechanically cut into pieces with an approximate size of 2.5 mm. Conversely, extraction could not be carried out at low L/S ratio with the waste dried at 70°C and mechanically milled as in section 2.1, as a swelling behavior could be observed during the aqueous extraction using the fine dried powder. To circumvent this issue, a minimum L/S ratio of 5 had to be used.

Consequently, extraction was performed, first, on milled dried waste (approx. size 0.5 mm), and then, as a reference for comparison purpose, on cut fresh waste from industry. Extraction was carried out in water at different conditions without pH adjustment, by changing the L/S ratio (5, 7.5 and 10), temperature (25, 58 and 90°C) and contact time (30, 60 and 90 min). Each experiment was replicated three times and a 3<sup>3-1</sup> fractional factorial design with replications was built. Each sample was filtered, then hydrolyzed in a 1 N HCl solution for 30 min at 90°C under reflux, and neutralized by 1 N NaOH before analysis to determine total sugar content ( $R_t$ ) as in section 2.2.1. In parallel, a

lower ratio  $L/S=3$  was only tested on the fresh waste (about 5 mm size), considering the influence of temperature and extraction time with the same levels as in the  $3^{3-1}$  fractional design.

Finally, to assess the influence of size reduction, extraction was studied at  $L/S=3$  on mechanically cut fresh waste, which lead to a size reduction from 5.0 to about 2.5 mm. Experiments were carried out only at room temperature as a function of extraction time (30, 60 and 90 min) with three replications. The experimental conditions of all the runs based on aqueous extraction are summarized in Figure 3:1.

### 2.3. Submerged fermentation

#### 2.3.1 Strain

The yeast was *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, supplied as a lyophilisate, taken in sterile water and spread onto YM agar-agar (Yeast Medium, Difco 0712-01-8), and incubated 48 hours at 28°C. The strain was then stored at 4°C and subcultured on a Petri dish 24 hour before being used in the bioreactor.

#### 2.3.2. Fermentation in liquid medium

Liquid-based fermentation was carried out in a 450-mL working volume bioreactor. Carob juice, obtained from the waste using one of the methods of sugar extraction described in section 2.2, was used first. This culture medium (UECW: unenriched carob waste) was considered as the control, leading to test its intrinsic capability to develop growth and fermentation without enrichment. The second culture medium tested was the carob juice (ECW: enriched carob waste) completed by all the elements of the medium described by Kristiansen (1994), except glucose. The fermentation media were sterilized at 120°C for 20 min, then inoculated with 3% (v/v) by a 24-hour preculture of the yeast, as in Turhan et al. (2010), and Izmirlioglu and Demirci (2012). Temperature was set to 30°C, the stirring speed to 200 rpm without aeration, the pH medium was maintained at 5 by automatic addition of 2 N NaOH because optimal pH for ethanol production is usually between 5 and 5.5, ethanol production being completely inhibited below 4 (Graves et al. 2006). Samples were collected every 2 hours in the first 16 hours of fermentation, and then every 8 hours during the remaining period. The broth was used for the assays of ethanol, residual sugars and biomass. Biomass was determined by spectrophotometry at 550 nm (JENWAY 6405 UV/Vis, France), and the absorbance was converted into biomass concentration using the following equation,

$X = 0.8487 + 2.0989 \cdot Y$ , where  $X$  is the biomass concentration (g-dry biomass/L) and  $Y$  is absorbance at 550 nm.

Ethanol and volatile fatty acids (VFA) were measured using an HPLC device. The apparatus (HPLC 1260 Infinity Quaternary LC system, from Agilent Technology, USA) was equipped with two ion exclusion columns connected in series (Rezex ROA 300×7.8 mm, Phenomenex, USA). The mobile phase was a 2 mM sulfuric acid solution, in ultrapure water (Millipore, MilliQmore), continuously

degassed, and flow rate was fixed at 0.7 mL/min. Ethanol was detected using a refractometer (HP 1100 series, Agilent Technologies, USA). Before analysis, samples were deproteinized to prevent clogging of the column. This was carried out as follows: 250  $\mu$ L of barium hydroxide solution ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; 0.3M) and 250  $\mu$ L of zinc sulphate solution ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5% w/v) were added to 2 mL of the sample, which caused the precipitation of proteins; after centrifugation for 5 minutes at 10,000 rpm, the supernatant was finally filtered using a cellulose acetate syringe filter (0.45  $\mu$ m). After hydrolysis in a 1 N HCl solution at 90°C for 30 min, and subsequent neutralization with a 1 N NaOH solution, total sugars were measured as in section 2.2. From these results, sugar utilization, ethanol yield and productivity were deduced.

### 2.4. Solid-state fermentation

SSF was carried out on dried waste (70°C, 24 hrs.). But contrary to section 2.1, carob particles used as the substrate in the experiments (Figure 3:1) were classified in three groups after sieving, with approximate size 0.5, 1.5 and 2.5 mm, respectively. Experiments were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks, containing 10 g carob waste supplemented with 1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  without sterilization. Then, initial moisture was adjusted to the desired value by adding water, and flasks were sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min. Initial pH was set at  $5.0 \pm 0.1$  in all conditions, and each experiment was replicated three times. First, a  $2^{5-3}$  screening design was used to determine the most influent factors among initial cells concentration (between  $10^8$  and  $10^9$  cells/(g substrate)), particle size (between 0.5 and 2.5 mm), incubation time (between 16 and 48 h), moisture (between 60 and 70%) and temperature (between 30 and 35°C). Moisture content was measured using an infrared balance. Then, response surface methodology (RSM) was used and a central composite design was defined, using a three-factor inscribed central composite design.

Fermented substrate was removed from flasks, mixed with 80 mL of distilled water, and mixed using a rotary shaker/incubator at 250 rpm for 30 minutes. The extract was, then, centrifuged at 4000 *g* for 10 minutes, and the sediment washed again with distilled water to recover the remaining ethanol. The two extracts were mixed and analyzed to estimate ethanol and residual sugar contents using the above-mentioned analytical techniques, from which sugar utilization, ethanol yield and productivity could be derived.

### 2.5. Statistical design and analysis

The free software environment *R* (R Core Team, 2016) was used for the creation and the analysis of experimental designs. These were analyzed using ANOVA and multiple comparison. Parameters with a *p*-value (*p*) of 0.05 or less were considered significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Composition of carob pulp and carob waste

The chemical composition of dry matter of carob pulp and carob waste is summarized and compared in Table 3:1. Composition of carob pulp and carob waste dry matter (%). In addition, it must be pointed out that moisture content on a wet basis was only 10±2% in carob pods, but reached between 40 and 50% in the fresh waste. The total sugar content of carob pulp is close to the range reported by Haddarah et al. (2013) for various types of carob pods. Table 3:1 confirms that the process used by the Lebanese industry extracts preferentially sugar species, does not change significantly protein, polyphenol fat and ash contents, and concentrates fiber, but particularly leads to the loss of a large amount of sugar in the solid waste from molasses preparation. In practice, half of initial total sugars remains in the waste in this process. Several reasons can explain this result. As expected the amount of sugar extracted increases with the liquid to waste mass ratio, L/S, at the expense of a decrease of sugar concentration (Turhan et al. 2010). Obviously, L/S=3 is a compromise aimed at maximizing sugar concentration for further concentration by vaporization. The other advantage of low L/S value is that the extract reaches equilibrium in a short time (Turhan et al. 2010), so that the contact time applied in the industry for the maceration step is only 3 hours. To improve sugar extraction, a first method would consist in increasing temperature, which could stimulate mass transfer of sugar molecules from feedstock by increasing molecular mobility. Hence, higher sugar content and a maximum recovery efficiency of 98% were achieved at 90°C with a contact time of 114 min by Appiah-Nkansah et al. (2016). However, this process is too energy-consuming because heating the mixture from room temperature to 90°C requires about 10 g purified ethanol per kg mixture. Another factor that could improve sugar extraction is agitation, because mixing is known to affect the rate of mass transfer from the external surface of the pod to the bulk, which corresponds to an external resistance to molecular diffusion (Rein, 2007). But this also requires mechanical energy input. As a conclusion, the “dibs” preparation process is a compromise mainly driven by economic factors, but that neglects the economic and environmental aspects of the valorization of the solid waste.

**Table 3:1.** Composition of carob pulp and carob waste dry matter (%).

	Sugar	Protein	Polyphenols	Insoluble fibers*	Fat	Ash	Others**
<b>Carob pulp</b>	64±4	4.0±0.4	9.2±0.8	6.4±0.1	1.32±0.03	3.0±0.9	12
<b>Carob waste</b>	44±3	4.2±0.3	12±2	12±3	1.80 ±0.06	2.86±0.04	23

\* mainly cellulose;

\*\*deduced from mass balance: including lignin and hemicellulose.

### 3.2 Sugar extraction from carob waste

#### 3.2.1. Simultaneous acid hydrolysis and extraction of sugar from carob waste

The results of the nine treatments (27 runs with the replications) of the two-factor experimental levels with three levels per factor are summarized in Table 3:2. Acid hydrolysis and extraction experiments on milled dried waste as a function of acid concentration and temperature (1 h contact time, L/S=5, particle size: 0.5 mm).. The recovery efficiency of reducing sugars,  $R_r$ , and total sugars

$R_t$ , were statistically identical in the same extraction conditions. This confirms the assumption of partial hydrolysis of dissolved sucrose by the acid into reducing sugars, *i.e.* glucose and fructose. These results are consistent with those reported by Sánchez et al. (2010). Even though the evolution of  $R_r$  and  $R_t$  seem weak as a function of the factors and recovery never exceeded 62%, three homogeneous subsets were distinguished using Tukey's test in Table 3:2, which proves a dependence on the factors. Factorial ANOVA on  $R_t$  (linear model with second-order interaction:  $p < 10^{-2}$ ) showed that the effects of temperature,  $T$  ( $p < 10^{-2}$ ), and acid concentration,  $C$  ( $p < 0.05$ ) were significant). The same conclusion was made for  $T^2$  ( $p < 0.05$ ), but  $C^2$  and the interaction  $C \times T$  were not significant ( $p > 0.05$ ). Similar results were obviously found for  $R_r$ , as both homogeneous subsets and a statistical comparison between  $R_r$  and  $R_t$  based on the Kolmogorov-Smirnov test showed that these were not statistically different ( $p > 0.05$ ). As expected, temperature enhanced extraction efficiency, but increasing acid concentration reduced extraction. This last result is not surprising, as acid degradation is known to lead to the loss of carbohydrates and may generate some inhibitors (Kuila, 2011). As a conclusion, carob waste still includes an important fraction of sugar that can be extracted and used for second-generation bioethanol production.

**Table 3:2.** Acid hydrolysis and extraction experiments on milled dried waste as a function of acid concentration and temperature (1 h contact time, L/S=5, particle size: 0.5 mm).

Run	$C_a$ (% v/v)	$T$ (°C)	$R_t$ (% w/w)	$R_r$ (% w/w)
1	1	66	59±1 <sup>a,b</sup>	58±1 <sup>a</sup>
2	1	83	61±1 <sup>c</sup>	61±2 <sup>c</sup>
3	1	100	61±2 <sup>c</sup>	61±2 <sup>a,c</sup>
4	2	66	58±1 <sup>a</sup>	58±1 <sup>a</sup>
5	2	83	60±2 <sup>b,c</sup>	60±2 <sup>b,c</sup>
6	2	100	60.6±0.6 <sup>c</sup>	60.0±0.4 <sup>b,c</sup>
7	3	66	58±2 <sup>a</sup>	58±2 <sup>a</sup>
8	3	83	60±2 <sup>b,c</sup>	60±2 <sup>a,b</sup>
9	3	100	60±3 <sup>b,c</sup>	60±3 <sup>b,c</sup>

$C_a$ : sulphuric acid concentration;  $T$ : temperature;  $R_r$ : recovery efficiency of reducing sugars;  $R_t$ : recovery efficiency of total sugars. <sup>a,b,c</sup>In the table, means that do not share superscripts differ significantly according to Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.2. Aqueous extraction of sugar from carob waste

In practice, sugar extraction without any enzymatic, physical or chemical treatment is more advantageous from an economic and an environmental point of view. Aqueous extraction was investigated on the fresh waste and on the milled dried waste for comparison purpose. The results of the  $3^{3-1}$  factorial design are summarized in Table 3:3. Comparison between aqueous extraction of milled dried waste and of fresh waste as a function of temperature, time and L/S ratio (particle size: 0.5 mm).. In this table, homogeneous subsets have been identified within columns because statistical comparison between  $C_p$  and  $C_f$ ,  $R_{tp}$  and  $R_{tf}$  based on the Kolmogorov-Smirnov test showed that these were not statistically different ( $p = 0.008$  and  $p = 0.002$ , respectively). Factorial ANOVA based only on the effects of the main factors is summarized by the Pareto charts of the standardized effects of the

experimental design in Figure 3:2. In this figure,  $p$ -values of the effects and the estimation of cumulated effects were added. Statistical analysis shows that for the waste powder of 0.5 mm particle size, only the L/S ratio had a significant effect on the concentration of sugar extracted and on sugar recovery, which can be attributed to the fine particle size that facilitated the internal diffusion of sugar in the carob particles. As expected, high L/S improved recovery, but decreased sugar concentration in the extracts. In Table 3:3., the consequence is that  $R_{tp}$  did not change significantly as a function of time and temperature. The reason is that the characteristic time of the internal diffusion process is more rapid than the minimum extraction time, whatever the temperature in this case. A rapid comparison with Table 3:2. Acid hydrolysis and extraction experiments on milled dried waste as a function of acid concentration and temperature (1 h contact time, L/S=5, particle size: 0.5 mm). with the same powder size highlights that at similar ratio L/S=5 and temperature, the recovery efficiency  $R_t$  of aqueous extraction at natural pH is close to or even higher than with acid addition. This highlights that acid addition can be avoided.

**Table 3:3.** Comparison between aqueous extraction of milled dried waste and of fresh waste as a function of temperature, time and L/S ratio (particle size: 0.5 mm).

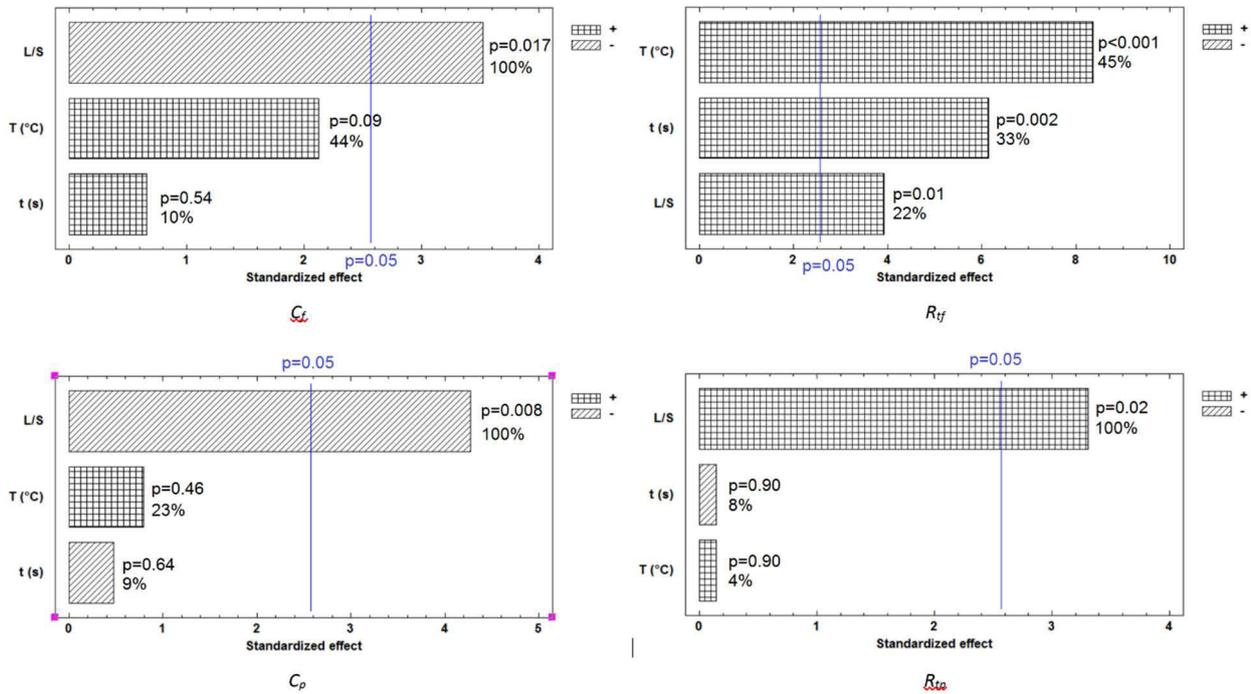
Run	T (°C)	Time $t$ (h)	L/S	$C_f$ (g/L)	$R_{tf}$ (%)	$C_p$ (g/L)	$R_{tp}$ (%)
1	25	0.5	5	26.0±0.9 <sup>a</sup>	27.0±0.9	78±2	52±1
2	25	1.0	10	23±1 <sup>b</sup>	41±2	41±1 <sup>a</sup>	92±1
3	25	1.5	7.5	27±2 <sup>a</sup>	47±3 <sup>a</sup>	45±1	76±1 <sup>a,b</sup>
4	58	0.5	10	25±1 <sup>a,b</sup>	47±2 <sup>a</sup>	41±2 <sup>a</sup>	90±2
5	58	1.0	7.5	32.0±0.9	47±2 <sup>a</sup>	57±1	75±1 <sup>a</sup>
6	58	1.5	5	42.1±0.4	51±1 <sup>b</sup>	65±2	66±3
7	90	0.5	7.5	33±2	51±1 <sup>b</sup>	53±2 <sup>b</sup>	78±2 <sup>b</sup>
8	90	1.0	5	46±1	50±2 <sup>a,b</sup>	73±2	70±2 <sup>a</sup>
9	90	1.5	10	23±1 <sup>b</sup>	63±1	53±1 <sup>b</sup>	75±1

T: temperature,  $C_f$ : concentration of sugar obtained with fresh waste,  $R_{tf}$ : recovery efficiency of sugar extraction with fresh waste,  $C_p$ : concentration of sugar obtained with milled dried waste,  $R_p$ : recovery efficiency of sugar extraction with milled dried waste. The same superscript letter within columns indicates homogeneous subset.

Conversely, for the 5-mm size fresh waste, statistical analysis in Figure 3:2 shows that L/S, temperature and contact time had all significant positive effects on sugar recovery efficiency,  $R_{tf}$ , and that temperature became the most influent parameter on  $R_{tf}$  with the fresh waste, which highlights the role of internal mass transfer phenomena and, therefore, of particle size. As expected, contact time and temperature increased recovery efficiency (Turhan et al., 2010), but contrary to the waste dried powder, this also means that equilibrium had not been achieved with the fresh waste and that longer contact times were necessary. But on  $C_f$  as on  $C_p$ , only the L/S ratio was influential and had a negative effect, as also observed by Turhan et al. (2010) on carob pods.

From Table 3:3, a comparison between 5-mm size fresh waste and 0.5 mm powder can also be established. In practice,  $C_f$  was always significantly smaller than  $C_p$ , and  $R_{tf}$  smaller than  $R_{tp}$  under the same extractions conditions. As a conclusion, particle size ( $e$ ) seems to be a key parameter, as

internal diffusion is governed by the Fourier dimensionless number, which states that the extraction performance increases when the ratio  $\sqrt{t}/e$  increases (Varzakas, 2015).



**Figure 3:2.** Pareto charts of the standardized effects and p-values from ANOVA of temperature (T), time (t) and L/S ratio on ethanol concentration and sugar recovery in the fresh waste ( $C_f$  and  $R_{tf}$ , respectively) and in the carob milled dried powder ( $C_p$  and  $R_{tp}$ , respectively). The percentage corresponding to the cumulative effects is displayed together with the p-value of each effect.

Finally, these results indicate that the use of acid addition and high temperature may be circumvented by decreasing L/S and particle size, while increasing contact time. Similarly, avoiding the drying step is also a key objective, even though this implies that fermentation must be carried out rapidly after “dibs” preparation. In addition, for fermentation purpose, it must be reminded that the objective is also to maximize sugar concentration in the extract. Thus, the experimental results obtained with L/S=3 (experiments possible only with fresh waste, approx. 5 mm size) are reported in Table 3:4. Comparison of sugar concentration after aqueous extraction on fresh waste,  $C_c$ , and on mechanically cut fresh waste,  $C_{fc}$ , as a function and temperature and contact time (L/S=3). (sugar concentration  $C_c$ ). The presence of several homogeneous subsets highlights the effects of the main factors. At constant L/S ratio, sugar concentration and recovery efficiency proportional, so that only concentrations are reported. As in Table 3:3 for higher L/S ratios, time and temperature are significant parameters ( $p < 0.001$ ) on sugar concentration in the extract in Table 3:4. For example, sugar concentration was multiplied by 1.4 when temperature was risen from 25°C to 90°C; the order of magnitude of the sugar concentrations was 65 g/L at 90°C for 90 min in Table 3:4, while this fell

about 50 g/L at ambient temperature for the same contact time. This concentration depended also on the extraction time at room temperature and 58°C ( $p < 0.05$ ), while time did not exert any significant effect at 90°C ( $p > 0.05$ ). These results corroborate that extraction is a kinetically-controlled mass transfer process in which equilibrium is achieved in less than 90 min at high temperature. They also agree with those found by Karkacier et al. (1995) and Turhan et al. (2006) on carob pods. For example, Turhan et al. (2010) achieved a maximum of 115 g sugar/L with L/S=4 and T=80°C after 2 hours with carob pods. Considering that sugar content in carob pods has been halved by the “dibs” preparation process and that the most extractable fraction has already been removed, achieving concentrations between 50 and 65 g/L using carob waste is in line with these results when L/S=3.

**Table 3:4.** Comparison of sugar concentration after aqueous extraction on fresh waste,  $C_c$ , and on mechanically cut fresh waste,  $C_{fc}$ , as a function and temperature and contact time (L/S=3).

Time $t$ (h)	$C_c$ (g/L)			$C_{fc}$ (g/L)
	T=25°C	T=58°C	T=90°C	T=25°C
0.5	38±1	49±1 <sup>a</sup>	57±3 <sup>b,c</sup>	50±3 <sup>a</sup>
1.0	45±2	55.0±0.5 <sup>c</sup>	64±2 <sup>d</sup>	58±3 <sup>b,c</sup>
1.5	50±2 <sup>a</sup>	59±2 <sup>c</sup>	65±3 <sup>d</sup>	66±3 <sup>d</sup>

The same superscript letter within the table indicates homogeneous subset (Tukey’s test).

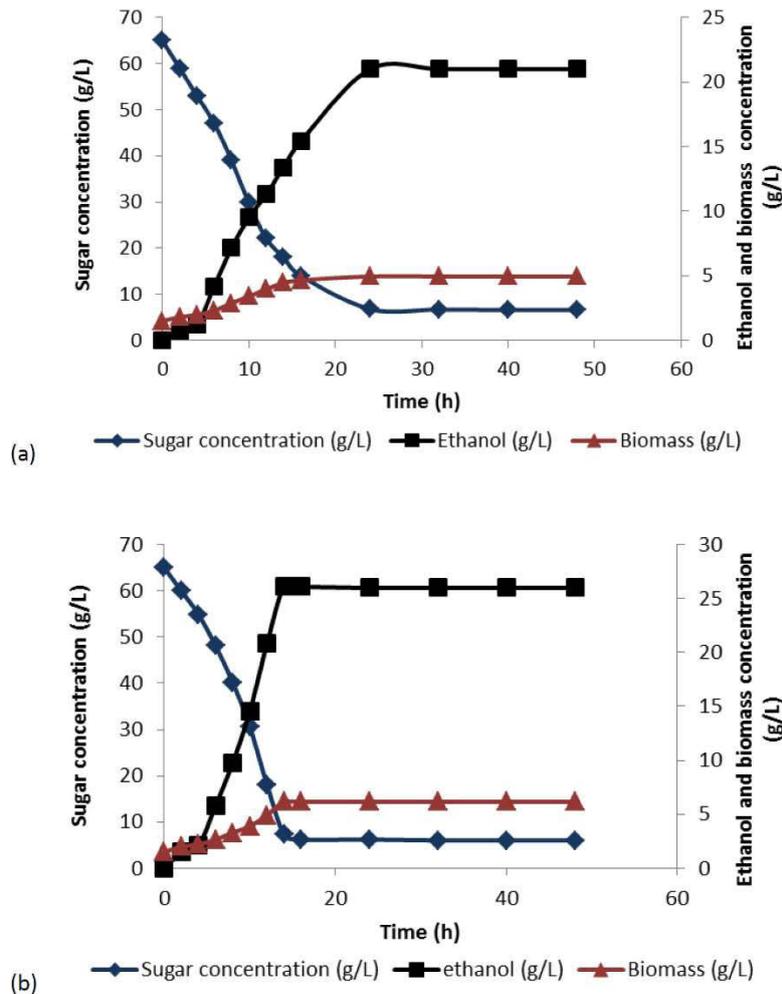
Considering the expensive cost of extraction, sugar extraction tests were carried out, maintaining the same L/S=3 at room temperature (T=25°C) and contact time values as above (between 30 and 90 min), but reducing waste size from 5 mm to 2.5 mm (Figure 3:1). In Table 3:4, the results show that there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between sugar concentration ( $C_c$ ) at 90°C after 90 min extraction with the fresh waste and the mechanically cut fresh waste ( $C_{fc}$ ) at ambient temperature after 90 min extraction (about 65-66 g/L), as these belong to the same homogeneous subset. Conversely, the mechanical treatment had significantly increased sugar concentration at room temperature. This highlights that an inexpensive particle size reduction from 5 to 2.5 mm is able to enhance sugar recovery and to avoid heating.

### 3.2.3. Definition of extraction conditions

The objective was to define acceptable conditions of sugar extraction for subsequent SF. The comparison of the experimental results of sections 3.2.1 and 3.2.2 highlights that acid addition was not necessary and that an inexpensive coarse grinding process that reduced fresh waste size to an approximate size of 2.5 mm could achieve similar recovery efficiencies as with the extraction of finely grounded dried waste at 90°C. This avoids expensive heating and fine grinding processes. In addition, a low L/S ratio reduces water demand and the need for subsequent wastewater treatment; it also increases ethanol concentration in the extracts, which reduces energy requirements for water-ethanol distillation. Considering these statements, the last conditions of section 3.2.2 (fine fresh waste, L/S=3, room temperature, 90 min) were selected to extract sugars from the carob waste, to produce the carob juice used in submerged fermentation assays.

### 3.3 Submerged fermentation

Submerged fermentation was conducted with the extracts and *S. cerevisiae*, as defined in section 3.2.3, in the unenriched (UECW) and the enriched (ECW) media. Typical results of batch fermentation assays in both media are presented in Figure 3:3.



**Figure 3:3.** Evolution of ethanol, biomass and sugar concentrations in the submerged fermentation broth with unenriched (a: UECW) and enriched (b: ECW) carob waste extracts.

The concentration of ethanol ( $P$ ) produced in ECW at 14 h was determined to be dramatically higher than in UECW ( $p < 0.05$ ). However, it is interesting to keep in mind that the unenriched basic carob juice extracted from carob waste provides the necessary components to undergo yeast fermentation. The advantages of the ECW medium can be summarized as follows. On the one hand, the maximum production rate,  $Q_p$ , in the ECW medium was  $1.84 \pm 0.2$  g ethanol/L/h, while the value was only  $0.9 \pm 0.2$  g ethanol/L/h in the UECW medium. The same conclusion can be drawn for final ethanol and biomass concentrations,  $P$  and  $X$ :  $P = 26.1 \pm 0.7$  g/L and  $X = 6.1 \pm 0.2$  g biomass/L, and  $P = 21 \pm 2$

g/L and  $X=4.9\pm 0.1$  g/L in ECW and UECW media, respectively; likewise, ethanol yield,  $Y_{P/S}$ , reached  $44.9\pm 0.9$  g/100 g and  $36\pm 3$  g/100 g in ECW and UECW, respectively. On the other hand, the fermentation time was determined to be 14 h and 24 h in ECW and UECW media, respectively. So, all kinetic parameters of the fermentation  $Y_{P/S}$ ,  $X$ ,  $P$ , and  $Q_P$  demonstrate the need to enrich the fermentation medium by components required for yeast growth, such as a source of phosphorus ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), nitrogen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and various salts and vitamins. In addition, the ECW medium was also shown to reduce the variability of the kinetic parameters. However, it must be pointed out that sugar utilization did not significantly differ:  $90.5\pm 0.5\%$  and  $90\pm 1\%$  in ECW and UECW, respectively.

For comparison, purpose, SSF process was tested on carob pods using *Zymomonas mobilis*, leading to a maximum ethanol yield of 0.30 g ethanol/g initial sugar (Mazaheri et al., 2012), but also on mahula flowers (Mohanty et al., 2008), sweet sorghum (Yu et al., 2008), and arrowroot, grape and sugar beet pomaces (Rodríguez et al., 2010). In parallel, a careful review of the literature also indicates that carob pulp can be used as a feedstock for ethanol submerged fermentation with free or immobilized cells. A comparison with the literature using carob pods as the substrate is presented in Table 3:5. Comparison of kinetic data from SF and SSF from this work on carob waste with literature data on carob pods. and shows that the fermentation of carob waste presents a performance similar to carob pods. For example, with locust bean fermented by immobilized *S. cerevisiae* cells in mineral kissiris, 64.5 g/L ethanol concentration was obtained from 250 g sugar/L, which corresponds to 28.3 g/ 100 g yield (Roukas, 1994). In another work, a maximum ethanol yield of 0.34 g/g sugar was obtained at 30°C, initial pH 5.2, and 80 rpm within 36 h using *Z. mobilis* in carob pod extracts (Vaheed et al., 2011). Germec et al. (2015) compared ethanol production from enriched and unenriched carob pod extracts with *S. cerevisiae* in a biofilm reactor: with enrichment, sugar consumption,  $P$  and  $Y_{P-S}$  were determined to be 87.3%, 24.5 g/L and 48.6 g/100 g; without enrichment, they were only 86.8%, 19.2 g/L, 35.4 g/100 g in their work, although carob pods were used. Similarly, Ercan et al. (2013) investigated ethanol production with and without pH control, without enrichment using immobilized *S. cerevisiae* in alginate beads. Optimum condition for the fermentation of sugars extracted from carob pulp by *S. cerevisiae* immobilized in calcium alginate beads were 150 rpm agitation speed, 5% yeast cells entrapped in beads and pH 5.5. Kinetic parameters were  $Y_{P/S}=46.3$  g/100 g and  $Q_P=3.2$  g/L/h, while sugar utilization and ethanol concentration were 90.7% and 40.1 g/L, respectively. Also, Turhan et al. (2010) carried out ethanol fermentation from carob pod extracts using free cells and measured  $P$ ,  $Q_P$  and  $Y_{P/S}$  at 42.6 g/L, 3.37 g/L/h and 44.5 g/100 g under controlled pH conditions, which outperformed uncontrolled conditions. Considering that the half of the sugar content of the carob pods had been already extracted in the preparation of “dibs”,  $P=26.1\pm 0.7$  g/L agrees with the data from Turhan et al. (2010) and Ercan et al. (2013) which are based on the fermentation of a 115 g/L extract.

As a conclusion, extracts from carob waste seem to behave as those from carob pulp in terms of SF: similar ethanol yields are achieved, but the enrichment of the medium seems necessary.

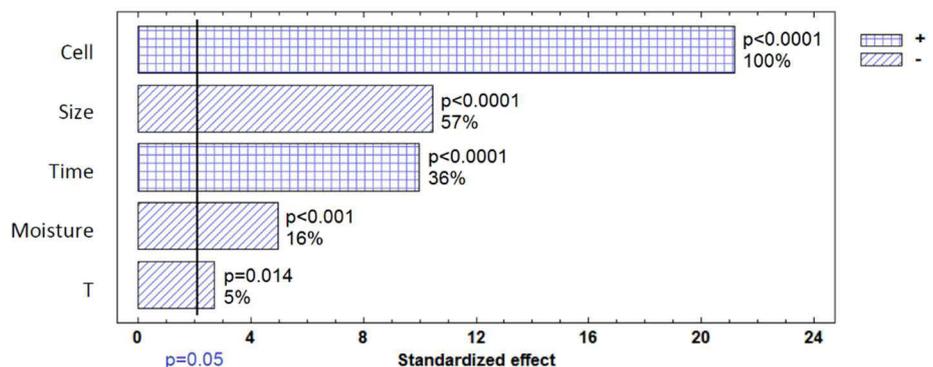
**Table 3:5.** Comparison of kinetic data from SF and SSF from this work on carob waste with literature data on carob pods.

Kinetic parameters	Submerged fermentation (SF)								Solid state fermentation (SSF)		
	<i>This work (waste)</i>		Germec et al. (2015)		Ercan et al. (2012)		Turhan et al. (2010)		<i>This work (waste)</i>	Roukas (1993)	Mazaheri et al. (2012)
	ECW	UECW	ECW	UECW	ECW	UECW	ECW	UECW			
Yield (g/100g consumed sugar)	45.0	35.9	48.6	35.4	46.3	45.1	44.50	36.28	45.8	40	43
Sugar utilization (%)	90.0	89.5	87.3	86.8	90.7	90.4	81	81.83	75	80	67
Productivity (g/kg/h)	5.57	2.65	*	*	*	*	*	*	4.3	6.7	3.72
Ethanol (g/kg)	78	63	*	*	*	*	*	*	155	160	156
Ethanol (g/L)	26.1	21.1	24.5	19.2	40.1	47.15	42.60	34.24	-	-	-

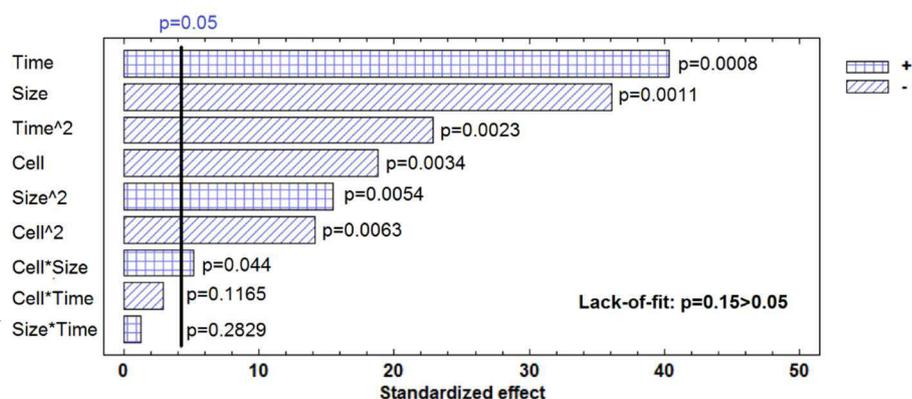
UECW: unenriched culture medium; ECW: enriched culture medium; \* data not available; - not defined.

### 3.4. Solid-state fermentation

For SSF, the five-factor screening design is considered using ethanol yield  $Y_{P/S}$  as the response (Table 3:6). The objective is to define the three parameters to retain for further optimization of SSF through RSM. Statistical analysis shows that the model is significant ( $p < 0.05$ ), with  $R^2 = 0.97$ . From Figure 3:4a in which the  $p$ -values of the effects from ANOVA have been added, it emerges that all parameters were statistically significant, but that temperature played only a secondary role, while moisture exhibited the most influential effect. Initial moisture and fermentation time enhanced fermentation, while this was favored by a decrease of particle size and initial cell concentration. Besides, the very strong influence of moisture compared to other parameters led us to conclude that only the highest level of humidity (70%) could be considered optimum. This result agrees with the literature. For example, Kargi et al. (1985) reported maximum ethanol production obtained from sweet sorghum at a moisture level of 70%, and Roukas (1993) found that 70% was the optimal moisture to produce ethanol from carob pods using solid fermentation with *S. cerevisiae*. The decrease in the production of ethanol due to the decrease in moisture could be due to the lower water activity level associated with a low moisture content in the waste (Kargi et al. 1985). The conclusions are, therefore, that the effect of temperature can be disregarded, while moisture must be controlled and fixed at 70%. Finally, for SSF optimization, three factors were selected: initial cell concentration, particle size, and fermentation time.



(a)



(b)

**Figure 3:4.** Evolution Solid-state fermentation. Pareto charts derived from ANOVA of the standardized effects with the p-value of each effect of the five-factor screening design (a) and of the three-factor central composite design (b). In (a), the percentage corresponding to the cumulative effects is also reported.

These factors were used in the three-factor inscribed central composite design and RSM was applied. Figure 3:4b shows that all the main factors are statistically significant from the p-values of ANOVA; the same stands for the squared terms, but some of the interaction terms are not significant. Noting A, B and C, the normalized values between -1 and 1 of initial cell concentration, particle size (e) and time (t), respectively, only the predictors A (p < 0.01), B (p < 0.001), C (p < 0.001), A<sup>2</sup> (p < 0.01), B<sup>2</sup> (p < 0.01), C<sup>2</sup> (p < 0.01), and the interaction term AB (p < 0.05) were considered significant. Dropping the insignificant predictors, the final equation of the model was:

$$Y_{P/S} = 0.28 - 0.015 \times A - 0.029 \times B + 0.032 \times C - 0.022 \times A^2 + 0.0046 \times AB + 0.023 \times B^2 - 0.035 \times C^2$$

**Table 3:6.** Summary of the results of the screening and the central composite designs for ethanol production using SSF (g.g<sup>-1</sup> initial sugar).

Screening design						
Run	Cells/g	e (mm)	t (h)	Moisture (%)	T (°C)	g ethanol/g sugar
1	10 <sup>8</sup>	0.5	16	70	35	0.26±0.03
2	10 <sup>9</sup>	0.5	16	60	30	0.11±0.02
3	10 <sup>8</sup>	2.5	16	60	35	0.07±0.06
4	10 <sup>9</sup>	2.5	16	70	30	0.19±0.06
5	10 <sup>8</sup>	0.5	48	70	30	0.32±0.09
6	10 <sup>9</sup>	0.5	48	60	35	0.17±0.05
7	10 <sup>8</sup>	2.5	48	60	30	0.15±0.04
8	10 <sup>9</sup>	2.5	48	70	35	0.21±0.07
Optimization design						
Run	Cells/g	e (mm)	t (h)	Moisture (%)	T (°C)	
1	10 <sup>8</sup>	0.5	16	70	30	0.265
2	10 <sup>9</sup>	2.5	16	70	30	0.18
3	10 <sup>8</sup>	0.5	48	70	30	0.33
4	10 <sup>9</sup>	2.5	48	70	30	0.24
5	5.5×10 <sup>8</sup>	0.5	32	70	30	0.34
6	5.5×10 <sup>8</sup>	2.5	32	70	30	0.27
7	5.5×10 <sup>8</sup>	1.5	16	70	30	0.21
8	5.5×10 <sup>8</sup>	1.5	48	70	30	0.28
9	10 <sup>8</sup>	1.5	32	70	30	0.27
10	10 <sup>9</sup>	1.5	32	70	30	0.25
11	5.5×10 <sup>8</sup>	1.5	32	70	30	0.285
12	5.5×10 <sup>8</sup>	1.5	32	70	30	0.28
13	5.5×10 <sup>8</sup>	1.5	32	60	30	0.283
14	10 <sup>9</sup>	0.5	16	60	30	0.227
15	10 <sup>8</sup>	2.5	16	60	30	0.20
16	10 <sup>9</sup>	0.5	48	60	30	0.28
17	10 <sup>8</sup>	2.5	48	60	30	0.27

Factors: Initial cells concentration (cells/ g carob), particle size of carob waste e (mm), fermentation time t (h), moisture (%) and temperature T (°C).

Statistical analysis showed that this reduced model is significant ( $R^2=0.98$ ;  $p<0.01$ ), as well as all the predictors ( $p<0.005$ ). The optimum conditions determined from this equation for maximum ethanol production were 0.5 mm size,  $3.2 \times 10^8$  cells/g carob, and fermentation time 39 h. The predicted ethanol yield under these conditions was 0.346 g ethanol/g initial sugar.

An experimental test conducted in these optimum conditions gave an experimental yield value of  $0.34 \pm 0.01$  g ethanol/g initial sugar, which demonstrates the robustness of the model. This culture is presented in Figure 3:5. The maximum ethanol production occurred at about 40 h, in agreement with the time predicted by the experimental design; but after 36 hours, the increase in ethanol concentration was negligible, which means that fermentation time could be reduced to 36 h. In this case, sugar utilization was about 75%, the maximum yield was 45 g/100 g consumed sugar, and thus, in a 36-h fermentation time, the productivity of the SSF process was 4.3 g/(kg waste)/h, while ethanol production was 155 g/(kg waste). A comparison with literature data shows that Roukas (1993)

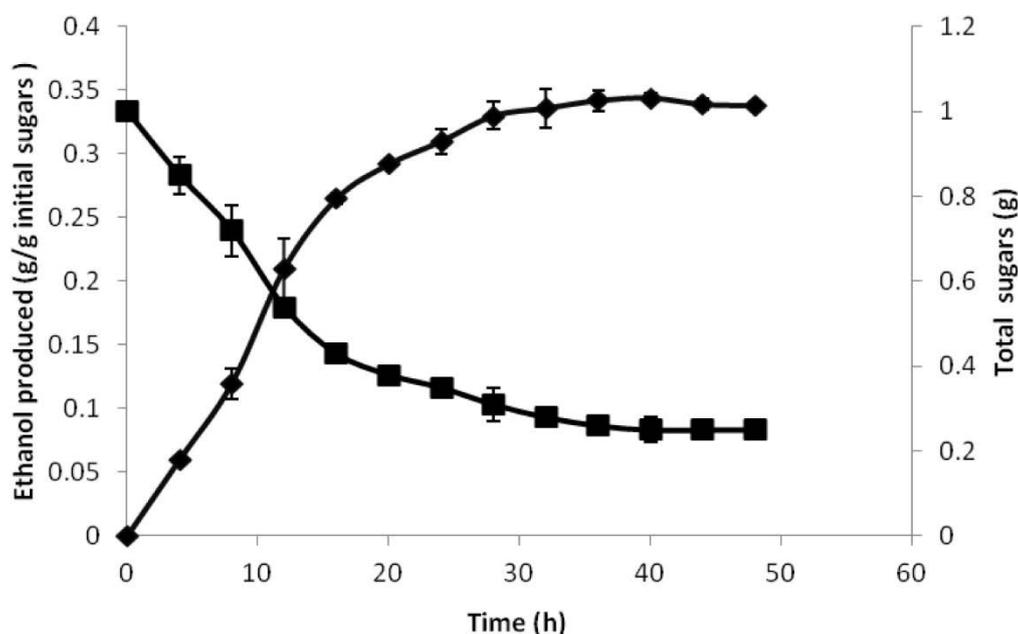
found maximum ethanol concentration ( $160 \pm 3$  g/kg dry pods), ethanol productivity ( $6.7 \pm 0.2$  g/kg/h), ethanol yield ( $40 \pm 2$  g/100 g consumed sugar), obtained when *S. cerevisiae* was grown on carob pods after 48-hour fermentation. Mohanty et al. (2008) studied the production of ethanol from mahula flowers: maximum ethanol concentration ( $225.0 \pm 4.0$  g/kg flower), ethanol productivity ( $3.13$  g/kg flower/h), and ethanol yield ( $58.4$  g/100 g consumed sugar) obtained after 72-hour fermentation. Mazaheri et al. (2012) investigated the production of ethanol from carob by solid fermentation using *Zymomonas mobilis*; they reported 43 g/ 100 g yield in 43-hour fermentation time, and the productivity of the SSF process was  $3.72$  g/(kg carob)/h. Similarly, Sree et al. (1999) reported highest ethanol concentration of 50 g/kg substrate (sweet sorghum and sweet potato) in SSF using *S. cerevisiae*. There are some possible reasons for these differences, including the strain used and the biochemical composition of the substrate, but our results on carob waste are close to those of Roukas (1993) in terms of ethanol production, despite the lower sugar content of the waste. This highlights the very good ability of carob waste to undergo SSF.

### 3.5. Definition of the final process

The kinetic properties of both types of cultures (SF and SSF) are summarized in Table 3:5. This demonstrates the potential of carob solid waste from Lebanese carob syrup (dibs) as a feedstock for second generation bioethanol production. Data shows a similar ethanol yield value in both cases. However, the overall efficiency of ethanol production based on the waste was significantly lower in the case of liquid fermentation because of the 66% efficiency of the extraction pretreatment. Thus, the solid waste used in solid state fermentation was richer in sugars. In addition, coarse grinding processes and operating temperatures were identical, water consumption was far lower with SSF, as well as the need for further wastewater treatment and smart fed batch strategies for low-cost mixing and ethanol recovery are available (Moukamnerd et al., 2010). Nevertheless, the initial moisture content of the waste was about 50% and the control of moisture content in SSF remains more difficult to control than in SF. However, in the “dibs” Lebanese industry which is not used to operating submerged fermentation, SSF appears simpler and more cost-effective.

## 4. Conclusions

The results finally show that carob solid waste from Lebanese carob syrup (dibs) constitutes an attractive feedstock for second-generation bioethanol production. The comparison of submerged and solid-state fermentation processes using *S. cerevisiae* displays that SSF maintained yield and productivity ( $0.458$  g ethanol/g consumed sugar and  $4.3$  g/(kg waste)/h) in comparison to SF ( $0.450$  g ethanol/g consumed sugar and  $5.57$  g/(kg waste)/h), and was able to achieve ethanol production up to  $155$  g/(kg waste) at low water demand, while SF was limited to  $78$  g/(kg waste) by the extraction process.



**Figure 3:5.** Solid-state fermentation. Evolution of ethanol yield (◆) and total sugars (■) in optimum conditions.

### Acknowledgement

This study was supported by the Lebanese University and Institut Pascal. The authors also thank Dr. Tania Yehya for her help.

### References

- Appiah-Nkansah, N. B., Zhang, K., Rooney, W., Wang, D. (2016). Model study on extraction of fermentable sugars and nonstructural carbohydrate from sweet sorghum using diffusion process. *Ind. Crop. Prod.*, 83, 654-662.
- AOAC (2006). *Official methods of Analysis of AOAC International* Gaithersburg. Maryland. AOAC 2006, 31: 93 1.04, 972.15.
- AOAC (2007). *Official methods of Analysis of AOAC International* Gaithersburg. Maryland. AOAC 2007, 2: 9 55.04 ,33: 990.19, 945.46
- Bligh L. G., Dyer, A. J., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem.*, 37, 911-917.
- Brethauer, S., Wyman, C. E. (2010). Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Biores. Technol.*, 101(13), 4862-4874.

- Dhaouadi, K., Belkhir, M., Akinocho, I., Raboudi, F., Pamies, D., Barrajon, E., Fattouch, S. (2014). Sucrose supplementation during traditional carob syrup processing affected its chemical characteristics and biological activities. *LWT-Food Sci. Technol.*, 57(1), 1-8.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. T., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28(3), 350-356.
- Ercan, Y., Irfan, T., Mustafa, K. (2013). Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Biores. Technol.*, 135, 365-371.
- Germec, M., Turhan, I., Karhan, M., Demirci, A. (2015). Ethanol production via repeated-batch fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor. *Fuel*, 161, 304-311.
- Graves, T., Narendranath, N. V., Dawson, K., Power, R. (2006). Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 33(6), 469-474.
- Haddarah, A., Ismail, A., Bassal, A., Hamieh, T., Ioannou, I., Ghoul, M. (2013). Morphological and chemical variability of Lebanese carob varieties. *ESJ*, 9 (18) 353-369.
- Izmirlioglu, G., & Demirci, A. (2012). Ethanol production from waste potato mash by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sci.*, 2(4), 738-753.
- Kargi, F., Curme, J. A., Sheehan, J. J. (1985). Solid-state fermentation of sweet sorghum to ethanol. *Biotech. Bioeng.*, 27 (1), 34-40.
- Karkacier, M., Certel, M., Artik, N. (1996). The conditions for carob (*Ceratonia siliqua L.*) extraction and the clarification of the extract. *Fruit Process.*, 12, 394-39.
- Kristiansen B. (1994). Integrated design of a fermentation plant – the production of baker's yeast. VCH, Weinheim.
- Kuila, A., Singh, A., Mukhopadhyay, M., Banerjee, R. (2011). Process optimization for aqueous extraction of reducing sugar from cashew apple bagasse: a potential, low cost substrate. *LWT-Food Sci. Technol.*, 44(1), 62-66.
- Laluce, C., Tognolli, J. O., De Oliveira, K. F., Souza, C. S., Morais, M. R. (2009). Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. *Appl. Microbiol. Biot.*, 83(4), 627-637.
- Mazaheri, D., Shojaosadati, S. A., Mousavi, S. M., Hejazi, P., Saharkhiz, S. (2012). Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Appl. Energ.*, 99, 372-378.

- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31(3), 426-428.
- Mohanty, S. K., Behera, S., Swain, M. R., Ray, R. C. (2008). Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. *Appl. Energ.*, 86(5), 640-644.
- Moukamnerd, C., Kino-Oka, M., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., Harashima, S., Noda, H., Ninomiya, K., Shioya, S., Katakura, Y. (2010). Ethanol production from biomass by repetitive solid-state fed-batch fermentation with continuous recovery of ethanol. *Appl. Microbiol. Biot.*, 88, 87-94.
- Pádua, M. D., Fontoura, P. S. G., Mathias, A. L. (2004). Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). *Braz. Arch. Boil. Techn.*, 47(1), 49-55.
- Pierre, G., Sannier, F., Goude, R., Nouviaire, A., Maache-Rezzoug, Z., Rezzoug, S.-A., Maugard, T. (2011). Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. *J. Cereal Sci.*, 54(3), 305-310.
- R Core Team (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org>.
- Race D., Curtis A., Booth W. (1999). Carob agroforestry industry: an assessment of its potential for the low-medium rainfall Murray Valley region. *Austr. J. Exp. Agric.*, 39, 325-334.
- Rein, P. (2007). Cane Sugar Engineering. Verlag Dr. Albert Bartens KG, Berlin. ISBN 978-3-87040-110-8.
- Rodríguez, L. A., Toro, M. E., Vazquez, F., Correa-Daneri, M. L., Gouiric, S. C., Vallejo, M. D. (2010). Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 35(11), 5914-5917.
- Roukas, T. (1993). Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production. *Appl. Microbiol. Biot.*, 41(3), 296-301.
- Roukas, T. (1994). Kinetics of ethanol production from carob pods extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Microbiol. Biot.*, 44(1), 49-64.
- Sánchez, S., Lozano, L. J., Godínez, C., Juan, D., Pérez, A., & Hernández, F. J. (2010). Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas. *Appl. Energ.*, 87(11), 3417-3424.
- Sidina, M. M., El Hansali, M., Wahid, N., Ouatmane, A., Boulli, A., Haddioui, A. (2009). Fruit and seed diversity of domesticated carob (*Ceratonia siliqua* L.) in Morocco. *Sci. Hortic.*, 123(1), 110-116.

- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16(3), 144-158.
- Sree, N. K., Sridhar, M., Rao, L. V., Pandey, A. (1999). Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. *Process Biochem.*, 34(2), 115-119.
- Thangavelu S. K., Ahmed A. S., Ani F. N. (2016). Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines, *Renew. Sust. Energy Rev.*, 56, 820-835.
- Turhan, I., Bialka, K. L., Demirci, A., Karhan, M. (2010). Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biores. Technol.*, 101(14), 5290-5296.
- Turhan, I., Tetik, N., Aksu, M., Karhan, M., Certel, M. (2006). Liquid–solid extraction of soluble solids and total phenolic compounds of carob bean (*Ceratonia siliqua L.*). *J. Food. Process. Eng.*, 29(5), 498-507.
- Vaheed, H., Shojaosadati, S. A., Galip, H., 2011. Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 38(1), 101-111.
- Varzakas T. (2015). Chapter 9. Diffusion, in: Varzakas, T., Tzia, C. (Eds.), *Food Engineering Handbook*. CRC Press, Boca Raton, pp. 217–262.
- Yu, J., Tan, T. (2008). Ethanol production by solid state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast strain. *Fuel Process. Technol.*, 89(11), 1056-1059.
- Zengin, E., Sağlıker, H. A., Darici, C. (2008). Carbon mineralization of *Ceratonia siliqua L.* soils under different temperature and humidity conditions. *Turk. J. Bot.*, 32(2), 123-127.

### 3.3 Expériences complémentaires et conclusions

Nos résultats expérimentaux ont clairement démontré que le déchet solide issu de la préparation de la mélasse de caroube libanaise est riche en sucre (44 % p/p de la matière sèche), principalement à cause du procédé traditionnel utilisé par les industries libanaises qui vise plutôt à obtenir un jus concentré qu'à maximiser la récupération des sucres. De plus, la majorité des autres constituants (polyphénols, cendres, protéines...) se retrouve également dans le déchet.

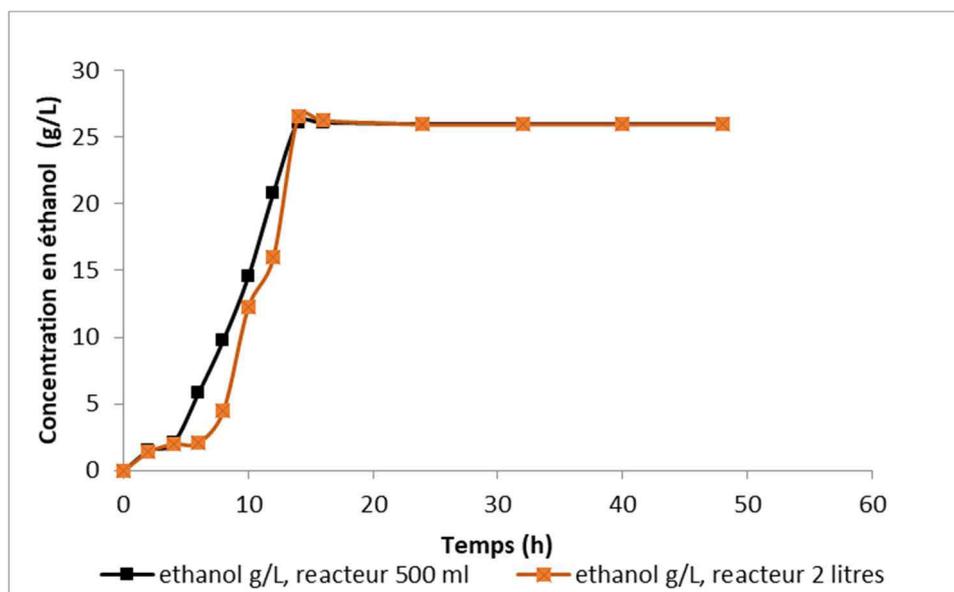
Finalement, nous avons également retenu une solution qui correspond à un compromis entre extraction totale des sucres et concentration dans les extraits : nous avons renoncé à un séchage préalable du déchet et à une augmentation de température lors de l'extraction, tous deux énergétiquement coûteux, ainsi qu'à l'ajout d'acide qui dégrade les sucres sans améliorer l'extraction, pour jouer sur le rapport massique L/S (eau/solide), la durée d'extraction et la granulométrie des déchets.

Les conditions retenues pour l'extraction des sucres consistent donc à réduire la taille du déchet humide de 5 mm à 2,5 mm, puis à conduire l'extraction avec un rapport L/S de 3 pendant 90 minutes et à la température ambiante.

La fermentation en phase liquide des extraits sucrés avec le milieu enrichi par les constituants décrits par Kristiansen (1994) a permis d'atteindre une concentration en éthanol de  $26,1 \pm 0,7$  g/L (contre seulement  $21 \pm 2$  g/L sans enrichissement de l'extrait), tout en diminuant la durée de la fermentation (14 h avec le milieu enrichi contre 24 h dans l'alternative) et en augmentant la productivité. Toutefois, la fermentation en phase solide appliquée directement au déchet s'est révélée une alternative potentiellement attractive, également à température ambiante, sous réserve de pouvoir contrôler précisément l'humidité à environ 70 % et de réduire par broyage la taille du déchet vers 0,5 mm. La durée de fermentation en phase solide est cependant plus longue, avoisinant les 39 heures. Pour l'industriel libanais, la fermentation en phase solide permet d'éviter d'investir dans un fermenteur tout en rendant plus simple le prétraitement, même si la récupération de l'éthanol en fin de fermentation est loin d'être une tâche simple.

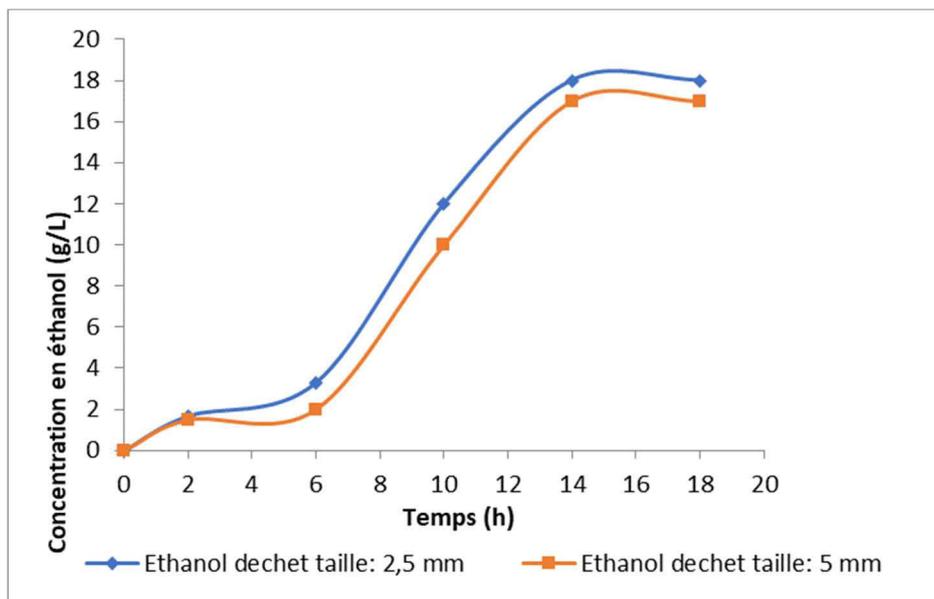
En fin de compte, nous avons complété les expériences décrites précédemment dans la publication par deux essais complémentaires :

- Le premier consiste à conduire la fermentation dans un réacteur de 3 litres de volume utile (6 L de volume total) pour tester le changement d'échelle, les conditions de culture étant identiques (3% (v/v) de pré-culture, température de fermentation fixée à 30°C, vitesse d'agitation à 200 tpm). Il a donné des résultats très proches de la fermentation alcoolique dans le réacteur de 450 mL, avec une concentration optimale d'éthanol de 26,1 g/L (450 mL) et 26,3 g/L (3 L) après 14 heures de fermentation dans les deux cas. Un tracé comparatif de la concentration en éthanol en fonction du temps est représenté sur la Figure 3:6. Celle-ci montre que l'on atteint quasiment la même valeur finale dans le même temps, mais avec une évolution plus lente entre 5 et 12 h probablement à cause de la différence entre les conditions de mélange.



**Figure 3:6.** Evolution de la concentration en éthanol (g/L) au cours du temps lors de la fermentation en phase liquide avec changement d'échelle : réacteur de 500 mL (volume de travail de 450 mL) et réacteur de 6 L (volume de travail de 3 litres).

- Le second consiste à conduire la fermentation en phase liquide, mais en utilisant directement le déchet solide en suspension, ce qui évite l'étape d'extraction. En fait, deux essais ont été réalisés pour deux tailles de particules de déchet solide, respectivement 5 mm et 2,5 mm, dans un milieu de culture complété par tous les éléments décrits par Kristiansen (1994), comme précédemment. Toutefois, afin de maintenir la suspension, il a fallu limiter la quantité de solide de sorte que la concentration initiale équivalente en sucres n'était que de 45 g/L. La Figure 3:7 montre que l'évolution de la concentration au cours du temps est similaire à celle de la fermentation en phase liquide. La quantité d'éthanol produite est au final de 18 g/L pour les particules 2,5 mm et de 17 g/L pour celles de 5 mm, ce qui montre que ce paramètre est peu significatif sur la production d'éthanol, sauf à réduire plus significativement la taille. Ce résultat est confirmé par le rendement et la productivité : respectivement 43 % et 1,28 g/L/h pour une dimension de 2,5 mm, contre 41 % et 1,21 g/L/h pour des particules de 5 mm. Globalement, on constate que le rendement est assez proche de celui du Table 3:4, ce qui laisse entrevoir la possibilité de coupler extraction-réaction dans le fermenteur. Ceci pourrait permettre d'atteindre un compromis économique entre la fermentation en phase liquide et la fermentation solide qui supprimerait toutes les étapes d'extraction (sucres en amont en phase liquide, ou alcool en aval en phase solide), sous réserve de pouvoir augmenter la quantité de solide en suspension en améliorant les conditions d'agitation.



**Figure 3:7.** Evolution de la concentration en éthanol (g/L) au cours du temps lors de la fermentation avec déchet solide en suspension pour deux tailles de particules.



# Chapitre 4. Valorisation du déchet de caroube en acide lactique

## 4.1 Introduction

Comme mentionné aux chapitres 1 et 2, le déchet de caroube libanais est riche en sucre (environ 44%). Cette quantité de sucres résiduels peut être utilisée pour la production de molécules d'intérêt, comme l'acide lactique. L'acide lactique est une plateforme chimique qui a un large domaine d'applications dans les industries alimentaire, cosmétique, textile, pharmaceutique et chimique. Notre intérêt pour cette molécule est que sa demande a augmenté de façon spectaculaire au cours des dernières années, en raison de son grand potentiel en tant que bloc de construction pour la production d'acide polylactique (PLA), un biopolymère qui constitue une alternative biodégradable aux matières plastiques à base de pétrole. Ainsi, la production mondiale d'acide lactique devrait atteindre 367300 tonnes pour l'année 2017.

Le travail réalisé au cours de cette thèse sur ce sujet est présenté sous la forme d'une publication à soumettre. Son objectif est de démontrer la faisabilité de la production d'acide lactique par fermentation lactique à partir du jus de déchet de caroube par *Lactobacillus rhamnosus* immobilisé sur des billes d'alginate de calcium. Afin d'optimiser la culture, une approche fondée sur les plans d'expériences a été mise en œuvre et des plans d'optimisation de type Box-Behnken ont été utilisés afin d'étudier les facteurs principaux que sont le pH, la vitesse d'agitation, la concentration en alginate et celle des cellules dans les billes d'alginate. De plus, les travaux réalisés incluent l'analyse des suppléments nécessaires au jus de caroube afin d'améliorer la productivité, ainsi qu'une étude du recyclage et de la réutilisation des billes d'alginate afin de démontrer l'intérêt de l'immobilisation du micro-organisme.

Comme cela va être démontré par la suite, les résultats confirment le potentiel du déchet de caroube comme substrat pour la production d'acide lactique, ainsi que l'intérêt de l'immobilisation de *L. rhamnosus*, mais en accord avec la littérature, ils confirment également que les lactobacilles ne sont pas capables de fermenter simultanément les mono- et les disaccharides, ce qui nécessite l'utilisation d'une invertase capable d'hydrolyser le saccharose. Cela ne remet cependant pas en cause l'intérêt de l'approche utilisée compte tenu du faible coût de cette enzyme.

## 4.2 Article en cours de soumission

### **OPTIMIZATION OF LACTIC ACID PRODUCTION USING IMMOBILIZED *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* AND CAROB POD WASTE FROM THE LEBANESE FOOD INDUSTRY**

Hajar Bahry<sup>1,2</sup>, Agnès Pons<sup>1</sup>, Rawa Abdallah<sup>2</sup>, Samir Taha<sup>2</sup>, Christophe Vial<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, Sigma Clermont, Institut Pascal, F-63000, Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup>Lebanese University; Doctoral school for sciences and technology; AZM Centre for research in biotechnology and its applications; Laboratory of applied biotechnology for biomolecules, biotherapy and bioprocess; El mitein street, Tripoli, Lebanon.

#### **Abstract**

The valorization of a solid carob waste from the Lebanese industry was investigated by optimizing the production of lactic acid using immobilized *Lactobacillus rhamnosus* and response surface methodology. The results showed that pH and alginate concentration had a significant effect on the production of lactic acid. The fermentation of non-enriched carob waste juice needed an additional nitrogen source to improve lactic acid production and yield. From extracts with 65 g/L sugars, the optimum conditions were found to be 2% for the concentration of alginate, 4% bacteria cells entrapped in beads, 80 rpm agitation speed and pH 6.4. Lactic acid concentration obtained under these conditions was 22 g/L with a yield of 76.9 g/g consumed sugar and a productivity of 1.22 g/L/h. The use of invertase pretreatment increased lactic acid concentration from 22 to 40 g/L, but reduced yield at 66.6%. Finally, cells immobilized in alginate beads could be used for at least five successive cycles.

**Keywords:** carob by-product, cell immobilization, lactic acid, *Lactobacillus rhamnosus*, response surface methodology.

#### **1. Introduction**

The carob tree belongs to the family of leguminous plants that are grown in the Mediterranean regions (Zengin et al., 2008). This is often used as an ornamental plant and in the reforestation of areas damaged by erosion or desertification, given its low cultivation requirements and its tolerance of poor soils (Batlle and Tous, 1997). The carob fruit consists in pulp and seeds. With a content of 64%, the carob pulp is particularly rich in sugar, richer than sugar cane and sugar beet (Limtong et al., 2007; Haankuku et al., 2015), and is currently used as a substitute for cacao. In recent years,

carob pulp has been used to produce value-added products such as mannitol, citric acid and pullulan by fermentation, while the seeds are used for the extraction of galactomannan and obtain locust bean gum (Haddarah et al., 2013).

Lactic acid is a valuable chemical platform that has extensive applications in food, cosmetics, pharmaceutical and chemical industries. Demand for lactic acid increases each year by 5 to 8% (Yadav et al., 2011). One of the main applications of lactic acid is its capacity to form polylactic acid (PLA), a polymer of great interest. The demand for PLA increases, while its production is only 450,000 tons per year (Okano et al., 2010). Lactic acid can be produced by chemical or fermentation routes. The chemical pathway leads to the production of a racemic mixture of DL-lactic acid, which increases the cost of separation, while fermentation leads to the production of D- or L-lactic acid depending on the organism used, and opens the opportunity to use cheaper substrates with low energy consumption and to develop a more environment-friendly process (Zhao et al., 2016). In general, fermentation is carried out using free cells, but the immobilization of cells sometimes improves productivity (Ogbonna et al., 1996). In addition, in relation with free cells, immobilization offers several advantages: namely, a reduced susceptibility to contamination, a decrease in substrate/product inhibition, and cell reuse in recycling steps (Zhao et al., 2016). Calcium alginate is the most commonly used immobilization matrix (Zhao et al., 2016). Idris and Suzanna (2006) investigated the production of lactic acid from pineapple waste using *Lactobacillus delbrueckii* immobilized in alginate. Similarly, Sirisansaneeyakul et al. (2007) studied the optimization of lactic acid production by immobilization of *Lactococcus lactis*. On the other hand, several alternative immobilization matrices are available, such as calcium pectate and chemically-modified chitosan gels (Kourkoutas et al., 2005). Zhao et al. (2016) found that the immobilization of *L. rhamnosus* in mesoporous silica-based material increased the fermentation efficiency by 4.1% over free cells. Immobilization was also extensively studied for alcoholic fermentation. Lee et al. (2011) found that ethanol production with alginate-immobilized cells resulted in a higher glucose conversion (100%) compared to free cells (88%) and to a decrease of fermentation time. Behera et al. (2009) compared the production of ethanol on mahula flowers by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*; immobilization in alginate displayed an ethanol yield 3.5% higher than with free cells. However, Roukas (1994a) showed that for the same fermentation conditions with *S. cerevisiae*, the ethanol yield was independent of the free or immobilized form of the yeast, which highlights that immobilization does not systematically lead to improved performance, even though the advantage of cell reusability is maintained.

In Lebanon, carob molasses, called “dibs”, is industrially produced from carob pods and widely consumed as a sweetener. The carob bean juice used for the preparation of molasses is obtained by two successive steps of maceration of carob pods cut into pieces of size close to 5 mm. The solid waste from this preparation is either discharged or used for animal feed. This waste has demonstrated its interest due to its high sugar content (44% of dry matter), and its ability to be fermented in bioethanol of second generation by *Saccharomyces cerevisiae* (Bahry et al., 2017). The only work investigating lactic acid production from carob juice has been carried out by Turhan et al. (2010a).

Conversely, no data can be found on the pod waste which is substrate in this work; this is less rich in sugar and from which many nutrients can have been removed in the preparation of dibs.

Thus, the purpose of this work is to explore another efficient route to valorize the residual carbohydrates of this carob waste by producing lactic acid using immobilized *Lactobacillus rhamnosus* in alginate beads, which differs from Turhan et al. (2010a) who worked directly on pods, using *Lactobacillus casei* in the liquid phase. The factors influencing the production, such as pH, alginate concentration, pre-culture volume and agitation speed were optimized using response surface methodology (RSM), as well as the number of possible fermentation cycles using the same beads.

## 2. Material and methods

### 2.1. Strain

The strain *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 was grown at 37°C for 48 hours in a medium containing 20 g of glucose, 4 g of yeast extract, 0.2 g of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g of MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g of sodium acetate, and 0.5 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> per liter of deionized water. The culture was stored at 4°C and subcultured bi-weekly in order to maintain viability. For a long-term storage, stock cultures were maintained in 20% glycerol at -80°C.

### 2.2. Extraction of sugars from carob waste

Carob waste (2.5 cm size) issued from molasses preparation was used in this work. Residual sugar extraction was obtained by maceration at room temperature for a liquid/solid ratio (L/S=3), without stirring for 90 minutes (Bahry et al., 2017). The concentration of total sugars in the juice was 65 g/L (54±2% saccharose, and 46±2% hexose, among which glucose and fructose are the most abundant).

### 2.3. Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus*

Inoculum was prepared in the MRS medium (de Man, Rogosa and Sharpe) 24 hours before the fermentation step. Three volumes of pre-culture relative to the volume of work in the reactor (2, 4 and 6%) were used for the immobilization in alginate beads. After centrifugation in 50 mL sterile tubes at 3800 rpm and 4°C for 20 min, the pellet was mixed with 20 mL of alginate solution prepared in three concentrations (2, 3 and 4%). The bacteria were encapsulated in alginate beads by the method of extrusion/gelation of the previously prepared solution using a pump (Gilson-Minipuls 2, France) and a syringe needle (type 20G, 0.9×40 mm) in 4% (w/w) CaCl<sub>2</sub> solution, leading to the production of beads of 5 mm approximate diameter. Then, the beads were left for 4 hours, and washed with a sterile 0.85% NaCl solution to remove non-adherent cells and the excess of calcium and chloride ions.

### 2.4. Batch fermentation

The fermentation was carried out in a 500-mL volume reactor, with a working volume of 400 mL. The carob juice was either used alone as unenriched carob waste (UECW), or supplemented with yeast extract, 10 g/L; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L; MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 0.03 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/L; CH<sub>3</sub>COONa H<sub>2</sub>O, 2 g/L and Tween 80, 1 mL/L, then denoted enriched carob waste (ECW). The fermentation medium was sterilized in the reactor at 121°C for 20 minutes. The alginate beads were transferred to the reactor in a sterile manner. Temperature was set at 37°C for all the tests and pH was adjusted by automatic addition of 5M NaOH. Lactic acid fermentation was studied for 24h and followed by sampling every 2h during the first 12h and then every 6h. Samples were analyzed for the determination of lactic acid and residual sugars.

In order to test the ability of reuse alginate beads, several batch fermentation runs were carried out in the reactor using the same beads. After 24h, the fermentation broth was removed and replaced by the same volume of sterile carob juice. Samples were taken for the analysis of lactic acid and residual sugars. To convert sucrose extracted from carob waste into monosaccharides, technical invertase from baker's yeast (*S. cerevisiae*) of 60 U/mg enzyme activity was employed at 55°C and pH 5.5.

### 2.5. Chemical analysis

Lactic acid concentration was determined using an HPLC device. The apparatus (HPLC 1260 Infinity Quaternary LC system, from Agilent Technology, USA) was equipped with two ion exclusion columns connected in series (Rezex ROA 300×7.8 mm, Phenomenex, USA). The mobile phase was a 2 mM sulfuric acid solution, in ultrapure water (Millipore, MilliQmore), continuously degassed, and flow rate was fixed at 0.7 mL/min. Lactic acid was detected using a refractometer (HP 1100 series, Agilent Technologies, USA). Before analysis, samples were deproteinized to prevent clogging of the column. This was carried out as follows: 250 µL of barium hydroxide solution (BaOH<sub>2</sub>, 0.3M) and 250 µL of zinc sulfate solution (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5% w/v) were added to a 2-mL sample, which caused the precipitation of proteins; after centrifugation for 5 min at 10,000 rpm, the supernatant was finally filtered using a cellulose acetate syringe filter (0.45 µm).

Total sugars were determined using the method of Dubois et al. (1956), and reducing sugars were analyzed by the DNS method of Miller (1959).

### 2.6. Experimental design and statistical analysis

Experiments were defined using the Design of Experiments (DOE) methodology. For the optimization of fermentation conditions, response surface methodology (RSM) was applied. Four factors were studied:

- *Alginate concentration (A)*: the range chosen was between 2 and 4%, according to Idris and Suzana (2006), because for a concentration lower than 1%, the beads are easily broken, whereas a too high concentration causes a delay in sugar consumption by bacteria.
- *pH (B)*: the range was fixed between 4.5 and 6.5 which is the optimal pH range for the growth of *Lactobacillus* (Nancib et al., 2001).
- *Agitation speed (C)*: the range was between 50 and 150 rpm to maintain sufficient mass transfer, without breaking the beads.
- *Amount of bacteria Cells Entrapped in Beads, referred to as ACEB (D)*: this amount ranged between 2 and 6%, which is classical in alginate beads (Ercan e al., 2012).

The minimum and maximum values of these four main factors and their coded levels are summarized in Table 4:1. A four-factor Box–Behnken design was applied to examine the relationship between one or more response variables and for process optimization (Box and Behnken, 1960). This included 27 runs, including 3 replications of the center point. The response variables were the amount of lactic acid produced ( $P$ , g/L), the yield ( $Y_{P/S}$ , %), and the maximum production rate ( $Q_P$ , g/L/h).

The free software environment R (R Core Team, 2016) was used for the creation and analysis of experimental designs and multiple comparison. These were analyzed using ANOVA. Parameters with a p-value ( $p$ ) of 0.05 or less were considered significant.

**Table 4:1.** Range and levels of the independent variables in the Box–Behnken design.

Factor	Code	-1	0	+1
Alginate concentration (%)	A	2	3	4
pH	B	4.5	5.5	6.5
Agitation speed (rpm)	C	50	100	150
ACEB (%)	D	2	4	6

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Preliminary experiments

Preliminary experiments involving the carob waste highlighted that *Lactobacillus* was able to use saccharose or glucose as the substrate when a single carbon source was used. Conversely, when saccharose and glucose were added simultaneously, only the hexose was consumed. As carob waste extracts contains 35 g/L and 30 g/L saccharose and hexoses, respectively, this shows that *L. rhamnosus* prefers monosaccharides as the substrate and that metabolic adaptation from glucose to hexose is not rapid.

### 3.2. Analysis of the experimental design

#### 3.2.1. ANOVA and model assessment

The experimental results of Box–Behnken design are summarized in Table 4:2. This clearly displays a significant evolution of lactic acid production  $P$  (from 15 to 22 g/L), yield  $Y_{P/S}$  (from 65.0 to 77%) and productivity  $Q_P$  (from 0.45 to 1.22 g/L/h) as a function of the four main factors. A quadratic model with interactions was applied to fit experimental data. The ANOVA tables for the three response variables are summarized in Table 3. The determination coefficient  $R^2$  is satisfactory for  $P$  and  $Q_P$ ,  $R^2=0.941$ ,  $0.947$ , respectively. Conversely, it is weak for  $Y_{P/S}$ , about 0.77. In addition, the lack-of-fit of the model is statistically significant only for  $Y_{P/S}$ , which implies that the linear model is not adapted for fitting the evolution of this parameter. Another information that arises from Table 4:3 is that many predictors do not play a significant role among the interaction and the quadratic terms, so that the models can be significantly reduced to a few influential predictors. A descending method was applied: this consists in removing iteratively the predictor with the highest p-value until all the predictors are statistically significant.

## Valorisation du déchet de caroube en acide lactique

**Table 4:2.** Experimental data (lactic acid production  $P$ , yield  $Y_{P/S}$ , and maximum productivity  $Q_P$ ) collected in the runs of the Box–Behnken design as a function of the four main factors.

Run	Alginate concentration (%)	pH	Agitation speed (rpm)	ACEB (%)	$P$ (g/L)	$Y_{P/S}$ (%)	$Q_P$ (g/L/h)
1	0	0	0	0	20	73.6	1.06
2	0	0	0	0	21	74	1.10
3	0	0	0	0	19.8	73.3	0.97
4	-1	-1	0	0	18	72.0	0.78
5	+1	-1	0	0	15	65.2	0.45
6	-1	+1	0	0	22	76.9	1.22
7	+1	+1	0	0	19	76.6	0.95
8	0	0	-1	-1	18	69.2	0.90
9	0	0	+1	-1	18.6	70.0	0.98
10	0	0	-1	+1	19.52	72.3	1.04
11	0	0	+1	+1	20	74.0	1.07
12	-1	0	0	-1	20.8	74.3	1.13
13	+1	0	0	-1	17.6	73.4	0.70
14	-1	0	0	+1	19	67.9	1.12
15	+1	0	0	+1	19.4	77.6	1.01
16	0	-1	-1	0	15.5	62.0	0.62
17	0	+1	-1	0	21.5	75.5	1.18
18	0	-1	+1	0	16.9	70	0.69
19	0	+1	+1	0	20.5	78.8	1.20
20	-1	0	-1	0	21	76.4	1.15
21	+1	0	-1	0	17.1	70.6	0.86
22	-1	0	+1	0	21.5	77.7	1.19
23	+1	0	+1	0	17.8	69.5	0.87
24	0	-1	0	-1	16.9	70.7	0.77
25	0	+1	0	-1	19.8	75.5	1.04
26	0	-1	0	+1	16	64.0	0.80
27	0	+1	0	+1	20.9	76.8	1.10

The reduced models are summarized in Table 4:4 for  $P$  and  $Q_P$ , while no significant model could be deduced for  $Y_{P/S}$ , as expected from Table 4:3.  $R^2$  was 0.87 and 0.92 for  $P$  and  $Q_P$ , respectively, which is satisfactory. Finally, A, B, the quadratic term  $B^2$  and the interaction AD exhibited a significant effect on  $P$ , while D and the same predictors were significant on  $Q_P$ .

The final model equation for acid lactic production based on coded levels was:

$$P = 20.3 - 1.38 \times A + 2.12 \times B + 0.9 \times AD - 0.9 \times B^2$$

In parallel, the reduced model for  $Q_P$  was:

$$Q_P = 1.01 - 0.15 \times A + 0.21 \times B + 0.05 \times D + 0.08 \times AD - 0.12 \times B^2$$

The good agreement between the observed values and those predicted by these equations arises from Figure 4:1. The optimum conditions determined from these models for both variables were very close, so that it was not necessary to define a desirability function for multiple responses: the minimum value of alginate concentration (A) studied, 2%, with a pH (B) of 6.4, close to the maximum value studied. For C and D factors which played a secondary role, intermediate values of 80 rpm for agitation speed (C) and 4% for ACEB (D) were retained. The value of lactic acid production corresponding to these parameters was 22.2 g/L, while productivity was 1.24 g/L/h. Experimental runs with these optimal conditions were carried out and the experimental values of  $22.1 \pm 0.2$  g/L and  $1.22 \pm 0.08$  g/L/h for production and productivity were observed, respectively, which was in very good accordance with the model.

**Table 4:3.** ANOVA analysis for the three responses (significant p-values are in bold).

Predictor	P (g/L)		Y <sub>P/S</sub> (%)		Q <sub>P</sub> (g/L/h)	
	Sum of Squares	p-value	Sum of Squares	p-value	Sum of Squares	p-value
A	22.4	<b>0.0179</b>	12.3	<b>0.0100</b>	0.255	<b>0.0169</b>
B	53.7	<b>0.0076</b>	262	<b>0.0005</b>	0.555	<b>0.0079</b>
C	0.599	0.3520	16.4	<b>0.0075</b>	0.00521	0.3917
D	0.811	0.2962	0.0234	0.7076	0.0320	0.1150
A <sup>2</sup>	1.104	0.2438	1.75	0.0647	0.0102	0.2684
AB	0.000	1.0000	10.6	<b>0.0116</b>	0.0009	0.6964
AC	0.0100	0.8907	1.45	0.0765	0.000225	0.8427
AD	3.24	0.1074	28.6	<b>0.0044</b>	0.0256	0.1382
B <sup>2</sup>	8.06	<b>0.0476</b>	7.42	<b>0.0165</b>	0.0800	0.0512
BC	1.440	0.2029	5.45	<b>0.0222</b>	0.000625	0.7434
BD	1.00	0.2601	16.0	<b>0.0077</b>	0.000225	0.8427
C <sup>2</sup>	1.280	0.2205	4.67	<b>0.0258</b>	0.000075	0.9084
CD	0.0036	0.9342	0.216	0.3193	0.000625	0.7434
D <sup>2</sup>	2.36	0.1395	4.95	<b>0.0244</b>	0.0012	0.6547
Lack-of-fit	4.979	0.5361	113.393	<b>0.0110</b>	0.0504	0.5552
Pure error	0.826		0.2504		0.00886	
Total error	97.54		487.32		1.026	

In comparison to Turhan et al. (2010a), the initial sugar concentration was between 100–105 g/L sugar because these authors used directly carob pods for sugar extraction, while a waste was used

in this work. This explains why fermentation started only with 65 g/L sugar, but shows that the waste remains very rich in extractable sugars. As a result, Turhan et al. (2010a) achieved 31.35 g/L lactic acid with a supplemented medium, while it was only 22.1 g/L in this work. However,  $Y_{P/S}$  was only 68.6% in their study, while 77% was reached in the present work. As the medium and the microorganism both differ, it is not possible to conclude definitively on the role of immobilization. In addition, sugar utilization was about 44% in both studies, which shows that immobilization does not significantly change this parameter.

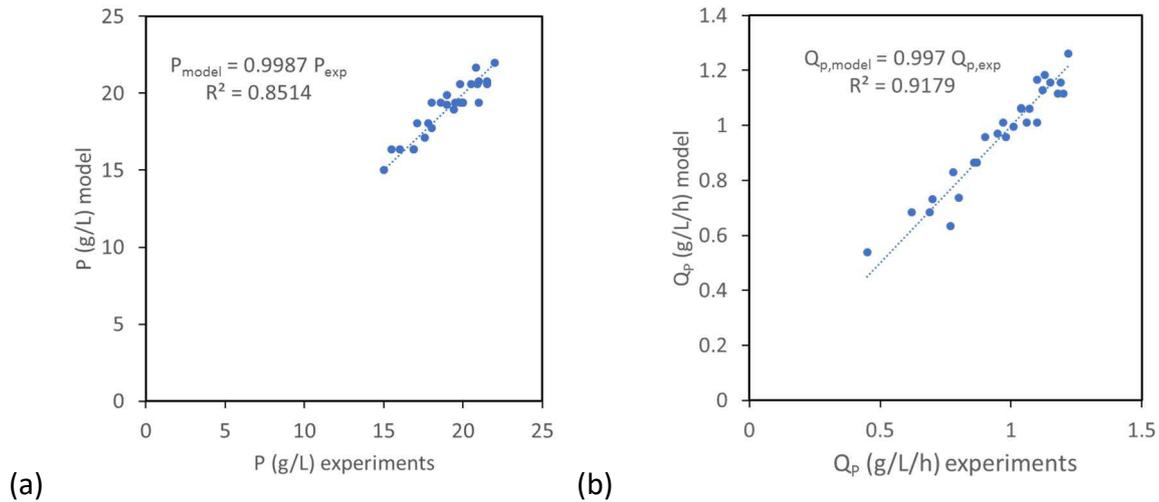


Figure 4.1. Plot of predicted vs. observed  $P$  and  $Q_P$  values.

Table 4.4. Summary of ANOVA and coefficient estimates of the reduced models for  $P$  and  $Q_P$ , including  $df$  (degree of freedom),  $p$  (p-value) and the standard error of the estimates.

$P$ (g/L)							
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	Coefficient	Error
A	22.4133	1	22.4133	34.03	<b>0.0000</b>	-1.38	0.23
B	53.7633	1	53.7633	81.63	<b>0.0000</b>	2.12	0.23
AD	3.24	1	3.24	4.92	<b>0.0436</b>	0.9	0.40
B <sup>2</sup>	5.49643	1	5.49643	8.35	<b>0.0119</b>	-0.9	0.31
Lack-of-fit	3.41657	8	0.427072	0.65	0.7265		
Pure error	9.2202	14	0.658586				
Total (corr.)	97.5499	26					
$Q_P$ (g/L/h)							
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	Coefficient	Error
A	0.255208	1	0.255208	127.47	<b>0.0000</b>	-0.146	0.013
B	0.5547	1	0.5547	277.06	<b>0.0000</b>	0.216	0.013
D	0.0320333	1	0.0320333	16.00	<b>0.0039</b>	0.0517	0.013
AD	0.0256	1	0.0256	12.79	<b>0.0072</b>	0.08	0.023
B <sup>2</sup>	0.0806667	1	0.0806667	40.29	<b>0.0002</b>	-0.122	0.017
Lack-of-fit	0.0620417	13	0.00477244	2.38	0.1107		
Pure error	0.0160167	8	0.00200208				
Total (corr.)	1.02627	26					

However, it arises clearly from Table 4:2 that *L. rhamnosus* immobilized in alginate beads is able to produce effectively lactic acid. But as in Turhan et al. (2010a) with *L. casei*, it seems that *L. rhamnosus* is only able to use monosaccharides as the substrate, which could explain the high amount of unconsumed sugar at the end of each run in both studies.

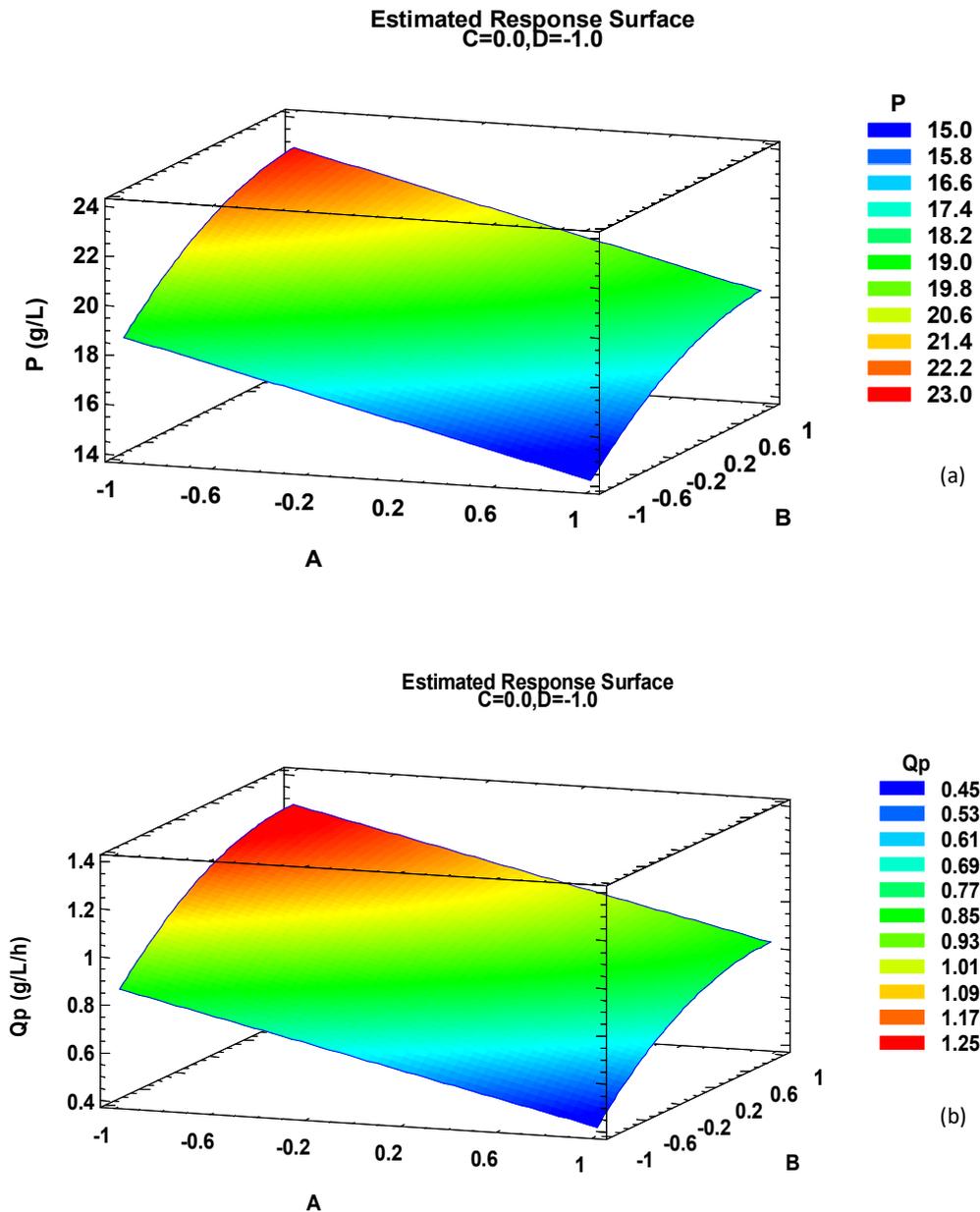
### 3.2.2 Effect of alginate concentration (A)

Experimental results clearly demonstrate that the increase in alginate concentration has a negative effect on the yield of lactic acid (Figure 4:2). They show that 2% leads to a lactic acid concentration of 22 g/L and a yield of 77% (Table 4:2). Higher concentrations than 2% alginate may lead to a delay in the consumption of glucose and fructose because it would be more difficult for sugars to percolate into the cell pores (Ercan et al., 2012). As already mentioned, for an or alginate concentration lower than 1%, beads were too soft and were, therefore, easily broken due to their low mechanical strength, thus causing bacteria to leak throughout the beads. These conclusions are consistent with those found by Idris and Suzana (2006) on the production of lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* using pineapple waste as substrate. Similarly, Givry et al. (2007) found a significant difference in the yield of lactic acid obtained by *Lactobacillus bifementans* on hemicellulose hydrolyzates with 2 to 4% alginate. The same results have also been reported by Najafpour et al. (2004) and Ercan et al. (2012), but in the production of ethanol. As a conclusion, the results of Table 4:2 fully agree with the literature and *L. rhamnosus* displays the same behavior as other microorganisms when immobilization in alginate beads is applied.

### 3.2.3. Effect of pH (B)

pH is a very important parameter in fermentation, as it affects at least two aspects of microbial metabolism: the metabolism of enzymes and the transport of nutrients into the cells. In Table 4:2 and from ANOVA in Table 3, it emerges that it affects significantly lactic acid production, which also emerges in Figure 4:2. Contrary to alginate concentration, both B and B<sup>2</sup> predictors are statistically significant and the coefficient estimates are of opposite sign, which means that a parabolic shape with a maximum is expected. With lactobacilli, the critical pH value is 4 and the optimal pH of growth is between 4.5 and 6.4 (Nancib et al., 2001). It is known that when the pH approaches the pK<sub>a</sub> of lactic acid (about 3.9), the undissociated form of lactic acid plays a more inhibitory effect than the dissociated lactate form. At a pH lower than 5, the undissociated acid form cannot be neglected, whereas a pH greater than 6 leads to almost complete dissociation of lactic acid, which explains why the optimal pH of fermentation around 6 (Pal et al., 2009). This is in agreement with Figure 4:2 in which the effect of pH is stronger between 4.5 and 5.5 than between 5.5 and 6.5. A pH of 5.5 was found by Ghaly et al. (2004) as for the optimum production of lactic acid by *L. helveticus*. From the results obtained, a pH of 6.4 was found to be the optimal value. This result is close to that of Idris and Suzana (2006) in which 6.5 was reported to maximize the production of lactic acid by *L. delbrueckii*. Similarly, Panesar et al. (2010) found a maximum conversion rate of lactose and an

optimum lactic acid production of 33.5 g/L with a pH value of 6.5. Krischke et al. (1991) also reported that a pH interval between 6.0 and 6.5 is optimal for lactic acid production by *Lactobacillus casei*. As a conclusion, the optimum pH observed for immobilized *L. rhamnosus* is close to the optimum values reported in the literature for similar microorganisms in liquid phase, as expected.



**Figure 4:2.** Illustration of the influence of alginate concentration (A) and pH (B) on lactic acid production (a) and productivity (b).

### 3.2.4. Effect of agitation rate (C)

Agitation speed is a key parameter for the efficient transfer of nutrients from the bulk to the cells in the fermentation process (Liu and Shen, 2008). In this work, Table 4:3 clearly shows that this

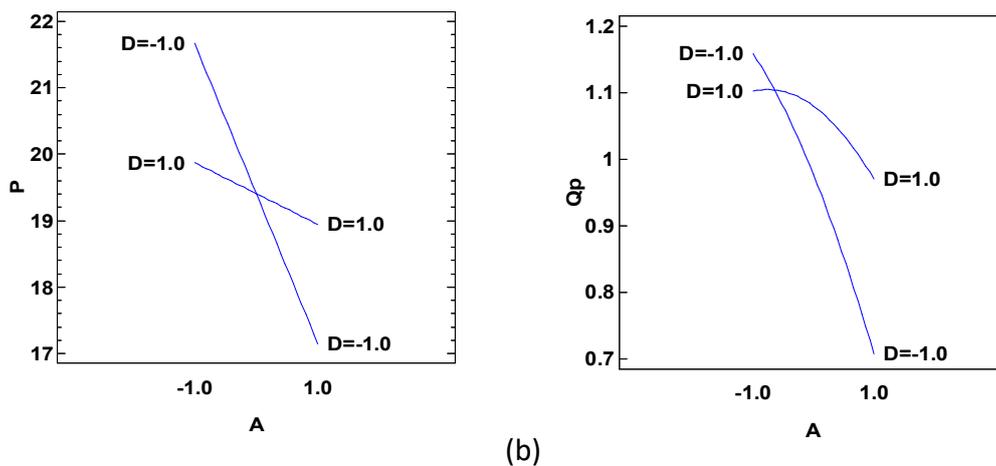
factor is not statistically significant. Contradictory results can be found in the literature on this topic. Bai et al. (2003) reported that lactic acid production increased by 42% when stirring was increased from 0 to 300 rpm. The same conclusion was drawn in Roukas (1994b), where alcoholic fermentation on carob juice was enhanced by higher agitation speed. Ercan et al. (2012) selected 150 rpm as the optimum agitation rate to produce ethanol from carob bean juice by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. However, Panesar et al. (2010) found that there was no difference in the production of lactic acid between fermentation with and without agitation, in agreement with this work. Finally, this work highlights that contrary to expectations, mass transfer is not the limiting step, even when agitation speed is 50 rpm. This shows that immobilization does not slow down lactic fermentation because of mass transfer limitation.

### 3.2.5. Effect of ACEB (D)

Based on the results of the experimental design, this parameter does not exhibit a significant effect on the production of lactic acid and has a weak role on productivity (Table 4:4). However, the interaction AD with alginate concentration is always significant, which shows that this factor may have a weak non-linear behavior which is not accounted for by the model. In this work, 4% was retained for the volume of inoculum, which does not exactly fit the optimized values because the optimum is not the same when  $P$  and  $Q_P$  are considered. This behavior differs significantly from the other main factors, A and B. ACEB has a slight positive effect on  $Q_P$ , but this is compensated by the AD interaction: when  $Q_P$  is maximized at low pH (*i.e.* when A tends towards -1), the AD and the D terms are, therefore, of opposite sign in the  $Q_P$  expression and their sum plays a weak role in the model. Finally, 4% agrees with the work of Panesar et al. (2010) in which the maximum concentration of lactic acid was obtained with an inoculum size between 2 and 4%. The increase in inoculum size is supposed to induce an increase in biomass concentration and consumption and production rates, which explains why D has a stronger influence on  $Q_P$  in this work. The reason of an optimum inoculum volume can be found in Lalue et al. (2009) who reported that a high cell density can negatively affect ethanol production due to a lack of nutrients, a limit of space and too strong cell interactions. Similarly, 3% was the optimal inoculum size for ethanol production by *S. cerevisiae* in Izmirliglu and Demirci (2012) and in Turhan et al. (2010b).

### 3.2.6. Effect of the AD (alginate×ACEB) interaction

The role of the alginate×ACEB interaction has been slightly studied in the literature. Figure 4:3 illustrates the AD interaction for  $P$  and  $Q_P$ . As already mentioned, the AD interaction compensates the effect of D in  $P$ . For  $Q_P$ , it appears clearly that the effect of D becomes insignificant when  $A=-1$  in Figure 4:3. More generally, it also arises from this figure that when A is decreased, D should also be decreased to enhance lactic acid production. Actually, concentrations of alginate higher than 2% may delay the diffusion of sugars in the beads. So, an increase of alginate concentration requires an increase of the inoculum to maintain the nutrient accessibility to biomass. This explains why the AD interaction is significant both on  $P$  and  $Q_P$  in Table 4:4.



**Figure 4.3.** Interaction plots between alginate concentration (A) and ACEB (D). Effect on: (a) lactic acid production  $P$  (g/L); (b) productivity  $Q_p$  (g/L/h).

### 3.3. Further improvements of the fermentation process

#### 3.3.1. Batch fermentation using UECW

In order to study whether carob waste juice can be considered as a complete fermentation medium, a negative control has been achieved on carob juice without enrichment. Experimental results display a significant difference for the kinetic parameters between the enriched carob waste (ECW) and the unenriched carob waste (UECW) in Table 4:5. The concentration of lactic acid produced on ECW media was 22 g/L, whereas this value was only 14 g/L for the UECW medium. In addition, there was also a significant difference in maximum production rate: for ECW,  $Q_p$  was 1.22 g/L/h, whereas this value was reduced to 0.43 g/L/h for UECW. Similarly, the fermentation of ECW displayed a yield of 77%, while the yield  $Y_{P/S}$  was decreased to 48.5% for UECW. This result agrees with the data from Turhan et al. (2010a) in which  $Y_{P/S}$  fell at 41% without enrichment. This result highlights that the fermentability of the carob waste does not differ significantly from that of the fruit, which means that similar nutrients must be added to enhance lactic acid production. As in Turhan et al. (2010a), the issue is that carob and, consequently, the carob waste does not contain an adequate nitrogen source. Both contain only proteins (Bahry et al., 2017), while among the nutritional elements, yeast extract was considered essential for *Lactobacillus* to obtain efficient production of lactic acid (Aeschlimann and von Stockar, 1990). In the study of Göksungur and Güvenç (1997), the presence of nitrogen source improved lactic acid production from 10 g/L to 60 g/L. Similarly, Nancib et al. (2001) reported that the concentration of lactic acid rose from  $30 \pm 2.4$  g/L without yeast extract, to 46 g/L with yeast extract. In addition, manganese ions, a constituent of lactate dehydrogenase, have been shown to have a strong effect on lactic acid production. On date juice, supplementation by yeast extract has been shown to improve production yield, compared to non-enriched date juice (Nancib et al., 2001). Similar conclusions were drawn by Turhan et al. (2010a) who compared five nitrogen sources among which the yeast extract maximized the production of lactic acid. Thus, all the kinetic parameters show the need to enrich the culture medium with a source of nitrogen and elements that are necessary for the growth of *Lactobacillus* bacteria. This conclusion can be generalized for

carob pods and carob waste, as similar results were reported concerning the importance of enrichment of culture medium during the production of bioethanol (Germec et al., 2015; Bahry et al. 2017).

**Table 4:5.** Evolution of kinetic parameters of lactic acid production when recycling alginate beads.

Kinetic parameters	Optimum condition (ECW)	Cycle 1 (ECW)	Cycle 2 (ECW)	Cycle 3 (ECW)	Cycle 4 (ECW)	Cycle 5 (ECW)	Culture on UECW
Sugars consumed (g/L)	29 <sup>a</sup> ±1.2	28 <sup>a</sup> ±4	28.0 <sup>a</sup> ±0.9	29 <sup>a</sup> ±3	28 <sup>a</sup> ±2	29 <sup>a</sup> ±4	29 <sup>b</sup> ±4
Lactic acid (g/L)	22 <sup>a</sup> ±0.9	22 <sup>a</sup> ±2	21.4 <sup>a</sup> ±0.5	22 <sup>a</sup> ±4	21 <sup>a</sup> ±2	20 <sup>a</sup> ±3	14 <sup>b</sup> ±3
Yield (%)	77 <sup>a</sup> ±2	79 <sup>a</sup> ±4	76.0 <sup>a</sup> ±0.9	75 <sup>a</sup> ±5	75 <sup>a</sup> ±4	72 <sup>b</sup> ±3	49 <sup>c</sup> ±3
Production rate (g/L/h)	1.22 <sup>a</sup> ±0.08	1.16 <sup>a</sup> ±0.02	1.2 <sup>a</sup> ±0.6	1.1 <sup>a</sup> ±0.1	1.2 <sup>a</sup> ±0.9	1.2 <sup>a</sup> ±0.3	0.43 <sup>b</sup> ±0.08

In each line, the same superscript letter within columns indicates homogeneous subset.

### 3.3.2. Reusability of alginate beads

Among the objectives of immobilization, the ability to re-use beads with immobilized cells after replacement of the culture medium is one of the most relevant. For that purpose, repeated-batch fermentation was carried out to assess the number of possible cycles performed by the immobilized cells while maintaining the stability of the alginate beads. The same optimum fermentation conditions defined in section 3.2 were always applied (2% alginate, pH 6.4, stirring rate 80 rpm and ACEB 4%; total initial sugar concentration: 65 g/L).

From the results obtained in Table 4:5, cells immobilized in alginate beads can be used for five successive cycles with only a small reduction in yield. At the fifth cycle, the yield decreased by up to 72 ± 2%, with a small leakage of the cells into the culture medium; this can be explained by the possible combination of lactic acid with phosphate, citrate and calcium ions leading to the disintegration of calcium alginate. However, the  $P$  and  $Q_p$  did not significantly change among the fifth run, which highlights that more cycles could probably be applied. This result agrees with Ganguly et al. (2006) who investigated the production of lactic acid with loofa sponge immobilized in *Rhizopus oryzae* RBU2-10 could be carried out for 10 cycles with a high productivity (1.66–1.84 g/L/h) during the first 5 cycles. Similar results were also reported on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in alginate by Ercan et al. (2012). As a conclusion, this result highlights the interest of *L. rhamnosus* immobilization for lactic acid production.

### 3.3.3. Pretreatment of carob juice by invertase enzyme

In the extracts, the major sugars are glucose, fructose and sucrose. During fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*, glucose and fructose were consumed by the microorganism, whereas sucrose was not metabolized. These results are similar to those found by Nancib et al. (2001) using *L.*

*rhamnosus* and date juice as the substrate. During lactic acid fermentation on pineapple syrup, sucrose was not easily metabolized by *Lactococcus lactis* because bacteria preferentially used glucose and fructose (Ueno et al., 2003). The same conclusion was drawn by Turhan et al. (2010a) using carob juice and *L. casei*. This may be explained by the fact that enzymes for sucrose catabolism are not synthesized when glucose and fructose exist in the medium, indicating that glucose and fructose have probably caused the repression of sucrose catabolism. In a study involving the simultaneous fermentation of D-xylose and glucose by *Candida shehatae*, Kastner et al. (1998) concluded that glucose inhibits the catabolism of D-xylose by suppressing the induction of D-xylose enzymes. For this purpose, a conversion of sucrose was necessary. As a result, only a pretreatment of the extracts by an invertase enzyme, as in Turhan et al. (2010a), was able to lead to the total conversion of sucrose into glucose and fructose and enhance lactic fermentation. Thus, the fermentation was replicated on carob waste juice with a total concentration of reducing sugars of 65 g/L.

The carob waste juice was treated with an invertase prior to the addition of pre-culture, under optimum conditions previously described. A DNS analysis was performed to validate the total conversion of sucrose into simple sugars. After the pre-culture was added, the fermentation was started by keeping the same optimum conditions of fermentation found by the experimental design. The results show that, after treatment with the invertase enzyme, sugar utilization, and lactic acid production and productivity increased up to 92%, 40 g/L and 1.66 g/L/h, compared to 44%, 22 g/L and 1.2 g/L/h without enzymatic treatment, respectively (Table 4:6). The yield decreased from 77% to 66.6%, which shows that increasing sugar concentration promotes biomass growth at the expense of lactic acid productivity. Similar conclusions were drawn by Turhan et al. (2010a). Similarly, Ueno et al. (2003) have improved the production of lactic acid from pineapple waste by *Lactococcus lactis* after using another invertase enzyme extracted from grape.

**Table 4:6.** Kinetic parameters of lactic acid production from carob waste (CW) and carob waste treated with invertase enzyme (CWI).

Kinetic parameters	CW	CWI
Initial sugar concentration (g/L)	65 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>
Sugars consumed (g/L)	28.6 <sup>a</sup>	60 <sup>b</sup>
Lactic acid produced, <i>P</i> (g/L)	22 <sup>a</sup>	40 <sup>b</sup>
Yield, <i>P</i> (%)	76.9 <sup>a</sup>	66.6 <sup>b</sup>
Max production rate, <i>Q<sub>P</sub></i> (g/L/h)	1.22 <sup>a</sup>	1.66 <sup>b</sup>

In each line, the same superscript letter within columns indicates homogeneous subset.

As a conclusion, low-cost invertase can be used to subsequently enhance sugar utilization, lactic acid production and productivity, but at the expense of yield. This stems from the sugar composition of extracts from carob waste which contains both mono- and disaccharides. The inability of lactic bacteria to ferment at the same time these mono- and disaccharides seems general in the literature, which means that it is favored or repressed neither by the waste, nor by immobilization. Similarly,

*L. casei* and *L. rhamnosus* display apparently the same behavior, but the reusability of immobilized cells remains a key advantage of this study.

#### 4. Conclusion

The solid carob waste resulting from molasses production in the Lebanese food industry is an attractive source to produce lactic acid. Extraction process is able to provide extracts containing 65 g/L sugars. However, the enrichment of the culture medium, especially in yeast extract as a nitrogen source, is necessary to significantly increase the yield of lactic acid production at constant sugar utilization. The optimum conditions deduced from response surface methodology lead to a final concentration of lactic acid of 22 g/L, a yield of 76.9% and a productivity of 1.22 g/L/h. Further improvements included a pretreatment with invertase, so that a final concentration of 40 g/L and a productivity of 1.66 g/L/h could be achieved, but with a reduced yield of 66.6%. Immobilization was shown to be an efficient process for the reuse of microorganisms, which allowed an easy separation of the biomass from the liquid phase. The reusability of the beads up to five cycles was demonstrated. A techno-economic analysis must be carried out, now, to optimize the process from sugar extraction to lactic acid purification and determine whether a pre-concentration step of sugar is necessary.

#### References

- Aeschlimann, A., & von Stockar, U. (1990). The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 398-402.
- Bahry, H., Pons, A., Abdallah, R., Pierre, G., Delattre, C., Fayad, N., Taha, S & Vial, C. (2017). Valorization of carob waste: Definition of a second-generation bioethanol production process. *Biore-source Technology*, 235, 25-34.
- Bai, D. M., Jia, M. Z., Zhao, X. M., Ban, R., Shen, F., Li, X. G., & Xu, S. M. (2003). L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermenter. *Chemical Engineering Science*, 58(3), 785-791.
- Batlle, I., & Tous, J. (1997). *Carob tree: Ceratonia siliqua L.-Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 17. Biodiversity International.
- Behera, S., Kar, S., Mohanty, R. C., & Ray, R. C. (2009). Comparative study of bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. *Applied Energy*, 87(1), 96-100.
- Box, G. E. P., & Behnken, D. W. (1960). Simplex-sum designs: A class of second order rotatable designs derivable from those of first order. *The Annals of Mathematical Statistics*, 31(4), 838-864.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Ercan, Y., Irfan, T., & Mustafa, K. (2012). Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresource Technology*, 135, 365-371.
- Ganguly, R., Dwivedi, P., & Singh, R. P. (2006). Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10. *Bioresource Technology*, 98(6), 1246-1251.
- Germec, M., Turhan, I., Karhan, M., & Demirci, A. (2015). Ethanol production via repeated-batch fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor. *Fuel*, 161, 304-311.
- Ghaly, A. E., Tango, M. S. A., Mahmoud, N. S., & Avery, A. C. (2004). Batch propagation of *Lactobacillus helveticus* for production of lactic acid from lactose concentrated cheese whey with micro-aeration and nutrient supplementation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 65-75.
- Givry, S., Prevot, V., & Duchiron, F. (2007). Lactic acid production from hemicellulosic hydrolyzate by cells of *Lactobacillus bifementans* immobilized in Ca-alginate using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 745-752.
- Göksungur, Y., & Güvenç, U. (1997). Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69(4), 399-404.
- Haankuku, C., Epplin, F. M., & Kakani, V. G. (2015). Industrial sugar beets to biofuel: Field to fuel production system and cost estimates. *Biomass and Bioenergy*, 80, 267-277.
- Haddarah, A., Ismail, A., Bassal, A., Hamieh, T., Ioannou, I., & Ghoul, M. (2013). Morphological and chemical variability of Lebanese carob varieties. *European Scientific Journal*, 9(18), 353-369.
- Idris, A., & Suzana, W. (2006). Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41(5), 1117-1123.
- Izmirlioglu, G., & Demirci, A. (2012). Ethanol production from waste potato mash by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sciences*, 2(4), 738-753.
- Kastner, J. R., Jones, W. J., & Roberts, S. (1998). Simultaneous utilization of glucose and D-xylose by *Candida shehatae* in a chemostat. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(6), 339-343.

- Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E., & Kanellaki, M. (2005). *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*, 40(1), 411-416.
- Krischke, W., Schröder, M., & Trösch, W. (1991). Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(5), 573-578.
- Laluce, C., Tognolli, J. O., De Oliveira, K. F., Souza, C. S., & Morais, M. R. (2009). Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(4), 627-637.
- Lee, K. H., Choi, I. S., Kim, Y. G., Yang, D. J., & Bae, H. J. (2011). Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. *Bioresource Technology*, 102(17), 8191-8198.
- Limtong, S., Sringiew, C., & Yongmanitchai, W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, 98(17), 3367-3374.
- Liu, R., & Shen, F. (2008). Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresource Technology*, 99(4), 847-854.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Najafpour, G., Younesi, H., & Ismail, K. S. K. (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 92(3), 251-260.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F., & Boudrant, J. (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology*, 78(2), 149-153.
- Ogbonna, J. C., Tomiyama, S., & Tanaka, H. (1996). Development of a method for immobilization of non-flocculating cells in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Process Biochemistry*, 31(8), 737-744.
- Okano, K., Zhang, Q., Yoshida, S., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2010). D-lactic acid production from cello-oligosaccharides and  $\beta$ -glucan using L-LDH gene-deficient and endoglucanase-secreting *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 643-650.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J., & Kosseva, M. (2010). Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(1), 219-226.

- Pal, P., Sikder, J., Roy, S., & Giorno, L. (2009). Process intensification in lactic acid production: a review of membrane based processes. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(11), 1549-1559.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Roukas, T. (1994a). Ethanol production from non-sterilized carob pod extract by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(3), 189-194.
- Roukas, T. (1994b). Kinetics of ethanol production from carob pods extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 44(1), 49-64.
- Sirisansaneeyakul, S., Luangpipat, T., Vanichsiratana, W., Srinophakun, T., Chen, H. H. H., & Chisti, Y. (2007). Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(5), 381-391.
- Turhan, I., Bialka, K. L., Demirci, A., & Karhan, M. (2010a). Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using invertase pretreatment. *Food Biotechnology*, 24, 364-374.
- Turhan, I., Bialka, K. L., Demirci, A., & Karhan, M. (2010b). Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 101(14), 5290-5296.
- Ueno, T., Ozawa, Y., Ishikawa, M., Nakanishi, K., & Kimura, T. (2003). Lactic acid production using two food processing wastes, canned pineapple syrup and grape invertase, as substrate and enzyme. *Biotechnology Letters*, 25(7), 573-577.
- Yadav, A. K., Chaudhari, A. B., & Kothari, R. M. (2011). Bioconversion of renewable resources into lactic acid: an industrial view. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(1), 1-19.
- Zengin, E., Sağlıker, H. A., & Darici, C. (2008). Carbon mineralization of *Ceratonia siliqua* L. soils under different temperature and humidity conditions. *Turkish Journal of Botany*, 32(2), 123-127.
- Zhao, Z., Xie, X., Wang, Z., Tao, Y., Niu, X., Huang, X., Liu, L., & Li, Z. (2016). Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in mesoporous silica-based material: An efficiency continuous cell-recycle fermentation system for lactic acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(6), 645-651.

### 4.3 Conclusion

L'objectif de ce chapitre était l'utilisation des extraits sucrés obtenus à partir du déchet solide de caroube libanais en vue de produire de l'acide lactique à l'aide de *Lactobacillus rhamnosus* immobilisé dans des billes d'alginate. Il s'agissait d'une part d'étudier une alternative au bioéthanol pour l'utilisation de ces jus sucrés, et d'autre part de tester la technique d'immobilisation qui permet la réutilisation des microorganismes.

Les résultats ont montré que le pH et la concentration en alginate ont un effet significatif sur la production d'acide lactique dans la gamme étudiée, et qu'un enrichissement des extraits par une source d'azote est nécessaire afin d'améliorer les paramètres cinétiques de la fermentation lactique, ce qui est finalement en accord avec les résultats obtenus précédemment pour le bioéthanol. À partir d'extraits avec une concentration de sucre de 65 g/L, les conditions optimales ont été estimées à 2% pour la concentration d'alginate, 4 % de cellules bactériennes piégées dans des billes, 80 trs/min pour la vitesse d'agitation et le pH à 6,4. La concentration en acide lactique obtenue dans ces conditions était de 22 g/L avec un rendement de 76,9 g /g de sucre et une productivité de 1,22 g/L/ h. L'utilisation d'un prétraitement par une invertase s'est également avérée nécessaire afin de permettre au micro-organisme de consommer le saccharose et d'atteindre une concentration en acide lactique 22 à 40 g/L, mais cela a réduit le rendement par rapport aux sucres consommés. En fin de compte, les objectifs ont été atteints puisque nous avons non seulement montré que la production d'acide lactique à partir des extraits était une alternative possible au bioéthanol, mais aussi qu'il était possible de recycler les billes d'alginate au moins au cours de cinq cycles de fermentation successifs.



# Chapitre 5. Valorisation du déchet de caroube en biohydrogène

## 5.1 Introduction

Parmi les voies possibles pour la valorisation du déchet solide de caroube, une alternative est la méthanisation. Toutefois, ce n'est pas la production de méthane que nous avons retenue dans cette thèse, mais celle de biohydrogène qui est une autre voie alternative assez proche au niveau des processus et qui fait l'objet de plusieurs thèses en cours au sein de l'axe GePEB de l'Institut Pascal. Comme pour le bioéthanol, le biohydrogène s'inscrit dans un objectif « bioénergies », même si l'utilisation de l'hydrogène peut aussi s'envisager comme « matière première » par exemple pour la production d'ammoniac en substitution de celui produit par vaporeformage du méthane.

En conséquence, le but de ce chapitre est d'étudier la production de biohydrogène par fermentation sombre en utilisant directement le déchet de caroube grâce à un consortium bactérien disponible au laboratoire. Le premier objectif est de mettre en évidence la présence éventuelle d'inhibiteurs, la caroube étant riche en polyphénols, par une comparaison à l'échelle de la fiole entre le déchet et des solutions sucrées (glucose, saccharose), puis en cas de succès il s'agit également de définir rapidement à cette échelle les conditions favorables à la production d'hydrogène, en particulier le pH, avant de passer à des essais dans un fermenteur de 2 litres sur lequel d'autres paramètres (enrichissement du milieu, taille des déchets) pourront être étudiés.

## 5.2 Article soumis au journal Waste and Biomass Valorization

### BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM CAROB WASTE OF THE LEBANESE INDUSTRY BY DARK FERMENTATION

Benoit Chezeau<sup>1,3</sup>, Hajar Bahry<sup>1,2</sup>, Agnès Pons<sup>1</sup>, S. Taha<sup>2</sup>, Christophe Vial<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, Sigma Clermont, Institut Pascal, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup> Lebanese University, Doctoral school for sciences and technology, AZM Centre for research in biotechnology and its applications, Laboratory of applied biotechnology for biomolecules, biotherapy and bioprocess, El mitein street, Tripoli, Lebanon.

<sup>3</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, LABEX IMobS<sup>3</sup>, F-63000 Clermont-Ferrand, France ;

#### Abstract

The aim is to study the valorization of a solid carob waste from the Lebanese food industry using dark fermentation for second-generation biohydrogen production. Preliminary experiments were conducted in 125-mL glass bottles, followed by mixed cultures in a 2-L bioreactor with pH control. Preliminary experiments showed that the most effective initial pH was 6.0. Comparing glucose, sucrose and carob waste as the substrate, the highest hydrogen yield was 1.38 mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed for sucrose, followed by 1.32 mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed for carob waste. In the bioreactor, experiments were carried out at pH 6.0 with 22±1 g/L total sugar concentration. Experimental results showed that hydrogen productivity was enhanced using carob waste compared to glucose. Two ways of improving dark fermentation were studied. First, the importance of nitrogen source was demonstrated and a simplified medium including only iron and nitrogen was defined. Then, particle size reduction from 5.0 to 2.5 mm enhanced hydrogen yield up to 1.37 mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed, and productivity up to 0.089 mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed/h.

**Keywords:** biohydrogen, carob waste, dark fermentation process, medium composition, particle size reduction.

### 1. Introduction

The carob tree (*Ceratonia siliqua* L.), that belongs to the *Leguminosae* family, is largely cultivated in the Mediterranean regions. The carob tree is used as a decorative plant in gardens and for the reforestation of areas damaged by erosion or desertification, given its low cultivation requirements and its tolerance of poor soils (Batlle et Tous, 1997). The chemical composition of the carob fruits (pods) depends on origins, varieties and harvesting time (Albanell et al., 1991). The carob pods consist mainly of pulp and seeds which represent 90% and 10% of its total weight, respectively (Tous et al., 1995). According to many authors, some high value-added products can be obtained from the carob pod. The seed is used for the extraction of galactomannans, such as locust bean gum, contained in the endosperm (Haddarah et al., 2013), whereas the carob pulp, rich in carbohydrates (mainly sucrose, fructose and glucose) can be used to produce value-added products by fermentation, such as mannitol (Carvalho et al., 2011), ethanol (Bahry et al., 2017), citric acid (Roukas, 1999), lactic acid (Turhan et al., 2010) and pullulans (Roukas and Biliaderis, 1995).

Currently, the depletion of global fossil fuels and the associated environmental issues imply the need to find alternative forms of energy. In this context, hydrogen is considered as a very efficient and non-polluting energy carrier, and its combustion produces only water as a by-product. In addition, hydrogen exhibits a lower heating value of  $122 \text{ kJ.g}^{-1}$  and its combustion produces a high energy efficiency, 2.75 times higher than that of hydrocarbon fuels (Abbasi and Abbasi, 2011). Based on the US national hydrogen program, the contribution of hydrogen to the total energy market would be 8-10% by 2025 (Kapdan and Kargi, 2006). In the recent decades, several processes have been used to produce hydrogen including thermocatalytic reforming of hydrogen-rich substrates, water electrolysis and various biological processes (Singh and Wahid, 2015). Among these methods, the production of hydrogen through biological pathways (mainly by dark fermentation, photofermentation and biophotolysis) has attracted considerable attention because it has the potential to produce biohydrogen from low-cost residues, organic waste or even wastewater (Kotaik and Das, 2008; Hallenbeck et al., 2012; Ghimire et al., 2015).

Dark fermentation is an anaerobic process in which organic substrates are broken down by anaerobic bacteria, resulting in the production of a biogas (mainly  $\text{H}_2$  and  $\text{CO}_2$ ) and the co-production of metabolites in the liquid phase (mainly volatile fatty acids, such as acetic, butyric, propionic and lactic acids, and solvents such as ethanol). Various types of renewable waste can be used as carbon sources to produce biohydrogen, including starch, by-products from the agricultural or food industry, industrial carbohydrate wastes and waste sludge from sewage treatment plants containing cellulose (Das and Virgule, 2008, Wang and Wan, 2009, Su et al., 2009, Wang et al., 2011). These applications have the further advantage of producing an energy carrier, while treating waste at the same time (Ghimire et al., 2015).

In Lebanon, carob pulp is mainly used for the preparation of carob syrup or carob molasses denoted “dibs”, which is consumed by Lebanese population as a sweetener. This preparation consists of two maceration steps involving carob pods without seeds cut into pieces (Bahry et al., 2017). The solid by-product resulting from these macerations is discarded or used for animal feed. In addition, this by-product is still very rich in carbohydrates (44% of dry weight), and has recently demonstrated the ability to produce second-generation bioethanol using *Saccharomyces cerevisiae* (Bahry et al., 2017). Hydrogen production from carbon pulp has already been studied with success (Fountoulakis et al., 2014, Dias, 2015), but no data is available for the solid waste from Lebanese food industry.

Hence, the aim of this work was to investigate an alternative way of recovering carbohydrates from this waste by producing second-generation biohydrogen using dark fermentation. To the authors’ knowledge, biohydrogen production from the solid carob waste using this biological pathway had never been conducted yet. First, preliminary batch tests in 125-mL glass bottles were carried out to assess the feasibility of biohydrogen production using the carob waste as the substrate and to identify an optimum pH range. Then, biohydrogen production from carob waste and glucose as the substrate in a 2-L batch bioreactor were compared. Finally, two ways of improving biohydrogen production were studied: the effect of the carob particle size and the composition of the fermentation medium.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Culture preparation

#### 2.1.1. Selection and preparation of the carob

A mixture of nine carob varieties from Lebanon was used as the substrate in the dark fermentation process. The Lebanese industrial company *Salloum Ekhwan* provided the carob waste from molasse preparation in pieces with an approximate size of 5.0 mm. A portion of waste was mechanically chopped up into 2.5 mm pieces using a Universal Machine UMC-5 (*Stephan Machinery GmbH*, Germany) equipped with knives (operating conditions: 500 g of solid, 1500 rpm, 2.5 min).

#### 2.1.2. Preparation of activated sludge

Anaerobic sludge was collected from the wastewater treatment plant in Clermont-Ferrand (France). To inactivate methanogenic bacteria and hydrogen-consuming bacteria, the sludge was treated in the presence of sodium 2-bromoethanesulfonate using a method adapted from Bullock and Kristiansen (1989). After this pretreatment, the microbial consortium was inoculated in the complete culture medium described in the next section for 16 hours at 37°C.

#### 2.1.3. Culture media

Throughout all experiments, carob waste ( $44 \pm 3\%$  of carbohydrates dry weight) was used as the carbon source (Bahry et al., 2017). The composition of carbohydrates was sucrose 54% and hexose 46% (glucose and fructose). Two sizes of particles were tested: 2.5 and 5.0 mm. This solid waste was mixed with one of the three liquid culture media described below:

- The first one was the complete medium (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4.86;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.22;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.22;  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.13;  $\text{NaCl}$ , 0.8;  $\text{ZnSO}_4$ , 0.3;  $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.27;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.13;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.12;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $8.1 \cdot 10^{-2}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $8.1 \cdot 10^{-2}$ ;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $6.8 \cdot 10^{-2}$ ; Hemin from bovine,  $10^{-3}$ ; Biotine,  $2.0 \cdot 10^{-4}$ ; PABA,  $10^{-4}$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $6.0 \cdot 10^{-5}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.3 \cdot 10^{-5}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.3 \cdot 10^{-6}$ ;
- The second medium was composed of an iron source, only:  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.13 g/L;
- The third one contained simultaneously a source of iron and nitrogen:  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.13 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4.86 g/L.

The culture media were sterilized by autoclaving at  $121^\circ\text{C}$  and 1 bar for 20 minutes.

### 2.1.4. Preparation of inoculum

The inoculum was prepared in the following manner: 10 mL of treated microbial consortium was transferred into 90 mL of complete medium in a 125-mL glass bottle and incubated at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  in an oven at a stirring speed of 120 rpm for 12 hours.

### 2.1.5. Batch tests in 125-mL glass bottles

Preliminary tests were conducted to investigate the feasibility of biohydrogen production from carob waste as the substrate and to determine the effect of initial pH on biohydrogen production. For these batch tests, 125-mL glass bottles with a working volume of 100 mL were used. These glass bottles were filled with 90 mL of the complete medium and supplemented with 2.7 g of wet carob waste, leading to an initial sugar concentration of  $6.0 \pm 1$  g/L. The initial pH was adjusted using sodium carbonate. Then, the mixture was sparged with  $\text{CO}_2$  to remove traces of oxygen and achieve anaerobic conditions; then, the mixture was inoculated with 10 mL of inoculum. The glass bottles were incubated at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  in an oven at a stirring speed of 120 rpm for 16 hours.

In the first series of experiments, the effect of the carbon source on the hydrogen production efficiency was studied using different substrates at 6.0 g/L of sugars: namely, sucrose, glucose and carob waste. The initial pH value was set at 6.0. In the second series of experiments, the effect of the initial pH was assessed using three values: 5.0, 6.0, and 7.0, respectively.

### 2.1.6. Batch fermentation experiments in a 2-L bioreactor

Cultures were conducted in a 2-L bioreactor operated in the batch mode. The fermenter was filled with 1.8 L of one of the culture media described in section 2.1.3, and supplemented by 200 g of carob waste (2.5 mm or 5.0 mm size), leading to an initial sugar concentration of 22

$\pm 1$  g/L. To assess the efficiency of the process, an experiment with an initial concentration of glucose of  $22 \pm 1$  g/L was also conducted using the complete culture medium. Then, the mixture was sparged with CO<sub>2</sub> to remove traces of oxygen to achieve anaerobic conditions and inoculated with 0.2 L of inoculum. The pH was kept at  $6.0 \pm 0.05$  using a pH control system with minute additions of a 5N aqueous solution of KOH. The stirring speed was adjusted to 120 rpm and the temperature was kept at 37°C using water circulation in the jacket of the reactor.

### 2.2. Analytical methods

#### 2.2.1. Gas flow rate and chemical analysis of biogas

The volumetric gas flow rate of biogas produced was measured using a drum-type gas-meter (TG05, Ritter, Germany). The measurements were recorded and processed by the Rigamo software version 3.1 (Ritter, Germany). The chemical composition of the biogas collected from outlet stream was analyzed using a micro gas chromatograph (Agilent 3000A, Agilent Technologies, USA), equipped with two analysis channels and a thermal conductivity detector. The first one was equipped with a molecular sieve (MS5A column) to determine the amount of H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>. Argon was used as the carrier gas at a pressure of 2 bar. The operating temperatures of the injection port and the column were 80°C and 90°C, respectively. The second channel was equipped with a PoraPlot U column to determine the amount of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S. Hydrogen was used as the carrier gas at a pressure of 2 bar. The operating temperatures of the injection port and the column were 90°C and 60°C, respectively. The results were recorded and processed by the Soprane software (SRA Instruments, France). By combining volumetric gas flow rate to chemical composition data, the molar hydrogen flow rate and hydrogen production rate could be deduced.

#### 2.2.2. Chemical analyses of the liquid phase (digestate)

In the liquid phase, samples of 2 mL were taken each hour for chemical analysis. The concentration of by-products in the liquid phase (butyric acid, acetic acid, propionic acid, lactic acid and ethanol) was measured using an HPLC device (1260 Infinity Quaternary LC system, Agilent Technology, USA). This apparatus consisted in two ion-exclusion columns connected in series (Rezex ROA 300X 7.8 mm, Phenomenex, USA). The mobile phase was a solution of 2 mM sulfuric acid in ultrapure water (Millipore, France), continuously degassed. The eluent flow rate was fixed at 0.7 mL/min using a quaternary pump (HP 1100 Series, Agilent Technologies, USA). The HPLC device was equipped with an automatic injector with fixed loop (Rheodyne valve, Agilent Technology, USA) that delivers 10  $\mu$ L. By-product detection was done using a refractometer (HP 1100 series, Agilent Technologies, USA). The signals delivered by the sensor were processed by an integrator (HP 1100 series). The acquisition and integration of data were achieved through ChemStation software (HP Chem, Agilent Technologies, USA). Prior to analysis, each sample was deproteinized to prevent clogging of the column. For this purpose, 250

$\mu\text{L}$  of barium hydroxide solution ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; 0.3 M) and 250  $\mu\text{L}$  of zinc sulfate solution ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5% w/v) were added to the 2 mL samples. These compounds caused protein precipitation. After centrifugation (*Beckman Coulter*, USA) for 5 minutes at 9,600  $g$ , the supernatant was filtered using a 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose acetate filter (*Chromafil*, Germany) and placed in vials.

### 2.2.3. Residual sugar estimation

At the end of the fermentation process, the residual solid part of the carob waste was recovered and weighed. A portion was dried to quantify dry matter. The determination of residual sugar in the waste was carried out as follows: the waste was dried at 70°C for 24 hours in an oven and ground into powder. A solution was prepared by adding 50 mL of distilled water to 0.7 g of powder. The mixture was centrifuged, and the supernatant recovered for total sugar determination by the method of Dubois et al. (1956). Similarly, the digestate was subjected to the same method for the determination of residual sugar in the liquid phase. The sum of the amounts of sugar remaining in the digestate and the solid waste represent the total amount of residual sugar.

### 2.2.4. Modified Gompertz equation

The modified Gompertz equation (Eq. 1) was used to fit the cumulative hydrogen production and to estimate the kinetic parameters: the lag time  $\lambda$  and the maximum hydrogen production rate  $R_m$  (Lay et al., 1998) of the different cultures. This model is expressed as follows:

$$H = P \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_m e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

Where  $H$  is the cumulative hydrogen production (mL),  $P$  the maximum hydrogen production (mL) and  $t$  the incubation time (h). Adjustable parameters ( $P$ ,  $R_m$  and  $\lambda$ ) were estimated using the solver tool in Excel v.12.0 (*Microsoft Corp.*, USA) by minimizing the difference between predicted and experimental data.

### 2.2.5. Statistical analysis

The batch tests in 125-mL glass bottles and in the 2-L bioreactor were carried out in triplicate; the mean values were reported with confidence intervals in the tables and error bars in the figures, respectively.

## 3. Results and discussion

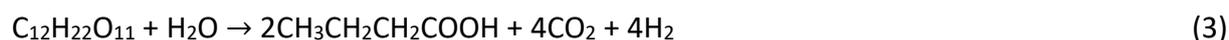
### 3.1. Feasibility of biohydrogen production using carob waste

The experiments were conducted in 125-mL volume glass bottles for a fermentation time of 16 h without pH control.

### 3.1.1. Effect of the substrate

In order to quantify the effect of the substrate used in biohydrogen production, three different carbon sources were compared (glucose, sucrose and carob waste). The initial pH value was set at 6.0 and the sugar concentration at 6.0 g/L. According to Table 5:1, it clearly appears that the highest amount of hydrogen in the gas phase was obtained with sucrose as the substrate, followed by the carob waste. Indeed, the hydrogen yield reached  $1.38 \pm 0.03$  and  $1.32 \pm 0.02$  mol H<sub>2</sub>/mol of hexose consumed with sucrose and the carob waste, respectively. In addition, hydrogen content in the biogas did not significantly differ between sucrose and waste, between 52 and 53%, which indicates that the difference resulted from the volume of biogas. Conversely, the hydrogen yield was only  $1.17 \pm 0.02$  mol H<sub>2</sub>/mol of hexose consumed with glucose, which is close to the values reported by Abdallah et al. (2016) under similar operating conditions, with a lower hydrogen concentration in the biogas (Table 5:1). These results highlight that glucose, fructose and sucrose from the carob waste can be fermented simultaneously by the microbial consortium.

For each substrate, Table 5:1 displays that butyric acid, acetic acid, and ethanol were the major by-products of the fermentative biohydrogen production process. A steeper decrease in pH was observed with the sucrose and the carob waste in comparison to glucose, which stems from higher final levels of acetic and butyric acids in Table 5:1 with these substrates. The formation of these metabolites can be justified as follows. The main reactions for sucrose fermentation can be written as follows:



In parallel, the main reactions for glucose or fructose fermentation are expressed in Eqs. (4) and (5):



In the experiments, the final molar ratio of butyric to acetic acid was about 2.3 mol/mol, which shows that the butyrate pathway prevails, *i.e.* the less efficient for biohydrogen production. It must also be pointed out that ethanol is formed without hydrogen production from glucose or sucrose:



## Valorisation du déchet de caroube en biohydrogène

**Table 5:1.** Experimental results obtained after 16 h culture in 125-mL glass bottles with different carbon sources. Initial pH: 6.0; initial sugar concentration: 6.0 g/L. Confidence intervals are based on triplicate experiments.

Substrate	Initial pH	Final pH	H <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> (mL)	H <sub>2</sub> yield (mol H <sub>2</sub> /mol of sugar consumed)	Total sugar consumption (%)	Acetic acid (mg/L)	Butyric acid (mg/L)	Ethanol (mg/L)
Glucose	6.0	5.3	49.4 ± 0.3	46 ± 2	1.17 ± 0.02	100 ± 0	317 ± 21	1053 ± 14	291 ± 22
Sucrose	6.0	5.1	52.8 ± 0.4	58 ± 4	1.38 ± 0.03	100 ± 0	340 ± 18	1178 ± 25	224 ± 9
Carob waste	6.0	5.2	52.4 ± 0.3	54 ± 2	1.32 ± 0.02	94 ± 1	332 ± 24	1121 ± 33	240 ± 11

Table 5:1 indicates that hydrogen yield is far from the theoretical value of 4 mol H<sub>2</sub>/mol hexose for the acetate pathway (Eqs. 2 and 4) and even 2 mol H<sub>2</sub>/mol hexose for the butyrate pathway (Eqs. 3 and 5). This result is, however, general in mixed cultures: from the literature on dark fermentation using sucrose (Van Ginkel et al., 2001, Lee et al., 2002, Khanal et al., 2004) or glucose (Fang and Liu, 2002; Masset et al., 2012; Abdallah et al., 2016) as a synthetic substrate, it can be inferred that supplementation, *e.g.* with starch, is obviously necessary to further increase hydrogen yield. However, this is not the objective of the present work in which only the feasibility of the valorization of the carob waste is involved.

Finally, glass bottle assays have demonstrated that fermentative hydrogen production through dark fermentation from carob waste is feasible, despite the high amount of polyphenol in the waste (Bahry et al., 2017). Moreover, the fermentation with sucrose as the substrate was more effective than that of glucose, which explains the good affinity of the microbial consortium for the carob waste in which sucrose is the main carbohydrate.

### 3.1.2. Effect of the initial pH

Batch fermentation assays were carried out at three pH values (5.0, 6.0, 7.0) and a sugar concentration of carob waste of 6.0 g/L to determine the optimum pH. Table 5:2 shows that the hydrogen yield increased from  $1.08 \pm 0.04$  to  $1.32 \pm 0.02$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed when the initial pH rose from 5.0 to 6.0. Conversely, a further increase in pH to 7.0 displayed a decrease of the hydrogen yield, equal to  $1.13 \pm 0.03$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed. Hydrogen concentration in the biogas also peaked when initial pH was 6.0 in Table 5:2. For each pH, the main soluble by-products were, first, butyric acid, and then, acetic acid and ethanol. At pH 5.0, hydrogen production was mainly accompanied by a maximum amount of ethanol and the final butyric to acetic acid molar ratio also peaked at about 2.7 mol/mol; then, with the increase of the initial pH of the medium, the metabolism was shifted to the acetate and butyrate pathways, still with a prevailing butyrate pathway. The maximum amount of volatile fatty acids was achieved when ethanol content was minimized at initial pH 6.0 (Table 5:2), which explains why the steepest decrease of pH is observed at this initial pH.

## Valorisation du déchet de caroube en biohydrogène

---

**Table 5:2.** Experimental results obtained after 16 h culture in 125-mL glass bottles at different pH values with carob waste. Initial sugar concentration: 6.0 g/L. Confidence intervals are based on triplicate experiments.

Initial pH	Final pH	H <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> (mL)	H <sub>2</sub> yield (mol H <sub>2</sub> /mol of hexose consumed)	Acetic acid (mg/L)	Butyric acid (mg/L)	Ethanol (mg/L)
5.0	4.6	47.3 ± 0.2	42 ± 2	1.08 ± 0.04	230 ± 20	920 ± 40	620 ± 20
6.0	5.2	52.4 ± 0.3	54 ± 2	1.32 ± 0.02	330 ± 20	1120 ± 30	240 ± 10
7.0	6.3	50.6 ± 0.3	45 ± 3	1.13 ± 0.03	300 ± 20	1010 ± 30	350 ± 10

As expected, pH is a key factor which can affect the hydrogenase activity, the metabolic pathway, and so, the hydrogen production (Li and Fang, 2007). A low pH can cause an increase in maintenance energy requirements to maintain the internal pH of the bacteria near neutrality (Van Ginkel and Logan, 2005); this results in a shift from acidogenesis to solventogenesis, as solventogenesis has been reported as a detoxification mechanism initiated by the cells against a low pH (Jones and Woods, 1986). In addition, experimental results summarized in Table 5:2 are also in agreement with the literature on dark fermentation in which optimum pH for biohydrogen production usually lies between 5 and 6 (Ghuimire et al., 2015). In conclusion, an initial pH of 6.0 seems the best value for the production of biohydrogen from carob waste. Therefore, a pH of 6.0 was considered for further experiments to investigate hydrogen production in a fermenter with pH control.

### 3.2. Cultures in 2-L bioreactor with pH control

To improve the fermentative hydrogen production through dark fermentation using carob waste and to be closer to industrial conditions, experiments were conducted in the 2-L volume bioreactor with pH control. The two parameters retained for this study are the particle size of carob waste and the composition of the culture medium. Fermentation using glucose was used as a control.

#### 3.2.1. Comparison between glucose and carob waste as the substrate

To assess the performance of the process, biohydrogen production with glucose and carob waste (5 mm, *i.e.* the original particle size) as substrates were compared. Figure 5:1 reveals that hydrogen production with carob waste and glucose were very close. This figure and the determination coefficient in Table 5:3 also demonstrate the good agreement between experimental data and the Gompertz model. It is highlighted by the kinetic parameters obtained in Table 5:3 by fitting the Gompertz model that the maximum hydrogen production is nearly the same in both cultures, about 7.8-7.9 L H<sub>2</sub>. The same conclusion can be drawn for hydrogen yield: Table 5:4. Summary of the hydrogen production results obtained in the dark fermentation experiments: glucose/complete medium, carob 2.5 mm/complete medium, carob 5.0 mm/complete medium, carob 5.0 mm/iron medium, carob 5.0 mm/iron + nitrogen medium. Confidence intervals are based on triplicate experiments. displays that hydrogen yield was  $1.27 \pm 0.05$  and  $1.28 \pm 0.03$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed, with carob waste and glucose, respectively. Differences emerged only on the lag time, significantly higher with glucose as the substrate than with carob waste in Figure 5:1 and in the model (Table 5:3), and in total sugar consumption that was only  $92 \pm 1\%$  with the waste, while it reached 100% with glucose (Figure 5:2). Concerning hydrogen productivity, this appeared to be slightly higher with glucose than with the waste in Figure 5:3,  $0.079 \pm 0.003$  and  $0.069 \pm 0.006$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed.h (about 1.8 and 1.55 L H<sub>2</sub>/mol hexose consumed/h), respectively.

## Valorisation du déchet de caroube en biohydrogène

---

**Table 5:3.** Summary of the kinetic parameters of the dark fermentation process obtained from the Gompertz model.

Substrate	Culture medium	Maximum hydrogen production $P$ (L)	Maximum hydrogen production rate $R_m$ (L/h)	Lag time $\lambda$ (h)	Determination coefficient $r^2$
Glucose	Complete medium	7.9	1.4	10.0	0.99
Carob 2.5 mm	Complete medium	8.5	2.3	6.7	0.99
Carob 5.0 mm	Complete medium	7.8	1.6	7.0	0.99
Carob 5.0 mm	Iron medium	5.9	0.23	9.2	0.99
Carob 5.0 mm	Iron + nitrogen medium	7.2	1.9	6.7	0.99

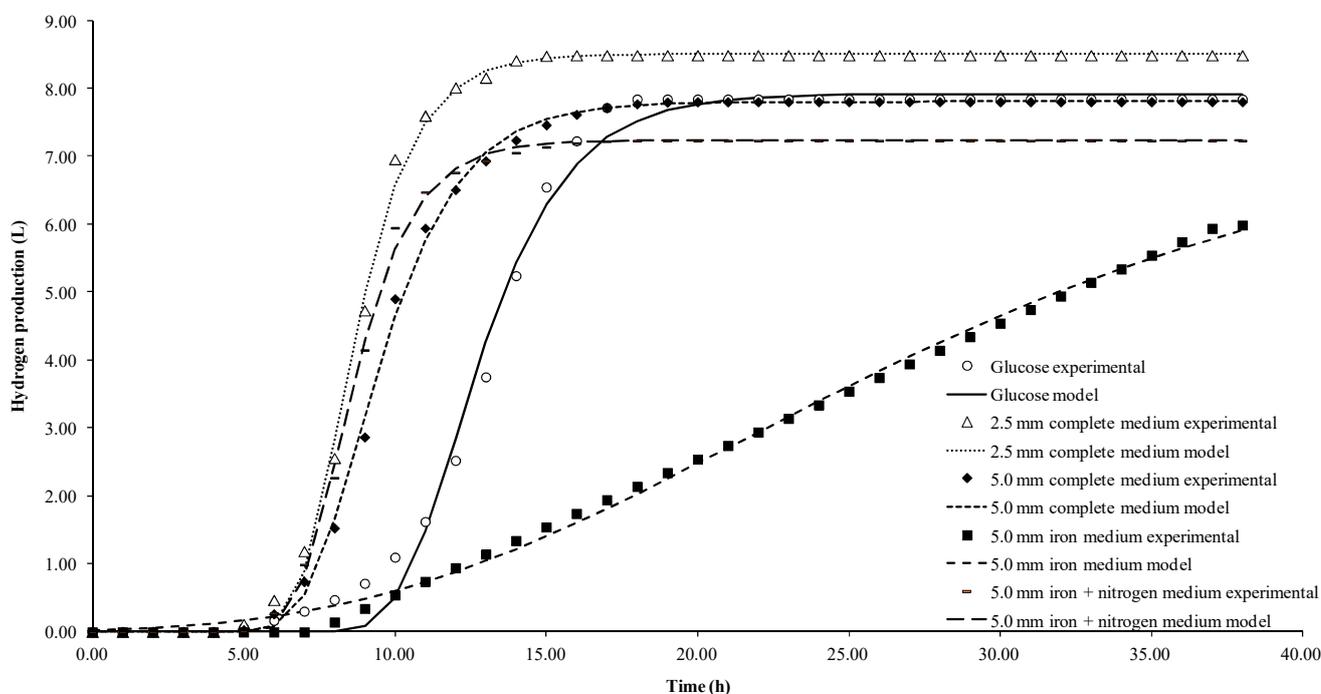
## Valorisation du déchet de caroube en biohydrogène

---

**Table 5:4.** Summary of the hydrogen production results obtained in the dark fermentation experiments: glucose/complete medium, carob 2.5 mm/complete medium, carob 5.0 mm/complete medium, carob 5.0 mm/iron medium, carob 5.0 mm/iron + nitrogen medium. Confidence intervals are based on triplicate experiments.

Substrate	Culture medium	H <sub>2</sub> yield (mol H <sub>2</sub> /mol hexose consumed)	H <sub>2</sub> productivity (mol H <sub>2</sub> /mol hexose consumed/h)	Total sugar consumption (%)
Glucose	Complete medium	1.27 ± 0.05	0.079 ± 0.003	100 ± 0
Carob 2.5 mm	Complete medium	1.36 ± 0.03	0.089 ± 0.004	94 ± 1
Carob 5.0 mm	Complete medium	1.28 ± 0.04	0.069 ± 0.006	92 ± 1
Carob 5.0 mm	Iron medium	1.15 ± 0.05	0.030 ± 0.010	85 ± 1
Carob 5.0 mm	Iron + nitrogen medium	1.22 ± 0.03	0.066 ± 0.007	90 ± 1

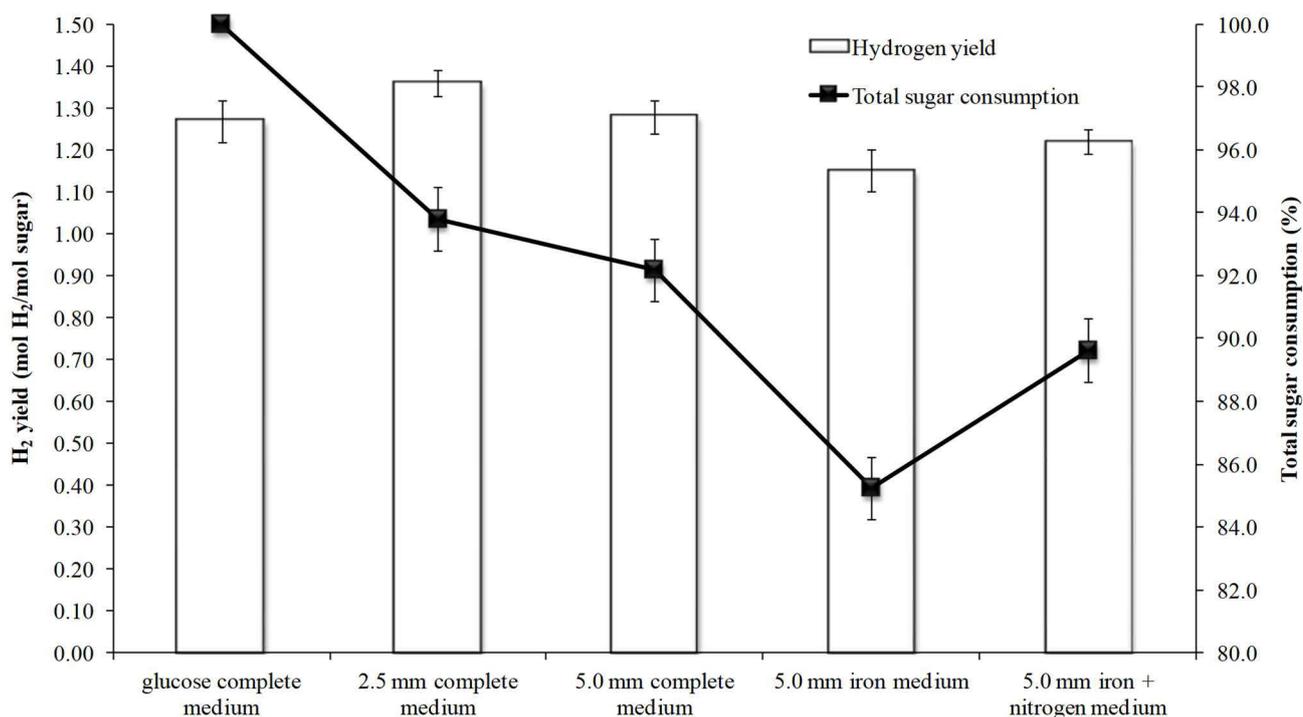
But Gompertz equation predicted a slightly higher hydrogen production rate with the waste than with glucose in Table 5:3, which confirms that the performance of both cultures is rather close.



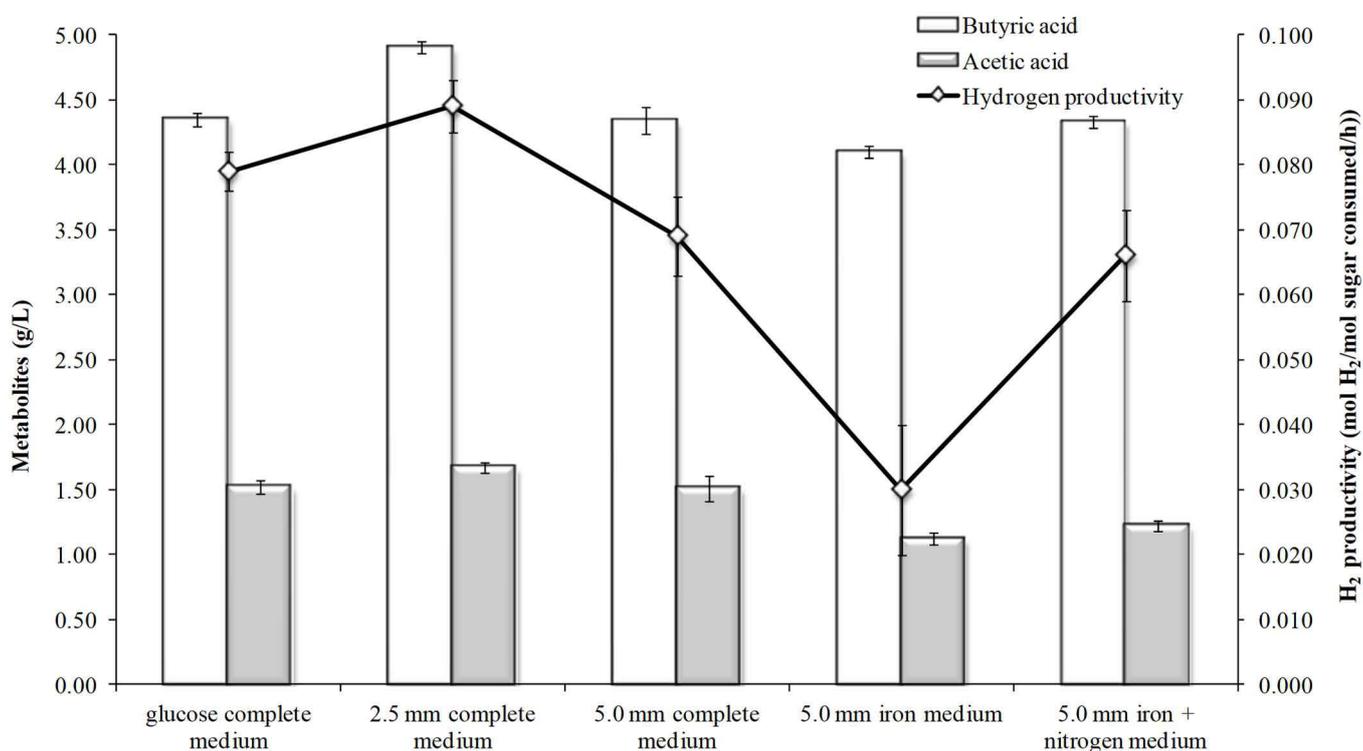
**Figure 5:1.** Cumulative hydrogen production and the corresponding Gompertz model.

The substrate degradation in the dark fermentation process was accompanied by the formation of metabolites (Figure 5:4). In this figure, their amount increased with time. Glucose consumption was plotted vs. time when carob waste was the substrate for comparison purpose with the culture using glucose as the substrate, even though sucrose is the main carbohydrate in the waste. Similar trends emerged from the curves, with a shorter lag phase using the waste. As in glass bottles, lactic and propionic acids played only a weak role and butyric acid was the main soluble by-product, followed by acetic acid and ethanol, as demonstrated by their final concentrations in Table 5:5. In this table, the final concentrations of butyric and acetic acids recorded at the end of the process were clearly confounded in both cultures, about 4.35 and 1.5 g/L for butyric acid and acetic acid, respectively. Thus, the final butyrate to acetate ratio was only about 2.0 in both cultures in the bioreactor, lower than in glass bottles probably because of pH control, which explains a higher hydrogen yield in the bioreactor: when the acetate metabolic pathway prevails for hydrogen production, the stoichiometric yield is 4 moles of H<sub>2</sub> per mole of glucose, whereas this yield is reduced to 2 moles H<sub>2</sub> per mole of glucose when the butyrate metabolic pathway predominates (Guimire et al., 2015).

## Valorisation du déchet de caroube en biohydrogène



**Figure 5.2.** Hydrogen yield and total sugar consumption obtained in the dark fermentation experiments: glucose complete medium, carob 2.5 mm complete medium, carob 5.0 mm complete medium, carob 5.0 mm iron medium, carob 5.0 mm iron + nitrogen medium. Error bars are based on triplicate experiments.



**Figure 5.3.** Hydrogen productivity and final concentration of metabolites (acetic acid and butyric acid) obtained from dark fermentation experiments: glucose complete medium, carob 2.5 mm + complete medium, carob 5.0 mm + complete medium, carob 5.0 mm + iron medium, carob 5.0 mm + iron + nitrogen medium. Error bars are based on triplicate experiments.

Finally, it must be pointed out that these results with the carob waste are all the more remarkable because the total sugar consumption was lower than with glucose. As in glass bottles, these results clearly confirm that fructose, glucose and sucrose all contribute to the production of hydrogen and volatile fatty acids in the waste, but they also highlight the benefits of pH control. Moreover, they reveal a better affinity of the microbial consortium for sucrose in comparison to glucose for enhancing hydrogen production, which compensates the lower sugar consumption and, consequently, the interest for the carob waste as a substrate for dark fermentation.

### 3.2.2. Effect of the composition of the culture medium

#### 3.2.2.1. Cultures in iron medium

To look for economic benefits, the number of compounds in the complete culture medium was reduced to define a simplified medium. Experiments were carried out, first, with the carob waste, 5.0 mm particle size, using a medium supplemented only by the iron source provided by  $\text{FeSO}_4$ , as iron is compulsory for hydrogen production: iron is known to play a significant role in the synthesis of hydrogenase and other enzymes that are essential for the metabolism of microorganisms, so that an appropriate concentration of iron promotes hydrogen production. Several studies have shown that the *in vivo* activity of hydrogenase decreases with iron depletion (Wang and Wan, 2008, Dhar et al., 2012). Yang and Shen (2006) have studied the effect of iron concentration on biohydrogen production from soluble starch. It appears that the  $\text{H}_2$  production rapidly increased by enhancing iron concentration in the range of 0 to 150 mg/L. The maximum production of hydrogen (279.9 mL  $\text{H}_2$ /g-starch) was obtained for an iron concentration of 150 mg/L of  $\text{FeSO}_4$ . Similarly, Zhang et al. (2004) have studied hydrogen production using mixed bacteria on sucrose with different iron concentrations. Their results showed that average concentrations ranging from 400 to 1600  $\text{FeSO}_4$  mg/L promote butyric acid production and hydrogen yield.

In this work, hydrogen production was, however, far higher with the complete medium compared to the iron medium (Figure 5:1). Indeed, the kinetic parameters of the Gompertz model (Table 5:3) were, consequently, far higher with the complete medium in comparison to the iron medium: the maximum hydrogen production was 7.8 L and 5.9 L, and the maximum hydrogen production rate was 1.6 L/h and 0.23 L/h for the complete medium and the iron medium, respectively. Experimental results also revealed a raise of the lag time and of the fermentation time with the iron medium in comparison to the experiments conducted with the complete medium. Indeed, the lag time and the fermentation time were 9.2 h and 38 h with the iron medium, while the lag time and the fermentation time were 7.0 h and 16 h with the complete medium. Major differences in hydrogen productivity were also observed between the two media:  $0.030 \pm 0.010$  mol  $\text{H}_2$ /mol hexose consumed.h with the iron medium, and  $0.069 \pm 0.006$  mol  $\text{H}_2$ /mol of sugar consumed/h with the complete medium (Figure 5:3). When examining hydrogen yield (Figure 5:2) and the metabolites produced (Table 5:5), hydrogen

yield was clearly lower with the iron medium ( $1.15 \pm 0.05$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed), resulting in a lower amount of butyric acid ( $4.10 \pm 0.05$  g/L), acetic acid ( $1.12 \pm 0.04$  g/L) and a lower sugar consumption, about  $85 \pm 1\%$  (Table 5:4). The final butyrate to acetate molar ratio increased to 2.5 mol/mol, which also explains the decrease of hydrogen yield.

These results can be explained by a lack of nutrients in the iron medium. The carob pod contains about 2% to 6% ashes, depending on the type of species (Avallone et al., 1997). Theoretically, the pod is rich in potassium (802 mg/kg of pulp), calcium (440 mg/kg of pulp), sodium (10 mg/kg of pulp). Also, traces of many elements are present in significant amounts: iron (2.34 mg/kg of pulp), magnesium (66.90 mg/kg of pulp), manganese (0.56 mg/kg of pulp), zinc (0.70 mg/kg of pulp), copper (0.62 mg/kg of pulp), and phosphorus (31.58 mg/kg of pulp), according to Petit and Pinilla (1995). However, many of them can have been removed from the waste and may be found in the carob molasses, so that their amount seems clearly insufficient in the waste.

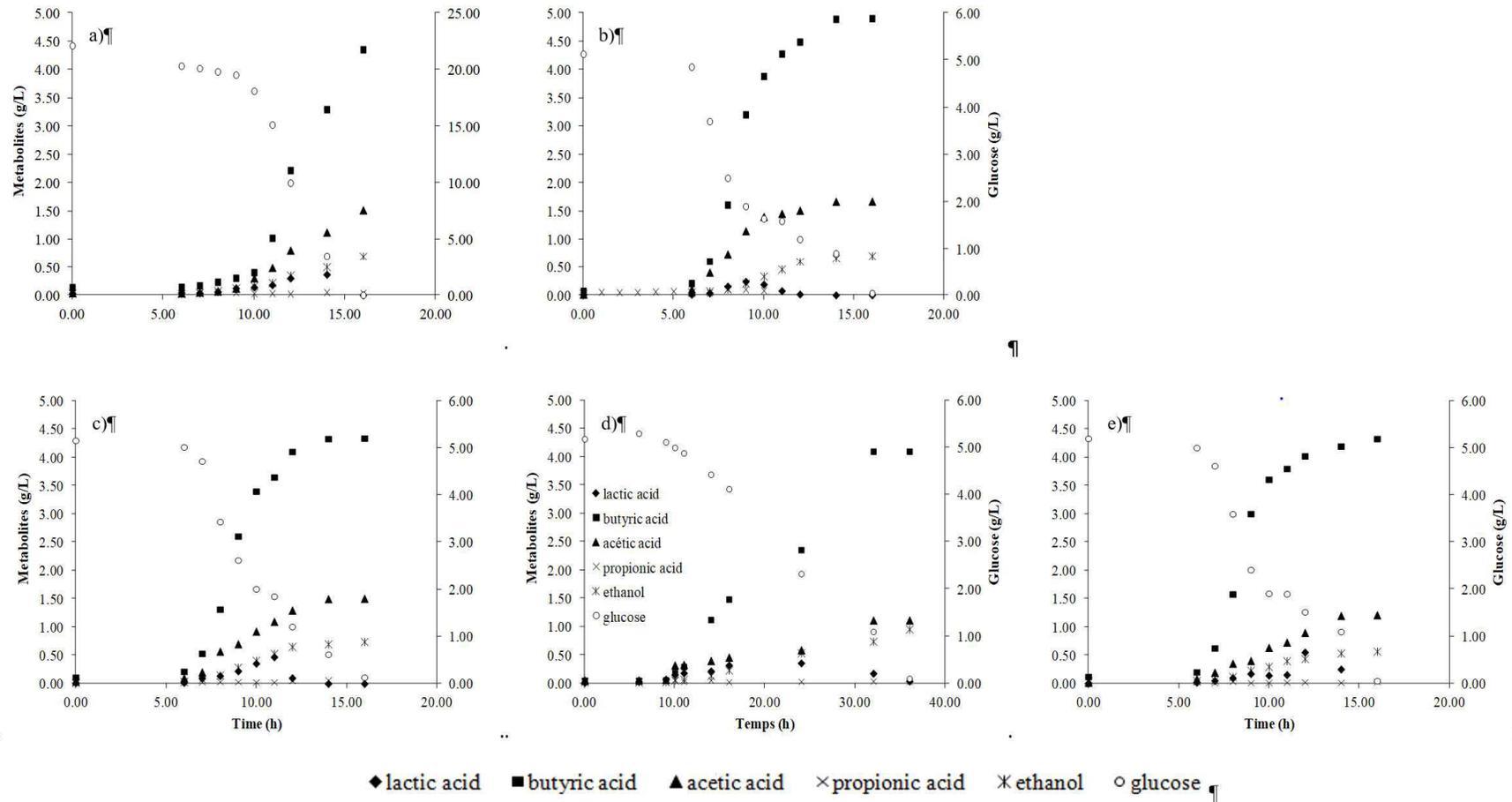
In conclusion, iron supplementation alone is not sufficient to obtain valuable results. Among all the nutrients, the absence of nitrogen source could be responsible of bacterial growth limitation and of the reduction of hydrogen production. Carob pulp and, consequently, the waste, is not rich in nitrogenous compounds which mainly consists in proteins (about 3–4% of the dry mass). Thus, the addition of nitrogen sources is the next step to define a simplified culture medium.

### *3.2.2.2 Cultures in iron and nitrogen medium*

Based on the previous results, dark fermentation process was conducted with the carob waste (5.0 mm particle size) in a medium supplemented with iron and nitrogen sources provided by FeSO<sub>4</sub> and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Maximum hydrogen production and hydrogen production rate were improved with the iron and nitrogen medium compared to the iron medium. Indeed, with a supplementation of nitrogen, the results were closer to those of the complete medium, with a maximum hydrogen production of 7.2 L (7.8 L for the complete medium) and a maximum hydrogen production rate of 1.9 L/h (1.6 L/h for the complete medium) from the Gompertz model (Table 5:3). The same stands for the lag time, with value of 6.7 h and 7.0 with the simplified and the complete medium, respectively.

## Valorisation du déchet de caroube en biohydrogène



**Figure 5:4.** Metabolites (lactic acid, butyric acid, acetic acid, propionic acid, ethanol) and substrate (glucose) evolution over fermentation time. a) Glucose complete medium, b) Carob 2.5 mm complete medium, c) Carob 5.0 mm complete medium, d) Carob 5.0 mm iron medium, e) Carob 5.0 mm iron + nitrogen medium.

## Valorisation du déchet de caroube en biohydrogène

---

**Table 5:5.** Final concentrations of the different metabolites formed in the dark fermentation experiments: glucose/complete medium, carob 2.5 mm/complete medium, carob 5.0 mm/complete medium, carob 5.0 mm/iron medium, carob 5.0 mm/iron + nitrogen medium. Confidence intervals are based on triplicate experiments.

Substrate	Culture medium	Butyric acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Propionic acid (g/L)	Lactic acid (g/L)	Ethanol (g/L)
Glucose	Complete medium	4.35 ± 0.05	1.52 ± 0.06	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.70 ± 0.05
Carob 2.5 mm	Complete medium	4.90 ± 0.04	1.67 ± 0.04	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.71 ± 0.03
Carob 5.0 mm	Complete medium	4.34 ± 0.10	1.51 ± 0.09	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.74 ± 0.03
Carob 5.0 mm	Iron medium	4.10 ± 0.05	1.12 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.90 ± 0.07
Carob 5.0 mm	Iron + nitrogen medium	4.33 ± 0.04	1.22 ± 0.06	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.57 ± 0.07

Experimental results summarized in Table 5:4 show that hydrogen productivity was improved by 120% compared to iron medium, with a productivity increase from  $0.03 \pm 0.01$  to  $0.066 \pm 0.007$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed.h. Concerning hydrogen yield (Figure 5:2) and by-products synthesis (Table 5:5), it is noteworthy that hydrogen yield is improved with the iron and nitrogen medium ( $1.22 \pm 0.03$  mol H<sub>2</sub>/mol of sugar consumed), resulting in a greater amount of butyric acid ( $4.33 \pm 0.04$  g/L), acetic acid ( $1.22 \pm 0.06$  g/L) and also a sugar consumption of  $90 \pm 1\%$  (Figure 5:2) in comparison to the iron medium. However, the butyrate to acetate molar ratio was 2.4 mol/mol, which is lower than in the iron medium, but significantly higher than in the complete medium, which impairs hydrogen production.

All these results highlight that fermentative hydrogen production has been significantly enhanced by nitrogen addition. According to many authors, nitrogen is one of the most essential nutrients for the growth of hydrogen-producing bacteria. Actually, it is a very important component for nucleic acids, proteins and enzymes (Abdallah et al., 2016). Excess in nitrogen concentrations may inhibit hydrogen production by shifting the metabolic pathway, but low concentrations might compromise the cell growth (Lin and Lay, 2004). Thus, the addition of nitrogen at an adequate level is favorable to bacterial growth and to hydrogen production (Bisaillon et al., 2006). Most of the published papers regarding the carbon/nitrogen (C/N) ratio attempted to evaluate the adequate nitrogen concentrations, but defining an optimum C/N ratio does not seem possible because of the differences between the microbial consortia, the reactor designs, the operating conditions and the biomass feedstocks in the literature which can affect this optimum. As a result, Lin et Lay (2004) investigated the effect of the C/N ratio on fermentative hydrogen production by mixed microflora; the highest hydrogen yield of 2.4 mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed was obtained with a C/N ratio of 47. In contrast, Argun et al. (2008) argued that the highest hydrogen yield of 281 mL H<sub>2</sub>/g of starch consumed was enriched with a C/N ratio of 200. In the study of Wang et al. (2008) concerning the impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by *Clostridium butyricum* W5 in pure cultures, hydrogen and biomass productions were improved by increasing NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> concentration from 0 to 1.2 g/L. Moreover, the lag time decreased from 16 to 12 hours when the concentration of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> increased, indicating that a rapid growth rate of the cells required a high concentration of nitrogen. Finally, in the review of Wang and Wan (2009), it was summarized from six studies that the optimal nitrogen concentration during the dark fermentation process could vary from 0.01 to 7 g N/L.

Both the literature and experimental data highlight that nitrogen, as iron, is a key nutrient in dark fermentation and is essential for the growth of bacteria and for the kinetics of hydrogen production. Data from Table 5:4 clearly demonstrates that the carob waste does not contain enough nitrogen. This low nitrogen concentration in the iron medium leads to nutritional deficiency, affecting bacterial growth and so, hydrogen productivity and yield. If the results obtained with the iron + nitrogen medium are compared with those of the complete medium in Table 5:4 and Table 5:5, total sugar consumption, and hydrogen yield and productivity are

rather close if experimental error is accounted for, which highlights that the simplified medium including only iron and nitrogen could be used with the carob waste for further economic benefits, provided the supplementation in iron and nitrogen is optimized. This is particularly interesting for a direct valorization of carob waste in the Lebanese food industry which prepares carob molasses and is not used to conducting dark fermentation and because both medium preparation and processing can be simplified.

As a conclusion, further work is necessary to optimize the composition of simplified nitrogen + iron medium when carob waste is used as the substrate. Now, another way to improve hydrogen production, while maintaining the economic and ecological sustainability of the process, can be investigated: the size of waste particles.

### *3.2.3. Effect of the particle size of carob waste*

To study the size effect of fresh carob waste on biohydrogen production, two sizes were used: 5.0 mm was the original size of the waste, and 2.5 mm was the size obtained after mechanical cutting. Cultures were conducted using the complete medium.

According to Figure 5:1, the amount of biohydrogen was higher with 2.5 mm particles than with 5.0 mm particles using the carob waste as the substrate and, therefore, higher than with glucose. Thus, the kinetic parameters of the Gompertz model (Table 5:3) revealed a maximum hydrogen production of 8.5 L with 2.5 mm particles size and 7.8 L with 5.0 mm particle size. Concerning the lag time, it was 6.7 h for a particle size of 2.5 mm, while it was about 7.0 h for a particle size of 5.0 mm, even though this does not emerge from Figure 5:1. The hydrogen yield obtained with 5.0 mm particles was  $1.28 \pm 0.04$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed, whereas this value was  $1.37 \pm 0.03$  with the size of 2.5 mm (Figure 5:2), which highlights a small but statistically significant increase. Concerning the productivity in H<sub>2</sub>, the same trend was observed. The H<sub>2</sub> productivity was, indeed,  $0.089 \pm 0.004$  and  $0.069 \pm 0.006$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed.h with the 2.5 mm and 5.0 mm particles, respectively (Figure 5:3). Moreover, higher amounts of butyric and acetic acids were recorded at the end of the process for the 2.5 mm particles compared to the 5.0 mm particles (Figure 5:4), even though the final molar ratio of butyric to acetic acid remained close to 2 mol/mol with 5.0 mm particles. The concentrations of metabolites produced were, therefore,  $4.34 \pm 0.10$  g/L of butyric acid and  $1.51 \pm 0.09$  g/L of acetic acid with 5.0 mm particles, and  $4.90 \pm 0.04$  g/L of butyric acid and  $1.67 \pm 0.04$  g/L of acetic acid with 2.5 mm particles. However, for the 2.5 mm and 5.0 mm particles, the total sugar consumed was  $94 \pm 1\%$  and  $92 \pm 1\%$ , respectively (Figure 5:2), which may not completely explain the difference in hydrogen productivity.

These results agree with literature data. In a study on biohydrogen production from wheat straw, particle size was determined to be a key factor (Yuan et al., 2011): all the contents of the major products (hydrogen, acetate and butyrate) increased with the decrease of the particle size and the best results were observed with 1.0 mm particles among the three particle

sizes tested: 1.0; 5.0 and 10.0 mm. Similarly, Chyi and Dague (1994) demonstrated that 20  $\mu\text{m}$  cellulose particles led to higher conversion efficiency than 50  $\mu\text{m}$  particles. In the same way, cumulative hydrogen production from 1.0 mm rice straw particles was 11% and 14% higher than the values obtained with 5.0 mm and 10.0 mm particles, respectively (Chen et al., 2012).

Actually, the reduction of the particle size could increase the effective surface area and the extraction of sugars which are more readily available as a substrate for microorganisms (Licari et al., 2016).

More generally, the production of biohydrogen from lignocellulosic waste and biomass feedstocks involves three main processes: namely, pretreatment, anaerobic hydrolysis and fermentation (Kratky and Jirout, 2011). The pretreatment is an important step which is aimed at increasing the accessibility to carbohydrates for the microorganisms (Kumar et al., 2009). The energy consumption of the mechanical size reduction depends of the structure, the moisture content and the chemical composition of the biomass (Barakat et al., 2013); but it can represent 33% of the total electric power consumption of the process (Schell and Hardwood, 1994). It clearly appears that the specific energy requirements (SER) for grinding increase as the particle size of the biological material is reduced. According to Mani et al. (2004), the SER to reduce 7.7 mm wheat stalks using screen sizes of 0.8, 1.6 and 3.2 mm were 45.3, 43.6 and 24.7 kWh/t. In the same way, the SER for grinding 7.2 mm corn stover using screen sizes of 0.8, 1.6 and 3.2 mm were 34.3, 19.8 and 11.0 kWh/t. Various pretreatment methods have been developed, including chemical, mechanical, biological and physicochemical or a combination of these methods (Barakat et al., 2013). Most biomass pretreatment methods are based on the use of expensive chemical processes which need large quantities of water and chemicals, and generate effluents needing downstream treatments (Barakat et al., 2014), but size reduction technologies must always be applied on solid waste.

In conclusion, size reduction improves hydrogen yield and productivity in this study, even though total sugar consumption increases only slightly, which means that an easier access to the sugar accelerates the production of hydrogen from the acetic and butyric pathways in the same proportion, while ethanol and propanoic acid pathways which do not produce hydrogen are not significantly affected (Table 5:5). In addition, comparing to various pretreatment methods, this requires no chemicals and is environmentally friendly. However, optimizing size reduction is a hard task because other objectives than hydrogen yield must be studied: in practice, this must account for techno-economic aspects: the economic and ecological sustainability of this process not only depends on biohydrogen production, but also on the downstream process for the valorization of volatile fatty acids. In this purpose, size reduction from 5.0 to 2.5 mm is not an expensive step at industrial scale and it remains affordable when the final size is above a few millimeters. Conversely, size reduction technology becomes often unaffordable when the final size is 1 mm or below (Miao et al., 2011). At the present stage, size reduction to 2.5 mm particles can be advised for carob waste, but further work is required to

determine the optimum particle size, accounting simultaneously for economic, technological and ecological aspects.

#### 4. Conclusion

Carob was used for second-generation biohydrogen production through dark fermentation process. First, the effect of the carbon sources (glucose, sucrose and carob waste) and pH (5.0, 6.0, 7.0) on the hydrogen yield was investigated in 125-mL glass bottles without pH control. The highest hydrogen yield, 1.38 mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed, was reported for sucrose, but the carob waste provided a very close value of 1.32 mol/mol. The initial pH of 6.0 was found as the most effective with the carob waste. Thus, the feasibility of dark fermentation using the carob waste as the substrate was finally demonstrated.

Secondly, batch cultures in bioreactor under pH control highlighted that the respective performances of the carob waste and glucose as a substrate were very close, which demonstrated that sucrose, glucose and fructose could be used at the same time by the microbial consortium for hydrogen production. The butyrate metabolic pathway was always prevailing and the amount of volatile fatty acids in the digestate always increased when hydrogen production increased. Two ways of improving the fermentative hydrogen production were investigated: namely, the composition of the culture medium and the reduction of waste particle size. Experimental results highlighted that a nitrogen source with iron was essential for the metabolism of the hydrogen producing bacteria, resulting in higher hydrogen yield and productivity compared to the medium without nitrogen. These results were also close to those obtained with the complete medium. As a conclusion, conducting the dark fermentation process in a culture medium supplemented by iron and nitrogen sources appears to be simple and to achieve a good ecological-economic compromise at the industrial scale. In parallel, the highest hydrogen yield (0.089 mol H<sub>2</sub>/mol hexose consumed.h) and hydrogen productivity (1.37 mol H<sub>2</sub>/mol of sugar consumed) were achieved when size reduction from 5.0 to 2.5 mm was applied to the waste in the complete medium, with a slight increase of total sugar consumption from 92 to 94%. From these experimental results, it emerges that particle size reduction accelerates the metabolic pathways which produce hydrogen in comparison to ethanol and propionate pathways which do not produce hydrogen. Thus, particle size reduction constitutes another simple way to improve the process, as carob pods must be cut to remove the seeds and prepare carob molasses. As a conclusion, these two ways of improving dark fermentation with carob waste are promising, but economic assessment is still compulsory to determine the optimum particle size by accounting not only hydrogen production, but also techno-economic and environmental aspects. Further work is necessary to achieve optimized conditions for the Lebanese food industry.

### Acknowledgements

LABEX IMobS<sup>3</sup> *Innovative Mobility: Smart and Sustainable Solutions* is gratefully acknowledged.

### References

- Abbasi, T., S.A. Abbasi. "Renewable" hydrogen: Prospects and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (2011), pp. 3034-3040.
- Abdallah, R., H. Djelal, A. Amrane, W. Sayed, F. Fourcade, T. Labasque, F. Geneste, S. Taha, D. Floner. Dark fermentative hydrogen production by anaerobic sludge growing on glucose and ammonium resulting from nitrate electroreduction. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41 (2016), pp. 5445-5455.
- Albanell, E., G. Caja, J. Plaixats. Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles. In: J.L. Tisserand (ed.), X. Alibés (ed.). *Fourrages et Sous-Produits Méditerranéens*, (1991), pp. 135-136.
- Argun, H., F. Kargi, I. Kapdan, R. Oztekin. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (2008), pp. 1813-1819.
- Avallone, R., M. Plessi, M. Baraldi, A. Monzani. Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10 (1997), pp. 166-172.
- Bahry, H., A. Pons, R. Abdallah, G. Pierre, C. Delattre, N. Fayad, S. Taha, C. Vial. Valorization of carob waste: Definition of a second-generation bioethanol production process. *Bioresource Technology*, 235 (2017), pp. 25-34.
- Barakat, A., H. de Vries, X. Rouau. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 134 (2013), pp. 362-373.
- Barakat, A., C. Mayer-Laigle, A. Solhy, R.A.D. Arancon, H. de Vries, R. Luque. Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. *Royal Society of Chemistry Advances*, 89 (2014), pp. 48109-48127.
- Battle, I., J. Tous. Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*, (1997), p. 17.

- Bisaillon, A., J. Turcot, P.C. Hallenbeck. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (2006), pp. 1504-1508.
- Bullock, J.D., B. Kristiansen, *Basic Biotechnology*. Saunders College Publishing/Harcourt Brace, Academic Press, London, (1987).
- Carvalho, F., P. Moniz, L.C. Duarte, M.P. Esteves, F.M. Girio. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38 (2011), pp. 221-227.
- Chen, C.C., Y.S. Chuang, C.Y. Lin, C.H. Lay, B. Sen. Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (2012), pp. 15540-15546.
- Chyi, Y.T., R.R. Dague. Effects of particulate size in anaerobic acidogenesis using cellulose as a sole carbon source. *Water Environment Research*, 66 (1994), pp. 670-678.
- Das, D., T.N. Veziroglu. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (2008), pp. 6046-6057.
- Dhar, B.R., E. Elbeshbishy, G. Nakhla. Influence of iron on sulfide inhibition in dark biohydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 126 (2012), pp. 123-130.
- Dias, P.M.F. Hydrogen production by *Clostridium butyricum*: improving production yields and assessing changes in the cell lipid profile during adaptation to furans and gallic acid. *Thesis dissertation from Higher Technical Institute of Lisbon, Portugal* (2015).
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (1956), pp. 350-356.
- Fang, H.H.P., H. Liu. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 82 (2002), pp. 87-93.
- Fountoulakis, M.S., S.N. Dokianakis, G. Daskalakis, T. Manios. Fermentative hydrogen production from carob pod: A typical Mediterranean forest fruit. *Waste and Biomass Valorization*, 5 (2014), pp. 799-805.
- Ghimire, A., L. Frunzo, F. Pirozzi, E. Trably, R. Escudie, P.N.L. Lens, G. Esposito. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144 (2015), pp. 73-95.
- Haddarah, A., A. Ismail, A. Bassal, T. Hamieh, I. Ioannou, M. Ghouli. Morphological and chemical variability of Lebanese carob varieties. *European Scientific Journal*, 9 (2013), pp. 353-359.

- Hallenbeck, P.C., M. Abo-Hashesh, D. Ghosh. Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 110 (2012), pp. 1-9.
- Jones, D.T., D.R. Woods. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 50 (1986), pp. 484-524.
- Kapdan, I.K., F. Kargi. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (2006), pp. 569-582.
- Khanal, S.K., W.H. Chen, L. Li, S. Sung. Biological hydrogen production: Effect of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (2004), pp. 1123-1131.
- Kotay, S.M., D. Das. Biohydrogen as a renewable energy resource – prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (2008), pp. 258-263.
- Kratky, L., T. Jirout. Biomass size reduction machines for enhancing biogas production. *Chemical Engineering Technology*, 34 (2011), pp. 391-399.
- Kumar, P., D.M. Barrett, M.J. Delwiche, P. Stoeve. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (2009), pp. 3713-3729.
- Lay J.J., Y.Y. Li, T. Noike, Mathematical model for methane production from landfill bioreactor. *Journal of Environmental Engineering*, 24 (1998), pp. 730-736.
- Lee, Y., T. Miyahara, T. Noike. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77 (2002), pp. 694–698.
- Li, C., H.H.P. Fang. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37 (2007), pp. 1–39.
- Licari, A., F. Monlau, A. Solhy, P. Buche, A. Barakat. Comparison of various milling modes combined to the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioenergy production: Glucose yield and energy efficiency. *Energy*, 102 (2016), pp. 335-342.
- Lin, C.Y., C.H. Lay. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29 (2004), pp. 41-45.
- Mani, S., L.G. Tabil, S. Sokhansanj. Grinding performance and physical properties of wheat and barley straws, corn stover and switchgrass. *Biomass & Bioenergy*, 27 (2004), pp. 339-352.
- Masset, J., M. Calusinska, C. Hamilton, S. Hilgsmann, B. Joris, A. Wilmotte, P. Thonart. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium spp.* *Biotechnology for biofuels*, 5 (2012), pp. 1-15.

- Miao, Z., T.E. Grift, A.C. Hansen, K.C. Ting. Energy requirement for comminution of biomass in relation to particle physical properties. *Industrial Crops and Products*, 33 (2011), pp. 504-513.
- Petit, M.D., J.M. Pinilla. Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *LWT-Food Science and Technology*, 28 (1995), pp. 145-152.
- Roukas, T. Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 24 (1999), pp. 54-59.
- Roukas, T., C.G. Biliaderis. Evolution of carob pod as a substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55 (1995), pp. 27-44.
- Schell, D.J., C. Harwood. Milling of lignocellulosic biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45/46 (1994), pp. 159-168.
- Singh, L., Z.A. Wahid. Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: a review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21 (2015), pp. 70-80.
- Su, H., J. Cheng, J. Zhou, W. Song, K. Cen. Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (2009), pp. 1780-1786.
- Tous, J., L. Batlle, A. Romero. Prospección de variedades de algarrobo en Andalucía. *Información Técnica Económica Agraria*, 3 (1995), pp. 164-174.
- Turhan, I., K.L. Bialka, A. Demirci, M. Karhan. Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using invertase pretreatment. *Journal Food Biotechnology*, 24 (2010), pp. 364-374.
- Van Ginkel, S.W., B. Logan. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*, 39 (2005), pp. 3819-3826.
- Van Ginkel, S., S. Sung, J.J. Lay. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science & Technology*, 35 (2001), pp. 4726-4730.
- Wang, A., D. Sun, G. Cao, H. Wang, N. Ren, W.M. Wu, B.E. Logan. Integrated hydrogen production processes from cellulose by combining dark fermentation, microbial fuel cells, and a microbial electrolysis cell. *Bioresource Technology*, 102 (2011), pp. 4137-4143.
- Wang, J., W. Wan. Effect of Fe<sup>2+</sup> concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (2008), pp. 1215-1220.
- Wang, J., W. Wan. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (2009), pp. 799-811.

Wang, X., B. Jin, D. Mulcahy. Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (2008), pp. 4998-5005.

Yang, H., J. Shen. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (2006), pp. 2137-2146.

Yuan, X., X. Shi, P. Zhang, Y. Wei, R. Guo, L. Wang. Anaerobic biohydrogen production from wheat stalk by mixed microflora: kinetic model and particle size influence. *Bioresource Technology*, 102 (2011), pp. 9007-9012.

Zhang, Y., G. Liu, J. Shen. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30 (2004), pp. 855-860.

### 5.3 Conclusion

Finalement, nos résultats démontrent que le déchet de caroube constitue également un bon substrat pour la fermentation sombre et la production de biohydrogène de deuxième génération. Même à l'échelle de la fiole, une quantité d'hydrogène plus importante a été obtenue à partir du déchet qu'avec du glucose, en accord avec le fait que le saccharose qui donne encore de meilleurs résultats est le principal sucre présent dans le déchet. Aussi, un pH de 6 a été retenu, bien qu'une optimisation plus précise du pH soit encore nécessaire dans le futur.

Dans un premier temps, nous avons cherché à utiliser un milieu de culture simplifié. Comme précédemment, l'utilisation du déchet seul conduit à une carence en azote. Toutefois, dans le cas de la fermentation sombre, il est connu que des ajouts de fer sont nécessaires afin de favoriser la production d'hydrogène. Avec un milieu simplifié contenant cependant de l'azote et du fer, la production maximale atteinte en fermenteur a été de 1,9 L/h avec une phase de latence d'environ 7 h (pour le milieu complet et le milieu réduit avec le fer et l'azote). Enfin, nous avons également montré la dépendance des résultats au prétraitement par broyage puisque le rendement en hydrogène a augmenté avec la réduction des tailles de particules de 5 mm ( $1,28 \pm 0,04$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consommé) à 2,5 mm ( $1,37 \pm 0,03$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consommé).

En fin de compte, ces résultats confirment qu'il existe une très large gamme de possibilités permettant de valoriser le déchet solide de caroube par voie fermentaire, soit par extraction des sucres, soit en utilisation directe.



# Chapitre 6. Utilisation des extraits de déchet de caroube comme substrat dans une application de traitement des eaux par microalgues

## 6.1 Introduction

Les micropolluants présents dans les eaux de surface et dans les eaux usées font l'objet de toutes les attentions depuis une petite dizaine d'années, en particulier les micropolluants pharmaceutiques. Si leur toxicité, aux doses auxquelles ils sont observés, est loin d'être avérée, elle fait néanmoins l'objet de débats sur de possibles normes, et quelques unités de traitement par ozonation destinées à éliminer spécifiquement ces micropolluants ont été installées en France dans des stations de traitement des eaux usées. Parmi les micropolluants pharmaceutiques, le diclofénac est l'un des plus répandus, à la fois parce qu'il est très utilisé, mais aussi par sa résistance à la dégradation dans l'environnement. Si certains de ces micropolluants sont faiblement éliminés par les boues activées, d'autres micro-organismes semblent plus performants comme les champignons et les algues. Parmi les algues vertes, *Ankistrodesmus braunii* est connu pour dégrader l'éthinylestradiol et l'acide cinapique.

Dans cette thèse, l'objectif est d'utiliser les extraits sucrés issus du déchet de caroube comme substrat pour la culture de la microalgue *Ankistrodesmus braunii* en utilisant les résultats sur l'extraction du chapitre 3, avec pour finalité l'élimination du diclofénac. Dans ce but, des essais préliminaires seront effectués afin de déterminer la concentration en sucres nécessaire pour assurer la croissance de microalgue (5, 10 and 26 g/L). Dans un premier temps, les différences observées entre les cultures d'*Ankistrodesmus braunii* en milieu mixotrophe (jus de caroube) et en milieu autotrophe (protéoses peptones) en présence et en absence du diclofénac seront analysées. Puis, l'effet de la concentration initiale en diclofénac sur la croissance d'algue et sur son élimination sera étudié dans les deux milieux de culture pour trois concentrations en polluant (0, 10 et 20 mg/L). Ensuite, l'effet de la concentration en algues sur l'élimination du polluant sera étudié en comparant deux concentrations d'inoculum ( $10^6$  and  $10^5$  cellules/mL). Enfin, afin de mieux comprendre les mécanismes d'élimination du diclofénac, la composition du milieu intracellulaire des algues sera analysée en fin de traitement, de même que celle de la phase liquide par HPLC et UHPLC/MS/MS.

L'ensemble des résultats est présenté, comme dans les chapitres précédents, sous la forme d'une publication, bien que celle-ci nécessite encore des améliorations pour atteindre les standards correspondant à une publication dans un journal international.

## 6.2 Article en cours de finalisation

### REMOVAL OF DICLOFENAC BY THE GREEN ALGAE *ANKISTRODESMUS BRAUNII* USING CAROB WASTE AS THE SUBSTRATE

#### Abstract

The removal of diclofenac (DCF), which is among the most common pharmaceutical pollutants detected in wastewater, was investigated using the green microalgae *Ankistrodesmus braunii* with a carob waste from the Lebanese industry as the carbon source in mixotrophic cultures. The influence of the composition of the culture medium was analyzed first, comparing autotrophic and mixotrophic culture conditions, and then analyzing the effect of the amount of sugar from carob waste in mixotrophy. The respective influences of the initial DCF concentration, and of the inoculum concentration were also investigated, with and without DCF, both on algal growth and DCF removal. Experimental results demonstrated that the presence of DCF in the culture media did not inhibit algal growth, while mixotrophic conditions enhanced *A. braunii* growth up to 10 g/L total sugars. Thus, *A. braunii* was able to reach up to 90% DCF removal under mixotrophic culture conditions due to the enhanced biomass production when other carbon sources were nearly exhausted. Finally, the mechanism of DCF removal was analyzed, showing that bioaccumulation of DCF in the algae and biodegradation acted in parallel.

**Keywords:** carob waste, diclofenac, micropollutant, phycoremediation, water treatment.

## **1. Introduction**

The presence of pharmaceutical pollutants in water has gained large attention in recent years because these may disrupt the aquatic ecosystem, be harmful for the flora and the fauna and, also be hazardous for human health. Pharmaceuticals were, indeed, detected in ground and surface waters, drinking water, tap water, ocean sediments and soils in the last decade. Many factors contribute to this pollution, including not only domestic, hospital and industrial discharge, but also excretion via feces and urine of non-metabolized molecules. Another reason is also their incomplete elimination in wastewater treatments plants (see, e.g., Andreatti et al., 2003). Many recent studies have shown evidence of the long-term negative impacts of chronic pharmaceutical exposure on organisms and living populations (see, e.g., Macherius et al., 2014), which explains why pharmaceutical micropollutants constitute, now, a water quality concern.

Diclofenac (DCF) is a non-steroidal anti-inflammatory drug and is one of the most widely consumed drugs in the world; its consumption varies between countries between 195 and 940 mg per capita and year. Several previous studies had demonstrated its adverse effects on trout by accumulating in the liver, gills and muscle tissue that could cause cytological alterations even at a concentration of  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Schwaiger et al., 2004; Triebkorn et al., 2004). Thus, DCF seems able to interact with other inorganic contaminants in the environment, especially in wastewater treatment plants, such as metals and finally, form compounds with more anti-inflammatory activity. Therefore, numerous studies have been carried out on the elimination of this micropollutant by various methods, including adsorption on activated carbon, photo-degradation, or ozonation (Buser et al., 1998; Zwiener and Frimmel, 2000; Poiger et al., 2001; Perez-Estrada et al., 2005; Schmitt-Jansen et al., 2007; Antunes et al., 2012; Cherik et al., 2015). However, chemical oxidation methods exhibit many drawbacks: reaction conditions may be difficult to achieve (pH, temperature...), the generation of secondary pollutants is likely to occur, and they often need high operational costs (Escapa et al., 2015). As a result, cheaper biological treatment methods are preferable. Microalgae emerge as an attractive and versatile way for the elimination of pollutants by photo-oxidation and/or biodegradation (Hom-Diaz et al., 2015) and is considered an environment friendly and inexpensive choice. In addition, wastewater can be a source of nutrients for microalgae (Escapa et al., 2015).

Several studies have already investigated the elimination of pharmaceuticals by algae, *i.e.* phycoremediation. For example, Peng et al. (2013) used *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* to study the biotransformation of progesterone and norgestrel. Similarly, Escapa et al. (2015) analyzed the removal of salicylic acid and paracetamol by *Chlorella sorokiniana*, and then, Escapa et al. (2016) studied the abatement of DCF by three types of algae: *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. A key issue is that algae cultivation is very slow under autotrophic conditions, but recent contributions on microalgae cultivation,

for example for bioenergy purpose, have shown that have they can compete for glucose with heterotrophic bacteria (Kumjunke et al., 2008) and that mixotrophic conditions using wastewater may be an attractive alternative (Bhatnagar et al., 2011) because it enhances algal growth without imparising economic sustainability.

Carob is a fruit widely utilized in Lebanon for the production of carob molasses used as commercial sweeteners, and widely consumed by the Lebanese population. The preparation process is traditional and based on water extraction at room temperature, prior to concentration by evaporation. Process wastewater must be treated, and the solid waste of the extraction stage has not been valorized up to now, even though it remains rich in sugar, in particular glucose, fructose and sucrose (Bahry et al., 2017).

The aim of this work was, therefore, to investigate the ability of the microalgae *Ankistrodesmus braunii* to remove DCF in mixotrophic culture conditions using extracts from the carob waste as a carbon source. First, a comparison with the same treatment under autotrophic conditions was also carried out. Then, the respective effects of the initial concentration of *A. braunii* and of DCF were studied in both culture conditions, so as to analyze the mechanisms of DCF removal.

## **2. Materials and methods**

The microalgae used in this study are *Ankistrodesmus braunii* CCAP 202/7a. These algae are known for their ability to treat pollutants. *A. braunii* is a unicellular green microalga. Cells are solitary or vaguely grouped into bundles or clumps. They are shaped like needles, croissants, or narrow cones towards the extremity, sometimes straight, often curved.

### *2.1. Culture medium*

Commercial-grade DCF was always used in the experiments (Sigma-Aldrich, USA). Two culture media were compared to assess the ability of *Ankistrodesmus braunii* algae to grow, and then, to remove diclofenac, under autotrophic and mixotrophic conditions, respectively.

The first medium is a proteose-peptone medium (PP) for autotrophic cultures, the composition of which is as follows: 20 mL of each stock solution (MgSO<sub>4</sub>, 1.0 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g/L; KNO<sub>3</sub>, 10.0 g/L) and 1 g of proteose-peptone powder (Oxoid LP0085, U.-K.).

The second medium corresponds to mixotrophic conditions: organic carbon from carob waste (glucose, fructose and sucrose) is the source of carbon used by *A. braunii*. Different concentrations of total sugars (5 g/L, 10 g/L, 26 g/L) were used to determine the optimal concentration for algal growth. For this purpose, a sugar extraction step was necessary: a mass ratio of water to fresh carob by-product (L/S=5) was used for extracting sugars from a solid by-product with a characteristic size 0.5 cm at ambient temperature, without stirring for 30 minutes. This

## Utilisation des extraits de déchet de caroube comme substrat dans une application de traitement des eaux par microalgues

---

extraction condition provided a total sugar concentration of 26 g/L in the extracts. The supernatant could, then, be centrifuged (Biofuge Primor centrifuge, Heraeus, Germany) at 8,900 *g* for 10 minutes at 4°C. Two dilutions of initial juice were carried out to obtain two final concentrations of 10 and 5 g/L, respectively. The carob by-product juice resulting from the extraction stage was supplemented with MgSO<sub>4</sub> (0.3 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.3 g/L) and yeast extract (2.0 g/L). The pH of each medium could be adjusted to 7 using a 1 N NaOH aqueous solution, and then sterilized by autoclaving at 120°C for 20 minutes.

### 2.2. Precultures

The precultures were carried out in a 100 mL Erlenmeyer flask. 5 mL of the CCAP algae suspension was inoculated in 50 mL of the peptone-proteose medium. The cultures were kept to grow in a stove (Infros, Switzerland), at 23°C, irradiance 100  $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  with 16 h of light and 8 h of obscurity per day. After the preculture reached the exponential phase, 20 mL were used to inoculate 50 mL of sterile medium of carob by-product juice of concentration 26 g/L (phase of adaptation of the algae *Ankistrodesmus braunii* in the medium where the carbon source was the organic source: *i.e.* glucose, fructose and sucrose).

### 2.3. Cultures and algal growth monitoring

To investigate the removal of DCF by the algae, the experiments were carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks using a working volume of 250 mL. The DCF was added to both media at two initial concentrations of 10 and 20 mg/L and, then, the media were autoclaved at 120°C for 20 minutes. Finally, the Erlenmeyer was inoculated by the algal preculture to reach the two initial concentrations of algae of 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> cells/mL, respectively. All the experiments were carried out in triplicate.

The growth of *Ankistrodesmus braunii* in the culture media in the absence and presence of DCF was monitored using microscopic observation (CX41 microscope, Olympus, Japan) on samples taken every two days, counting on a Malassez cell (TiefeDepth, 0.200 mm). Microscopic observation was also important for monitoring the polymorphism and the change in algal morphology between both culture media (autotrophic and mixotrophic) as a function of time.

### 2.4. Analytical methods for DCF analysis and fate

#### 2.4.1. HPLC analysis

To monitor the concentration of DCF under the various treatment conditions, samples were taken every two days. Then, they were filtered on polyester filters (Chromafil Xtra PET, 0.45  $\mu\text{m}$ , 25 mm diameter) and analyzed by HPLC (Waters 2410, France) using a C18 column (Waters, Symmetry: 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  250 mm). The high-pressure mobile phase was a mixture of

## Utilisation des extraits de déchet de caroube comme substrat dans une application de traitement des eaux par microalgues

---

acetonitrile (Sigma-Aldrich, USA) and ultrapure water (70:30 v/v). The flow rate was 1 mL/min and UV detection at 220 nm was used for quantitative analysis after calibration at a retention time of 9.7 minutes.

### 2.4.2. Determination of the removal mechanism of DCF

To assess that the effect of heat treatment on the initial DCF concentration was negligible, samples were first extracted from both algal-free culture media in the presence of DCF after sterilization before the assays for DCF analysis. Experimental results proved that sterilization had only a limited effect, which highlights that DCF content when cultures were started was close to the initial concentrations when culture media were prepared.

In the assays, biosorption on cells was deduced from the rapid variation of DCF concentration when cells and DCF were brought into contact. The difference between bioaccumulated and biotransformed DCF was established as follows. At the end of the cultures, algal cells were collected by centrifugation, burst at 239 MPa using a high-pressure mill (Constant systems, U.-K.), and the concentration of DCF was measured by HPLC using the protocol already described. This gave access to the amount of DCF removed by the algae, but was not metabolized, which corresponds to bioaccumulation in the cells. Using a mass balance on DCF using data in the supernatant of culture media (as described in section 2.4.1), these results gave access to an estimate of the amount of DCF that undergone biotransformation.

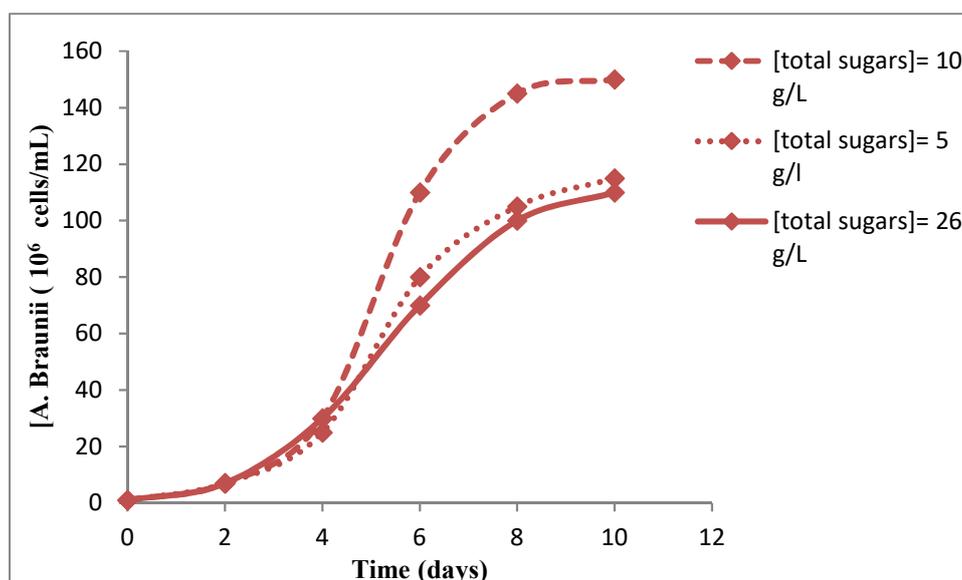
### 2.4.3. Identification of DCF metabolites

A fraction of DCF was assumed to be metabolized by *A. braunii*. Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometer (UPLC-MS/MS) was used to identify the metabolites obtained under the optimal conditions of elimination (DCF degradation). The analyzes were carried out with an Acquity™ UHPLC H-Class system (Waters, France) and a Waters Acquity™ triple quadrupole mass spectrometer (MS/MS) equipped with an electrospray ionization source. The separation was obtained with an Acquity™ UPLC BEH C18 reversed phase column (50 mm× 2.1mm, 1.7 mm) placed in an oven at 45°C. The elution was carried out with a mixture of acetonitrile/ultrapure water (30:70) containing 0.1% (v/v) formic acid and isocratic with a flow rate of 0.5 mL/min. For analysis, sample volume was 5 µL. The MS analyzes were performed in positive ionization mode by electrospray. As the culture media include a wide variety of organic substances, metabolite determination was carried out by comparing cultures with and without DCF, by detecting compounds that existed only when DCF was present.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Growth of *A. braunii* in the absence of DCF under mixotrophic conditions

The growth of *Ankistrodesmus braunii* was studied using the three initial sugar concentrations (5, 10 and 26 g/L) achieved using carob waste extraction and dilution in order to determine the optimal concentration for algal growth under mixotrophic conditions. Figure 6:1 shows that the optimum biomass concentration ( $150 \cdot 10^6$  cells/mL) was reached with a sugar concentration of 10 g/L. A lower biomass concentration ( $130 \cdot 10^6$  cells/ml) was achieved with the sugar concentration of 26 g/L. This can be explained by an inhibition due to sugars, but it must be pointed out that carob extracts also contain various compounds, in particular polyphenols (Bahry et al., 2017) which could also contribute to the inhibition of microalgal growth: for example, organic acids and tannins have already been reported as potential inhibitors of microbial growth (Mendes et al., 2007).



**Figure 6:1.** Effect of the concentration of the carob syrup on *A. braunii* growth.

In addition, the polymorphism of the algal cells was clearly different from autotrophic conditions. In the autotrophic medium, cells are shaped like needles, croissants, or narrow cones towards their extremity; they are sometimes straight, often curved (Figure 6:2). Conversely, they were clearly more spherical in a heterotrophic medium, which was already pointed out by Vischer (1920).



**Figure 6.2.** Growth of *A. braunii* in the proteose-peptone (a), and the mixotrophic medium (b).

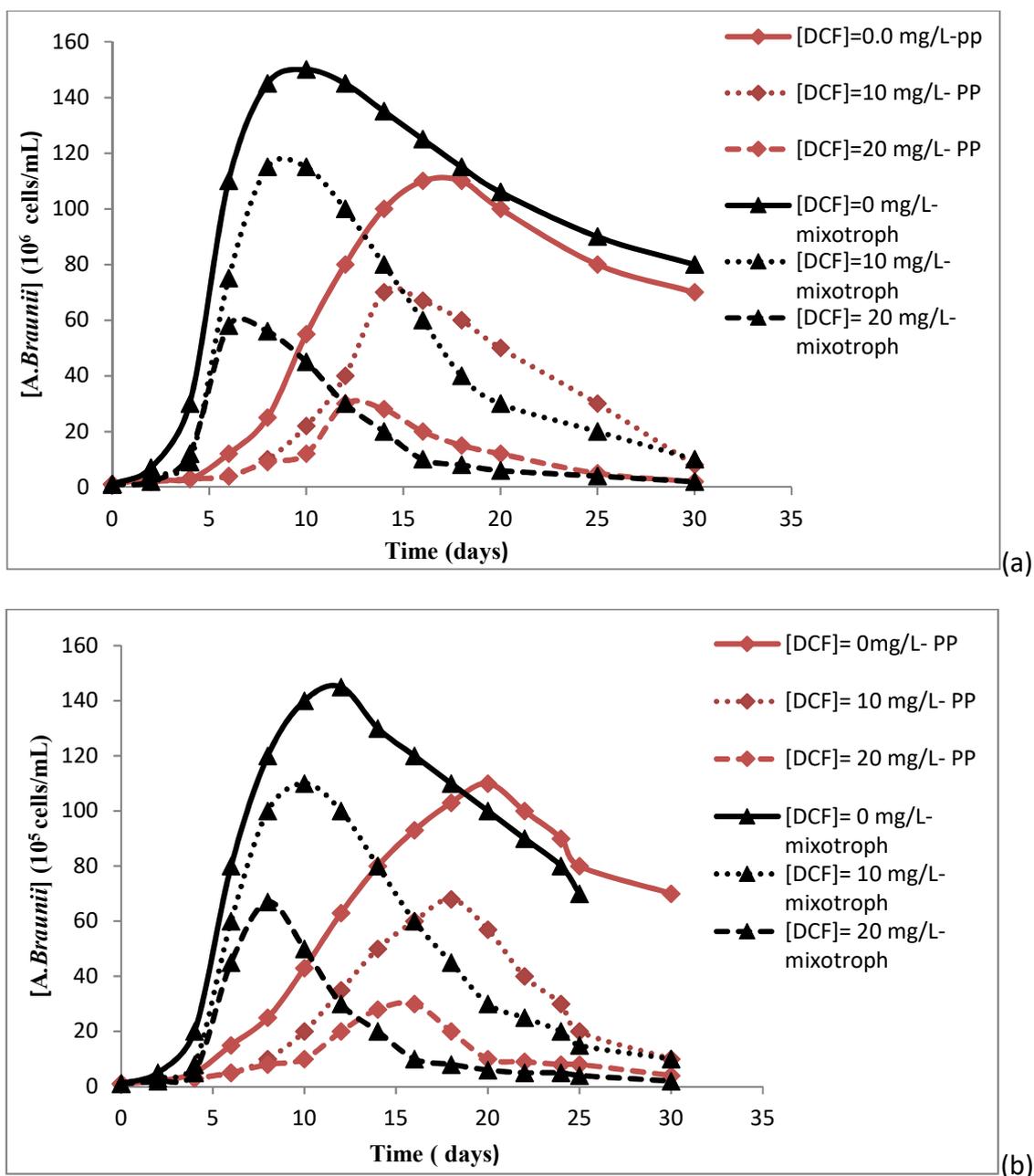
### 3.2. Effect of DCF on the growth of *Ankistrodesmus braunii*

*Ankistrodesmus* growth was studied in both culture media with and without DCF to analyze the effect of this micropollutant using two inoculum concentrations:  $10^6$  and  $10^5$  cells/mL. The growth curves are presented in Figure 6:3. By comparing the growth of the algae in both media, it appears clearly that growth was faster in the presence of an organic carbon source which is a mixture of sucrose (54%) and hexose (46%, mainly glucose and fructose) from the extracts of carob waste without or with DCF. Thus, the maximum concentration of biomass achieved was greater and was reached far more rapidly (by 7 to 10 days) in the presence of an easily metabolizable carbon source, as for fungi in Semrany et al. (2014) for micropollutant removal. Similarly, the mixotrophic cultures of *Chlorella zofingiensis* were more rapid and achieved a higher algal content than the autotrophic cultures when these microalgae were used as raw materials for the production of biodiesel in the literature (Liu et al., 2011). In this work, without DCF and with an algal concentration of  $10^6$  cells/mL in the autotrophic medium, the algal concentration was maximized after 18 days of culture at about  $110 \cdot 10^6$  cells/mL, while the biomass concentration was  $150 \cdot 10^6$  cells/mL using sugar extracts after only 10 days in Figure 6:3. In addition, algal growth displayed the same pattern when the inoculum concentration was reduced and the comparison between Figure 6:3a and Figure 6:3b highlight that the concentration of algae was approximately proportional to the concentration of inoculum. In addition, these figures display that in the absence of pollutant, the algal concentration always remained high even after 30 days.

In the presence of DCF, all the curves of Figure 6:3 display a longer latent period: this lasted 8 days for the autotrophic medium, compared to 4 days in the absence of DCF, while the latent period in the mixotrophic medium was 4 days and 2 days long in the presence and the absence of DCF, respectively. Actually, the increase of biomass concentration in the exponential phase in both media was slowed down in the presence of DCF and the maximum algal concentration achieved was always significantly smaller than without DCF. For example, the maximum algal concentration was divided nearly by 3 in the autotrophic medium when DCF content was

## Utilisation des extraits de déchet de caroube comme substrat dans une application de traitement des eaux par microalgues

increased from 0 to 20 mg/L. The comparison between Figure 6:3a and Figure 6:3b shows that the time necessary to reach this maximum value appeared to be slightly more sensitive to DCF in the autotrophic medium. More generally, this maximum was always reached more rapidly when DCF content was increased, which induces that the decline phase started earlier, so that an almost complete death was always observed at the end of 30 days of culture.



**Figure 6.3.** Growth curves of *A. braunii* cultured in the proteose-peptone (PP) and the mixotrophic media at different initial DCF concentrations (0, 10 and 20 mg/L, respectively) during 30 days of incubation for various inoculum concentrations: (a)  $10^6$  cells/mL, (b)  $10^5$  cells/mL.

As a conclusion, the addition of pollutant altered the algal growth in both media, but it also impaired a bit more the growth in the autotrophic than in the mixotrophic medium if the latency period and the delay to achieve the maximum value are both accounted for. This result can be explained by the fact that the adaptation time required by the algae in the presence of pollutant in the culture medium is longer when DCF can be used as a carbon source, but also by a probable toxic effect of DCF that delays biomass production.

### *3.3. Effect of culture medium on pollution abatement*

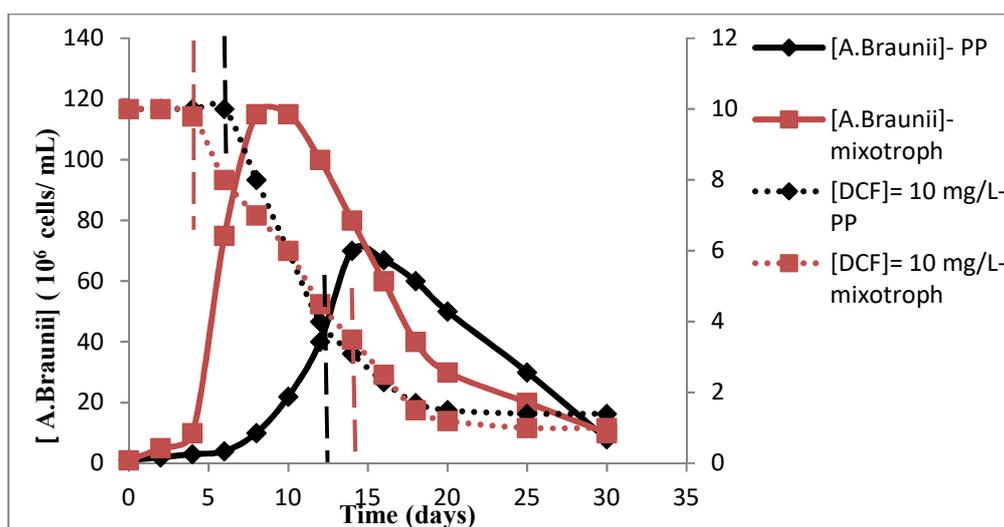
First, it must be pointed out that control assays in which diclofenac was added in both culture media in the absence of the algae (data not reported) exhibited a constant DCF content over time. This demonstrates clearly that DCF abatement was only due to the activity of the algae and that no chemical or photochemical process acted in parallel.

The effect of the composition of the culture medium on the removal of diclofenac was studied during the growth of *Ankistrodesmus braunii*. Figure 6:4 compares the elimination of diclofenac in both culture media with an initial algal concentration of  $10^6$  cells/mL and an initial DCF concentration of 10 mg/L. In the autotrophic medium, three phases of DCF removal were identified. In the first phase, DCF concentration was almost constant. In the second phase, DCF concentration decreased steeply and nearly linearly. Finally, a third phase emerges in Figure 6:4 in which an exponential decay is observed until the final value is reached. In the mixotrophic medium, the same three phases emerged, but the first phase ended earlier; conversely, the second phase was longer, while the third phase was similar even though a lower final DCF concentration was achieved.

In Figure 6:4, it appears clearly that DCF removal started at the beginning of the second phase, *i.e.* after the latency period. Conversely, the end of the second period could not be correlated to the maximum algal concentration and to the start of the death phase for both media. Although the algal growth in the mixotrophic medium was faster (10 days) than in the autotrophic medium (16 days), the time necessary for the removal of the pollutant was about the same in both media (20 days) and the same conclusion can be drawn for biomass concentration: it was higher in the mixotrophic medium ( $115 \cdot 10^6$  cells/mL) than in the autotrophic medium ( $70 \cdot 10^6$  cells/mL), but the abatement yield differed only slightly, 90% and 86% in mixotrophic and the autotrophic medium, respectively. The effectiveness of DCF removal appears, however, to increase with increasing algal concentration. In the autotrophic medium, this can be explained by the fact that DCF can be used as an organic carbon source which contributes to pollution removal and occurs during the growth phase, while only a smaller amount of DCF was removed during the decline phase. Conversely, in the mixotrophic medium, the algae rather used the source of easily metabolizable carbon (glucose, fructose and sucrose) in the growth phase, while the competition between the two sources of carbon started only at the

end of the exponential phase, so that DCF consumption was far more significant in the decline phase.

These results highlight that *Ankistrodesmus braunii* is able to remove efficiently DCF. This agrees with literature data, as *A. braunii* is known for its ability to degrade recalcitrant organic compounds. For example, *A. braunii* C202.7a has been identified as able to undergo the biotransformation of sinapic acid (Della Greca et al., 2003). In addition, Todd et al. (2002) also demonstrated the biotransformation of more complex aromatic pollutants, such as naphthalene and diaryl ethers by *Ankistrodesmus*. A key point is that DCF abatement is increased in mixotrophic conditions, which is not a general result in the literature. For example, when the removal of carbamazepine by a filamentous fungus, *Trametes versicolor* DSM 11269, was studied in the presence or absence of a carbonaceous co-substrate, the pollution abatement was maximized when carbamazepine was the sole source of organic carbon in the culture medium (Semrany et al., 2014).



**Figure 6:4.** Effect of the culture medium on DCF removal for an initial DCF concentration of 10 mg/L and an inoculum concentration of  $10^6$  cells/ mL.

From Figure 6:4, it is not possible to conclude on the main mechanisms responsible for DCF abatement: namely, biosorption on cell surface, bioaccumulation in the cells, and biodegradation are the more likely processes involved. For example, biosorption explained the removal of 4-chlorophenol by *Pseudomonas putida* (Saéz and Rittmann, 1993). However, their work highlights that biosorption is a rapid process in comparison to biodegradation and bioaccumulation, so that the evolution of the amount of DCF removed should be clearly correlated to biomass concentration in the exponential phase, which is not the case in Figure 6:4.

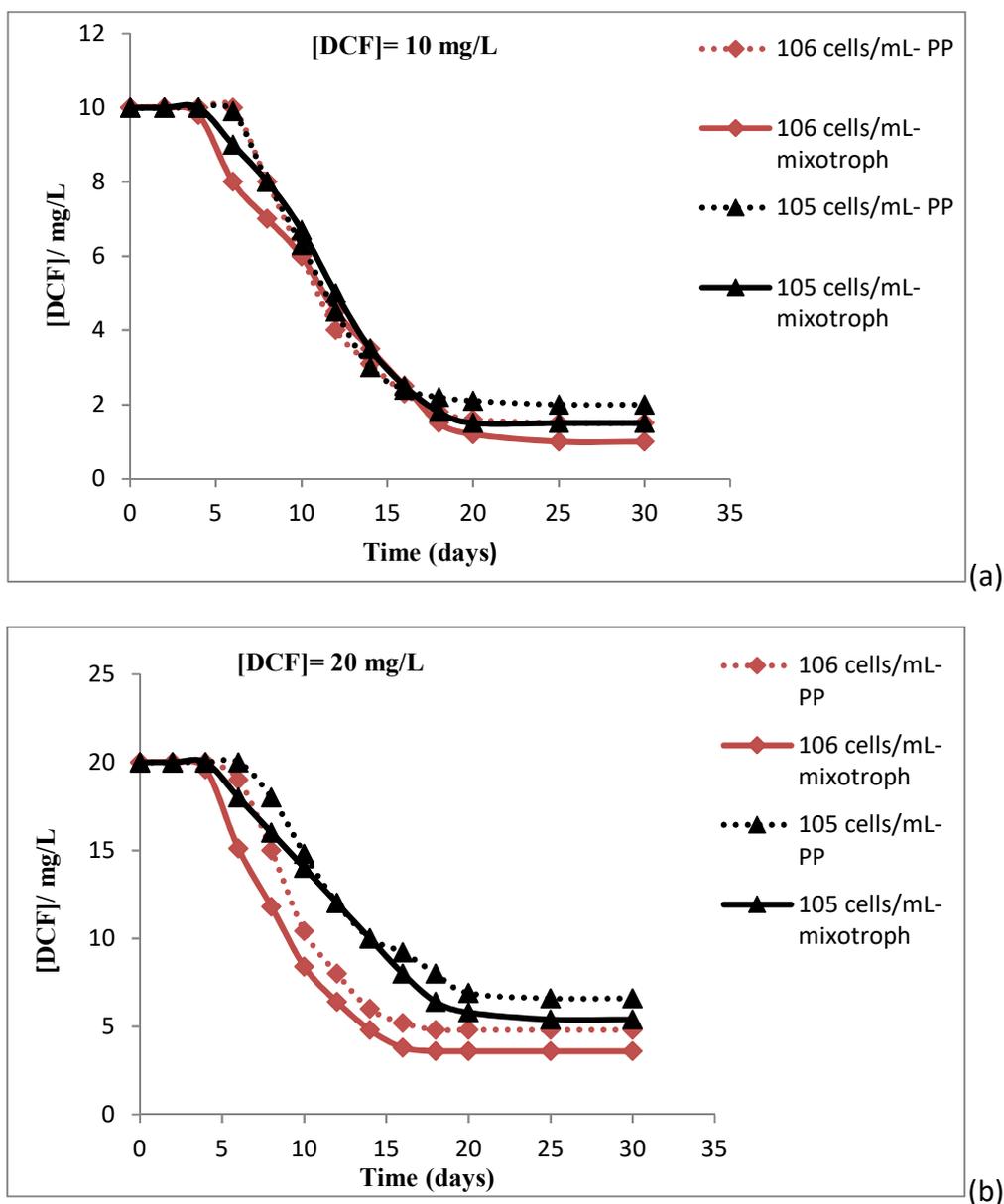
As a conclusion, *A. braunii* seems to be apt for use in a phycoremediation treatment even in mixotrophy in the presence of rapidly easily metabolizable carbon sources, as removal yields of DCF up to 90% have been achieved in about 20 days. Mixotrophy increases DCF abatement

by about 5 to 10%, but does not significantly reduce the time necessary to achieve the final abatement. In the mixotrophic medium, most of DCF is removed in the decline phase when there is no competition with sugars anymore, while the opposite is reported for the autotrophic medium. Thus, biosorption is never the main removal mechanism.

#### *3.4. Effect of inoculum concentration on DCF removal*

Two initial concentrations of algae ( $10^6$  and  $10^5$  cells/mL) were used to investigate the effect of inoculum concentration on DCF removal (10 mg/L and 20 mg/L) in both media culture. From experimental data plotted in Figure 6:5, it arises clearly that the percentage of elimination of DCF was higher with the highest concentration of algae ( $10^6$  cells/mL) for both culture media and with the two initial concentrations of DCF. For example, for the mixotrophic medium and a DCF concentration of 20 mg/L, the yield of DCF removal was increased from 73 to 82% when the concentration of algae increased from  $10^5$  to  $10^6$  cells/mL. However, the removal rate, which should be faster at higher inoculum concentration, is more significantly enhanced by a change of inoculum concentration in autotrophic than in mixotrophic conditions. This can be explained as follows: with the increase in algal concentration, the culture medium is depleted faster and a stronger competition for nutrients occurs. Consequently, algae start consuming DCF more rapidly as the only possible source of carbon, especially in autotrophy in which DCF removal mainly occurs in the growth phase, as already stated. In mixotrophy, algal growth is mainly due to sugars and it was clearly enhanced by inoculum concentration in Figure 6:3, while DCF consumption mainly occurred in the decline phase, so that it is less sensitive to inoculum concentration. Finally, it must also be pointed out that DCF removal was never complete, which is probably due to the toxic effect of this pollutant on the algae and other possible nutrient deficiency at the end of the culture, for example in nitrogen as carob waste is poor in nitrogen (Bahry et al., 2017).

## Utilisation des extraits de déchet de caroube comme substrat dans une application de traitement des eaux par microalgues

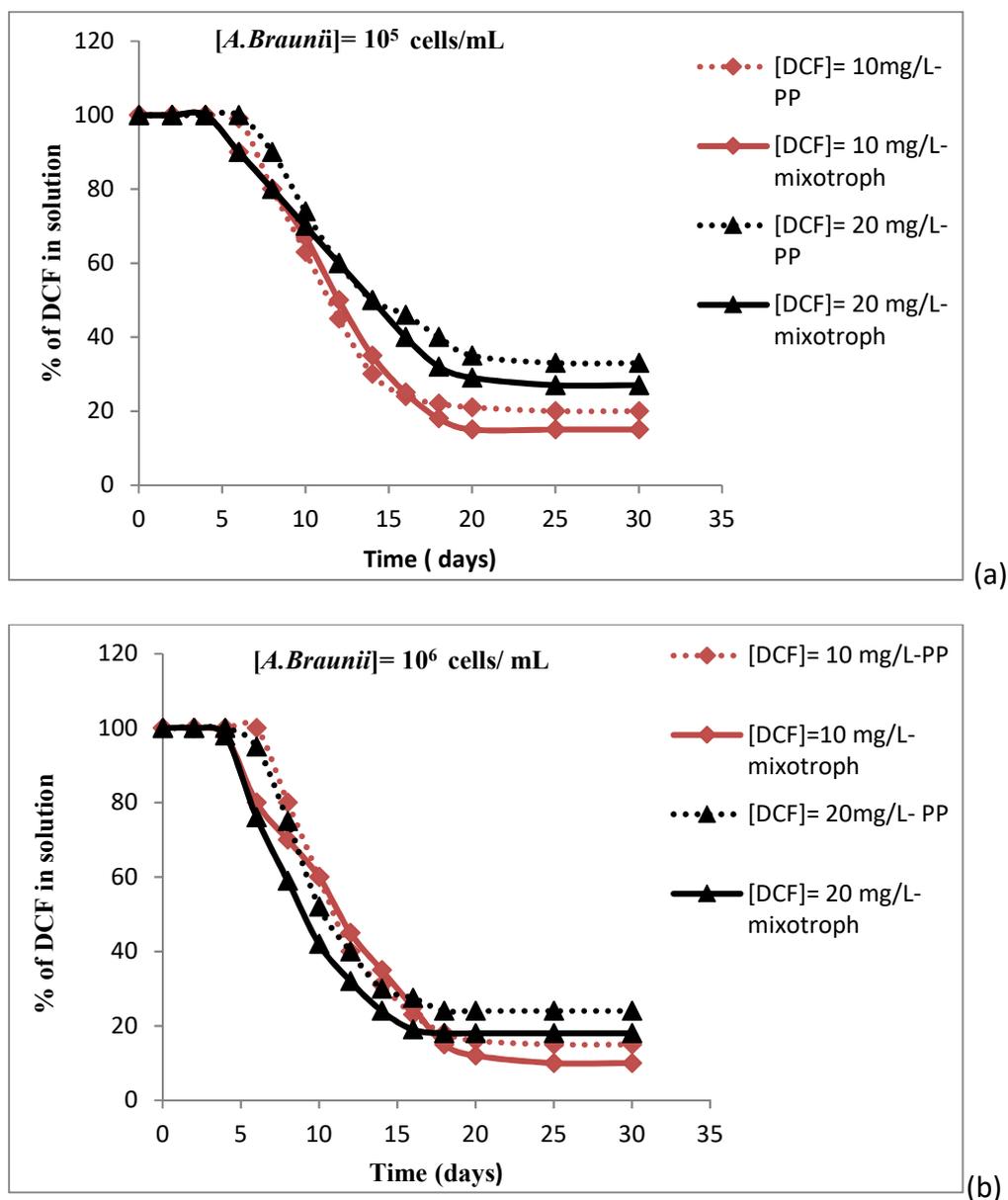


**Figure 6.5.** Effect of inoculum concentration on the removal of DCF in both media at (a) 10 mg/L, and (b) 20 mg/L of DCF.

### 3.5. Effect of the initial DCF concentration

The effect of the initial pollutant concentration (10 mg/L and 20 mg/L) was studied in both culture media and for both algal concentrations. The results are displayed in Figure 6:6.

## Utilisation des extraits de déchet de caroube comme substrat dans une application de traitement des eaux par microalgues



**Figure 6:6:** Effect of DCF initial concentration on the elimination of DCF as a function of inoculum concentration: (a)  $10^5$  cells/mL, and (b)  $10^6$  cells/ mL.

Figure 6:6 show that the increase in the initial concentration of DCF caused a decrease in removal yield. For example, in the autotrophic medium and for the same concentration of algae,  $10^5$  cells/mL, increasing the DCF content from 10 to 20 mg/L decreased its value from 79.6 to 67%. These results are quite classical with micropollutants: for example, Semrany et al. (2014) observed the same trends when the initial concentration of carbamazepine was increased using fungi.

#### 4. Analysis of the removal mechanisms of DCF

Apart from studying the efficiency of the removal of the pharmaceutical pollutant, it is important to determine the main mechanisms of DCF removal. In general, three mechanisms are possible: biosorption, bioaccumulation and biotransformation. Biosorption is a relatively fast phenomenon in comparison to bioaccumulation and biotransformation because only the cell surface is involved, as already mentioned. When HPLC analysis displays a decrease in the DCF peak area over time, a new peak emerges at the same wavelength (which points out a similar structure) whose surface area increases over time. This peak, which appears at a shorter retention time (4 min., while the DCF retention time is 9.7 min.), is likely to correspond to a secondary product resulting from the biodegradation of DCF by the algae, which shows that biodegradation occurs.

To better understand the underlying mechanisms, the algal cells were burst under high pressure and then, the medium was recovered for HPLC analysis. A high amount of DCF was found after cell bursting. This leads to the conclusion that the bioaccumulation process of DCF in cells plays a leading role in the process of elimination of this pollutant by *A. braunii*. It arises that the amount of DCF recovered after bursting cell membranes corresponds to about 60% of the initial amount of DCF in water. To confirm the presence of DCF degradation products, UHPLC/MS/MS analyzes were carried out in positive mode electrospray ionization. The results emphasized the qualitative presence of three metabolites that could derive from DCF. The major product detected was 4'-OH diclofenac, probably the one that appears as a new peak on HPLC. Other metabolites ( $m/z=100$  and  $m/z=227$ , in both culture media) did not appear on HPLC chromatograms, probably because their amount is small in water and/or they cannot be detected at the wavelength of 220 nm. It must be pointed out that another metabolite ( $m/z=312$ ) was observed only in the mixotrophic medium. As a conclusion, these results show that two main mechanisms prevail in DCF removal by *A. braunii*: bioaccumulation in the cells is the main process, but biodegradation occurs in parallel.

#### 5. Summary of the removal yield of DCF after 30 days

Finally, Table 6:1 demonstrates that the removal yield of DCF after 30 days of treatment ranges between 67 and 90%. Thus, *Ankistrodesmus braunii* displays a great efficiency in removing this refractory product. For example, the algae are more efficient for DCF removal than activated sludge. In the literature, the average efficiency of this conventional process never exceeds 50%: the lowest value was reported with a large experimental error ( $21.8 \pm 28.5\%$ ) by Radjenović et al. (2009), while 48% and 50% were found by Zupanc et al. (2013) and Petrie et al. (2013), respectively. Only membrane bioreactors achieved a higher removal efficiency, about  $66 \pm 13\%$  (Radjenović et al., 2009). In addition, activated sludge process produced metabolites that were also considered pollutants (Kosjek et al., 2009). Conversely, the results of this work results qualitatively agree with those of Escapa et al. (2016) in which the

## Utilisation des extraits de déchet de caroube comme substrat dans une application de traitement des eaux par microalgues

removal of DCF was investigated using three strains of algae: namely, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*; *S. obliquus* was reported to exhibit the highest efficiency of removal, about 79%, but under autotrophic conditions. These results point out the potential application of microalgae for the removal of pharmaceuticals in the bioremediation of wastewater. Further potential enhancements include the addition of an oxidation-reduction mediator, as in Nguyen et al. (2013), which studied the degradation of DCF by a white rot fungus in a membrane bioreactor with and without the addition of 1-hydroxybenzotriazole and showed that this mediator improved the efficiency of DCF removal from 70% to 95%. However, such substances are still to be found for microalgae.

**Table 6:1.** Removal yield of DCF determined by HPLC for an initial DCF content between 10 and 20 mg/L, and an inoculum concentration between  $10^5$  and  $10^6$  cells/mL after 30 days.

Initial concentration of DCF (mg/L)	Initial algal concentration (cells/mL)	Removal yield of DCF in autotrophic medium (%)	Removal yield of DCF in mixotrophic medium (%)
10	$10^5$	79.6±0.7	85±2
10	$10^6$	85±2	90±1
20	$10^5$	67±1	73±2
20	$10^6$	76±2	82±1

### 7. Conclusion

Diclofenac removal from water was investigated using the green microalgae *Ankistrodesmus braunii* in a biological treatment both under autotrophic and mixotrophic conditions. Mixotrophic conditions used a low-cost juice extracted from carob waste as the carbon source. Experimental results highlighted a maximum removal yield of 90% in mixotrophic culture conditions when inoculum concentration was  $10^6$  cells/mL and initial DCF content was 10 mg/L. These correspond to the maximum and minimum values for inoculum and initial DCF concentrations, as DCF removal was shown to be enhanced at the same time by a lower DCF content and a higher cell density. Mixotrophic cultures also maximized biomass concentration and DCF removal, especially when sugar content was optimized. The algae were shown to be able to use DCF as a carbon source without inhibition of algal growth, even though a toxic effect of DCF emerged, which increased the latent period and decreased biomass concentration in the cultures. The analysis of DCF elimination demonstrated that 60% of the initial amount of DCF was accumulated in the algae, whereas three metabolites of DCF degradation were identified in water. Finally, the low-cost juice extracted from carob waste appears as an efficient and economic substrate for enhancing micropollutant removal by phycoremediation.

## References

- Andreozzi, R., Raffaele, M., & Nicklas, P. (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10), 1319-1330.
- Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G., & Pollio, A. (2001). Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research*, 36(11), 2869-2877.
- Antunes, M., Esteves, V. I., Guégan, R., Crespo, J. S., Fernandes, A. N., & Giovanela, M. (2012). Removal of diclofenac sodium from aqueous solution by Isabel grape bagasse. *Chemical Engineering Journal*, 192, 114-121.
- Bahry, H., Pons, A., Abdallah, R., Pierre, G., Delattre, C., Fayad, N., Taha, S & Vial, C. (2017). Valorization of carob waste: Definition of a second-generation bioethanol production process. *Bioresource Technology*, 235, 25-34.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh M., & Dasa K. C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88(10) 3425-3431.
- Buser, H. R., Poiger, T., & Müller, M. D. (1998). Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science & Technology*, 32(22), 3449-3456.
- Cherik, D., Benali, M., & Louhab, K. (2015). Occurrence, ecotoxicology, removal of diclofenac by adsorption on activated carbon and biodegradation and its effect on bacterial community: A review. *World Scientific News*, (10), 116-144.
- DellaGreca, M., Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., & Temussi, F. (2003). Biotransformation of sinapic acid by the green algae *Stichococcus bacillaris* 155LTAP and *Ankistrodesmus braunii* C202. 7a. *Tetrahedron letters*, 44(14), 2779-2780.
- Escapa, C., Coimbra, R. N., Paniagua, S., García, A. I., & Otero, M. (2015). Nutrients and pharmaceuticals removal from wastewater by culture and harvesting of *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology*, 185, 276-284.
- Escapa, C., Coimbra, R. N., Paniagua, S., García, A. I., & Otero, M. (2016). Comparative assessment of diclofenac removal from water by different microalgae strains. *Algal Research*, 18, 127-134.
- Hom-Díaz, A., Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., Vicent, T., Barceló, D., & Blánquez, P. (2015). Microalgae cultivation on wastewater digestate:  $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol

- degradation and transformation products identification. *Journal of Environmental Management*, 155, 106-113.
- Kamjunke N., Köhler B., Wannicke N., & Tittel J. (2008). Algae as competitors for glucose with heterotrophic bacteria (1). *Journal of Phycology*, 44(3) 616-623.
- Kosjek, T., Heath, E., Pérez, S., Petrović, M., & Barceló, D. (2009). Metabolism studies of diclofenac and clofibrac acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Hydrology*, 372(1), 109-117.
- Liu, J., Huang, J., Jiang, Y., & Chen, F. (2011). Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 107, 393-398.
- Macherius, A., Lapen, D. R., Reemtsma, T., Römbke, J., Topp, E., & Coors, A. (2014). Triclocarban, triclosan and its transformation product methyl triclosan in native earthworm species four years after a commercial-scale biosolids application. *Science of the Total Environment*, 472, 235-238.
- Mendes, A., Guerra, P., Madeira, V., Ruano, F., Lopes da Silva, T., & Reis, A. (2007). Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1209-1215.
- Nguyen, L. N., Hai, F. I., Yang, S., Kang, J., Leusch, F. D., Roddick, F., Price, W. E., & Nghiem, L. D. (2013). Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 148, 234-241.
- Peng, F. Q., Ying, G. G., Yang, B., Liu, S., Lai, H. J., Liu, Y. S., Chen, Z. F., & Zhou, G. J. (2013). Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): Transformation kinetics and products identification. *Chemosphere*, 95, 581-588.
- Pérez-Estrada, L. A., Malato, S., Gernjak, W., Agüera, A., Thurman, E. M., Ferrer, I., & Fernández-Alba, A. R. (2005). Photo-Fenton degradation of diclofenac: identification of main intermediates and degradation pathway. *Environmental Science & Technology*, 39(21), 8300-8306.
- Petrie, B., McAdam, E. J., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N., & Cartmell, E. (2013). Fate of drugs during wastewater treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 49, 145-159.
- Poiger, T., Buser, H. R., & Müller, M. D. (2001). Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2), 256-263.

## Utilisation des extraits de déchet de caroube comme substrat dans une application de traitement des eaux par microalgues

---

- Radjenović, J., Petrović, M., & Barceló, D. (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*, 43(3), 831-841.
- Saéz, P. B., & Rittmann, B. E. (1993). Biodegradation kinetics of a mixture containing a primary substrate (phenol) and an inhibitory co-metabolite (4-chlorophenol). *Biodegradation*, 4(1), 3-21.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., & Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 141-150.
- Schmitt-Jansen, M., Bartels, P., Adler, N., & Altenburger, R. (2007). Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1389-1396.
- Semrany, S. (2014). *Bioaugmentation fongique des boues activées : élimination de la carbamazépine persistante dans l'eau* (Thèse de doctorat de l'ENSCR, Rennes, France).
- Todd, S. J., Cain, R. B., & Schmidt, S. (2002). Biotransformation of naphthalene and diaryl ethers by green microalgae. *Biodegradation*, 13(4), 229-238.
- Triebskorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H. R., & Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 68(2), 151-166.
- Vischer, W. (1920). Sur le polymorphisme de l'*Ankistrodesmus braunii* (Naegeli) Collins. *Aquatic Sciences-Research Across Boundaries*, 1(1), 5-50.
- Zwiener, C., & Frimmel, F. H. (2000). Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Research*, 34(6), 1881-1885.
- Zupanc, M., Kosjek, T., Petkovšek, M., Dular, M., Kompare, B., Širok, B., Blažeka, Ž., & Heath, E. (2013). Removal of pharmaceuticals from wastewater by biological processes, hydrodynamic cavitation and UV treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1104-1112.

### 6.3 Conclusion

Les essais de traitement de l'eau par l'algue *Ankistrodesmus braunii* ont démontré la capacité de cette algue à éliminer le diclofénac puisqu'un rendement d'élimination de près de 90 % a été atteint. Globalement, ils confirment le potentiel de la phycoremédiation comme traitement des eaux qui pourrait induire une élimination plus efficace des micropolluants pharmaceutiques et met en évidence les qualités écologiques et environnementales de ce procédé. Toutefois, contrairement aux applications précédentes, cette étude reste pour l'instant nécessairement cantonnée au domaine du laboratoire car les conditions appliquées sont éloignées de celles d'une eau réelle dans laquelle d'autres sources de carbone pourraient concurrencer les micropolluants. De plus, la rentabilité de ce type de procédé de traitement est bien moindre que celle des procédés de production de biomolécules ou de bioénergies et il est moins susceptible d'intéresser les industriels producteurs de mélasse de caroube, même si la croissance de l'algue est clairement plus rapide dans les conditions mixotrophes jusqu'à une concentration maximale en sucres de 10 g/L. Même si le diclofénac est éliminé, il faut également noter qu'il ralentit la croissance de l'algue (phase de latence plus longue, concentration en biomasse diminuée) et qu'il est consommé principalement en phase de déclin, lorsque l'essentiel des sucres a déjà été utilisé comme substrat. De plus, il apparaît qu'une grande partie du diclofénac éliminé se retrouve séquestré dans le milieu intracellulaire, ce qui démontre que le mécanisme principal est de type « séparation » avec transfert de pollution, alors que le mécanisme destructif qui est loin d'être négligeable, joue cependant un rôle secondaire et génère des produits secondaires assez proches de la molécule initiale. Une étude plus approfondie dans des milieux plus complexes est donc encore nécessaire afin de conclure définitivement sur la viabilité de ce procédé.

## Conclusion générale et perspectives

Au Liban, les gousses de caroube sont principalement utilisées pour l'extraction d'un jus obtenu par deux étapes successives de macération de broyats de caroube qui ont une taille moyenne de 5 mm. Ce jus est utilisé pour la préparation de la mélasse (dessert consommé par la population Libanaise). Les déchets solides issus de cette préparation sont laissés à l'abandon ou bien utilisés pour l'alimentation animale. Notre travail avait pour but de valoriser le déchet solide issu de la préparation de cette mélasse de caroube. Nos résultats préliminaires ont montré que ce déchet est effectivement riche en sucre : 45 % p/p dans la matière sèche, contre 69 % p/p pour la caroube initiale. De plus, l'essentiel des polyphénols, protéines, cendres et lipides de la caroube se retrouvent également dans le déchet. Ces résultats nous ont encouragé à rechercher des voies de valorisation de ce carbone résiduel sous forme de carbohydrates pour la production des molécules biosourcées à forte valeur ajoutée et/ou de vecteurs énergétiques du domaine des bioénergies.

Dans ce but, le chapitre 3 de cette thèse a étudié la faisabilité de la production de bioéthanol de deuxième génération à partir de ce déchet. Une étape préliminaire d'extraction des sucres a été définie et optimisée en étudiant les effets respectifs du pH, de la température, de la taille des particules, du rapport massique liquide/solide et du temps de contact sur le rendement d'extraction et la concentration en sucres dans l'extrait. Un compromis a été défini entre ces deux paramètres afin de pouvoir conduire des fermentations avec des concentrations en sucres d'au moins 65 g/L. Ensuite, trois méthodes de fermentation utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont été comparées :

- La fermentation en milieu liquide sur le jus de déchet de caroube en bioréacteur fermé avec une concentration initiale en sucre de 65 g/L, respectivement avec enrichissement et sans enrichissement du milieu de culture : les résultats de cette partie ont démontré la fermentescibilité du jus de déchet de caroube, mais ils ont aussi fait apparaître la nécessité d'enrichir le milieu de culture pour améliorer la concentrations finale (respectivement 26,1 g/L et 21,1 g/L d'éthanol en fin de culture avec et sans enrichissement) et la productivité en éthanol (respectivement 5,57 g/kg/h et 2,65 g/kg/h en fin de culture avec et sans enrichissement).
- La fermentation en milieu solide, en fonction de cinq facteurs : la concentration initiale en cellules, la dimension caractéristique des broyats, la durée de fermentation, l'humidité et la température. L'analyse des résultats des essais par un plan d'expériences de type « criblage » a montré le rôle essentiel de l'humidité qui maximise la fermentation des sucres aux alentours de 70 % par rapport aux quatre autres paramètres. En revanche, la température a

## Conclusion générale et perspectives

---

été le paramètre le moins influent car sa gamme est limitée. En conséquence, un plan d'expériences à trois paramètres, dédié à l'optimisation des conditions de fermentation solide, a été mis en œuvre (approche RSM). L'humidité a été fixée à 70 %, la température à 30°C (valeur minimale) et les trois autres paramètres du plan de criblage ont été utilisés comme facteurs principaux d'un plan composite centré. Les résultats des essais ont permis d'établir un modèle prédictif et ont mis en évidence la présence d'un maximum pour le rendement. Nous avons montré que les conditions optimales obtenues pour la fermentation solide sont les suivantes : une taille des particules de déchet de 0,5 mm, une concentration initiale en cellules de  $3,2 \cdot 10^8$  cellules/g de déchet de caroube et une durée de fermentation de 39 h. La quantité d'éthanol produite pour cet optimum a été estimée à 0,346 g/g de sucre initial. Le test réalisé dans ces mêmes conditions optimales a permis d'atteindre une valeur de  $0,344 \pm 0,011$  g/g.

- Une fermentation en phase liquide avec mise en suspension directe de morceaux de caroube (2,5 mm) : si la production est bien évidemment plus faible que sur les extraits en phase liquide (concentration finale en éthanol 18 g/L ; rendement 43% et productivité 1,28 g/L/h), les rendements restent donc acceptables. Contrairement à la fermentation solide, les résultats n'ont pas montré une différence significative sous l'effet d'une diminution de la taille des particules du déchet de caroube par broyage puisque pour une taille de 5 mm, une concentration finale en éthanol de 17 g/L, un rendement de 41% et une productivité de 1,21 g/L/h sont atteints.

En fin de compte, les trois voies présentent des avantages et des inconvénients respectifs. La fermentation solide sera probablement la plus facile à mettre en œuvre par les industriels car elle est la plus simple et nécessite peu d'investissements et pas de coûts opératoires de prétraitement, mais l'extraction de l'éthanol à partir du solide peut être délicate. La fermentation en phase liquide nécessite des investissements plus importants et le gain en rendement résultant du broyage et de l'extraction doit être mis en balance d'une utilisation directe du déchet qui donne des productivités et rendements plus faibles, mais réduit considérablement les coûts de prétraitement.

Le chapitre 4 de cette thèse visait la production d'une molécule à valeur ajoutée : l'acide lactique, au vu de son importance croissante comme bloc de construction pour la production d'acide polylactique (PLA). Cette production a été réalisée en bioréacteur en immobilisant la bactérie *Lactobacillus rhamnosus* dans des billes d'alginate car cette technique offre plusieurs avantages par rapport aux cellules libres :

- une réduction de la sensibilité à la contamination,
- une diminution de l'inhibition par le substrat/produit,
- la réutilisation des cellules par recyclage.

Les paramètres étudiés pour son optimisation sont : le pH, la vitesse d'agitation, la concentration en alginate et la concentration en cellules dans les billes d'alginate. La concentration initiale de sucre

## Conclusion générale et perspectives

---

dans le déchet de caroube était de 65 g/L. Les résultats ont montré que le pH et la concentration en alginate jouent un rôle significatif sur la production d'acide lactique. Les conditions optimales ont conduit à : 2 % pour la concentration en alginate, pH 6,4, une vitesse d'agitation de 80 tpm et 4 % pour la concentration initiale en cellules dans les billes d'alginate. Dans le but de minimiser le coût du milieu de culture, un essai de fermentation lactique a été réalisé en mettant directement les billes d'alginate (contenant la bactérie) en contact avec l'extrait de déchet de caroube sans le compléter avec une source d'azote. Les résultats ont montré que le jus de déchet de caroube nécessite un complément d'azote, sans quoi on observe une diminution significative de la concentration finale en acide lactique de 22 g/L (milieu complet) jusqu'à 14 g/L (milieu non enrichi). De plus, les résultats ont montré que l'extrait de caroube est constitué de  $54 \pm 2\%$  de saccharose et de  $46 \pm 2\%$  d'hexoses (glucose et fructose). Or, la bactérie *Lactobacillus rhamnosus* qui consomme le saccharose en l'absence d'autres sucres ne le consomme pas en présence de sucres simples. Dans le but de consommer la totalité des sucres, un prétraitement avec une invertase a été conduit. Les résultats ont montré que la transformation de saccharose en glucose et en fructose conduit à une augmentation de la concentration finale en acide lactique jusqu'à 40 g/L. Par ailleurs, le test de réutilisation de cellules immobilisées a démontré la capacité d'utilisation des billes pour au moins cinq cycles successifs. En fin de compte, l'acide lactique apparaît donc comme une voie alternative de valorisation potentielle assez attractive pour le déchet de caroube.

Ensuite, le chapitre 5 de cette thèse a à nouveau eu pour but la valorisation du déchet pour la production de bioénergie, mais cette fois sous la forme de biohydrogène par fermentation sombre (anaérobie). Les résultats ont montré que le déchet de caroube constitue un bon substrat de fermentation et qu'en fioles, la quantité maximale d'hydrogène a été obtenue avec le saccharose et le déchet de caroube comme sources de carbone en comparaison avec le glucose. Les essais préliminaires ont également permis d'optimiser le pH : le rendement en hydrogène a augmenté de  $1,08 \pm 0,04$  à  $1,32 \pm 0,02$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consommé avec l'augmentation de pH de 5 à 6, tandis que le rendement diminue quand le pH initial est de 7. Des cultures ont ensuite été conduites dans un réacteur de deux litres. Comme le déchet de caroube contient 4% de protéines et 3% de cendres, un test de simplification du milieu de culture pour l'enrichir seulement avec du fer a été réalisé. Les résultats ont montré que ce milieu de culture n'est pas satisfaisant, avec une diminution significative de la production de 1,6 L/h (milieu complet) à 0,23 L/h. En revanche, le taux de production maximal de l'hydrogène a augmenté quand une source d'azote a été ajoutée au milieu de culture avec une production maximale de 1,9 L/h (proche du milieu complet) et une réduction de la phase de latence (environ 7 h pour le milieu complet et le milieu simplifié avec le fer et l'azote). Enfin, l'effet d'une réduction de taille du déchet de 5 mm à 2,5 mm a été étudié, ce qui a augmenté le rendement d'hydrogène de  $1,28 \pm 0,04$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consommé jusqu'à  $1,37 \pm 0,03$  mol H<sub>2</sub>/mol hexose consommé. En fin de compte, malgré la présence de polyphénols qui auraient pu jouer le rôle d'inhibiteurs, la production de biohydrogène de deuxième génération semble également possible à partir du déchet de caroube avec un excellent rendement et une bonne productivité, ainsi qu'un besoin en prétraitement très limité.

Enfin, le but du dernier chapitre de cette thèse était d'utiliser le jus de déchet de caroube comme milieu de culture (source de carbone) pour la microalgue verte *Ankistrodesmus braunii* afin d'éliminer le micropolluant pharmaceutique, le diclofénac, et de comparer cette élimination avec celle observée dans un milieu autotrophe alternatif où la protéose-peptone est le milieu de culture. La concentration en sucre optimale pour la croissance d'*Ankistrodesmus braunii* dans le milieu mixotrophe est de 10 g/L. De plus, la croissance de l'algue en mixotrophie était plus rapide, et la concentration en biomasse plus élevée. Nous avons cependant démontré que la présence de diclofénac ralentit la croissance de l'algue en augmentant la phase de latence et en diminuant la concentration de biomasse. L'élimination du polluant est initialement plus rapide dans le milieu autotrophe, étant donné que l'algue utilise le diclofénac comme source de carbone, mais cette condition est peu réaliste dans une eau réelle où le micropolluant est toujours en concurrence avec d'autres substrats carbonés. Dans le milieu mixotrophe, le diclofénac est consommé en grande majorité dans la phase de déclin, *i.e.* après consommation de l'essentiel des sucres facilement métabolisables présents dans le milieu de culture. Malgré cela, l'algue *Ankistrodesmus braunii* a montré sa capacité à éliminer jusqu'à 90% du diclofénac présent en utilisant l'extrait de caroube comme source de carbone. L'augmentation de la concentration initiale en diclofénac diminue ce rendement d'élimination, tandis qu'il augmente avec l'augmentation de la concentration initiale en algues. Après éclatement des cellules de l'algue en fin de traitement, 60% du diclofénac initial a été extrait du milieu intracellulaire, tandis que l'analyse du milieu a mis en évidence la présence de trois métabolites, ce qui démontre un mécanisme qui combine métabolisation et séquestration de la molécule. En fin de compte, ces résultats démontrent que la phycoremédiation reste un procédé intéressant pour l'élimination des micropolluants, même s'il est lent et donc concurrencé par les procédés physicochimiques comme l'ozonation, bien plus rapide mais aussi bien plus coûteuse. Il n'en constitue pas moins une alternative qui présente de fortes qualités écologiques et environnementales.

Finalement, nous avons démontré dans nos travaux que le déchet solide issu de la préparation de la mélasse de caroube libanaise présente une très grande gamme de voies de valorisation possibles. De nombreuses autres pourraient sans doute être explorées compte tenu des besoins qui seront croissants en substrats renouvelables pour produire les molécules plateformes de la chimie. Toutefois, il faut rappeler qu'il s'agit d'un déchet produit localement, par de petites industries et qui a une durée de vie limitée lorsqu'il est laissé à l'air libre, en raison de son fort taux d'humidité et de sa richesse en sucres. Un compromis est donc nécessaire, ce qui a guidé par exemple nos travaux sur le bioéthanol pour lesquels des voies de fermentation plus simples et moins coûteuses en termes de prétraitement et nécessitant moins d'investissements ont été considérées, même si elles sont parfois moins efficaces. Il est clair que si les perspectives de ce travail incluent la faisabilité de la production d'autres molécules plateformes pour la chimie (acide succinique...), un approfondissement de l'étude de la récupération de l'éthanol en aval de la fermentation en milieu solide, la comparaison entre différents microorganismes pour maximiser la production d'acide lactique, l'utilisation de la phycoremédiation sur une eau réelle, une analyse techno-économique poussée s'impose également afin d'estimer comparativement la possibilité pour les industriels impliqués de valoriser efficacement le déchet de caroube. Toutes les voies étudiées ont l'avantage de proposer des

## Conclusion générale et perspectives

---

procédés qui présentent une bonne soutenabilité environnementale et qui peuvent recevoir a priori une bonne acceptabilité sociétale dans une approche de type développement durable. En revanche, leur viabilité économique doit impérativement être estimée et cette étape techno-économique devra permettre de discriminer les voies économiquement soutenables en tenant compte, en particulier, des étapes de séparation et de purification aval qui représentent le plus souvent la majorité des coûts des bioprocédés. Seulement après cette étape indispensable, une optimisation plus poussée des procédés retenus pourra alors être effectuée.