

# PRODUCTION DE BIOETHANOL ET DE PROTEINES D'ORGANISMES UNICELLULAIRES PAR *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 A PARTIR DES DECHETS DE DISTILLERIES DES PLANTES

ELOUTASSI N.<sup>1,2,\*</sup>, LOUASTE B.<sup>2</sup>, BOUDINE L.<sup>2</sup> et REMMAL A.<sup>2</sup>

1. Centre Régional des Métiers de l'Education et de la Formation (CRMEF), BP 49, 30000, VN Fès, Maroc

2. Laboratoire de Biotechnologie et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences Dhar Mhraz, Fès.

**Résumé:** La distillation des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques et médicinales engendre la formation de déchets lignocellulosiques (cellulose, hémicellulose et composés phénoliques) en quantités considérables (exemple 32g de déchets par 100g de romarin distillé). L'objectif de ce travail est de traiter, par procédés biotechnologiques, les déchets lignocellulosiques issus de la distillation du romarin afin de produire du bioéthanol. Ces déchets ont été soumis à la vapeur pour la dépolymérisation. Ensuite, ils ont été traités par l'acide sulfurique pour libérer les sucres simples. Après décantation et filtration, le filtrat a été traité par le dihydroxyde de calcium (CaOH<sub>2</sub>) dans le but de précipiter les composés phénoliques qui ont été réduits de 60%. Le filtrat est supplémenté par l'extrait de levure, le sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et le phosphate disodique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) afin de servir comme milieu de fermentation pour les souches bactériennes *Erwinia chrysanthemi* EC3665 et *Klebsiella oxytoca* pour la production de bioéthanol. Les déchets bactériens de la fermentation ont été servis pour la production de protéines d'organismes unicellulaire. Les résultats obtenus montrent que les traitements de la matière lignocellulosique libèrent des sucres fermentescibles (Glucose 9.6 g.l<sup>-1</sup>; Xylose 7.33 g.l<sup>-1</sup>; Mannose 2.37 g.l<sup>-1</sup>; Galactose 1.2 g.l<sup>-1</sup>). Ces sucres ont permis de produire du bioéthanol avec un rendement plus important avec *Erwinia chrysanthemi* EC3665 (0.25 gP /gS) par rapport à *Klebsiella oxytoca* (0.16 gP /gS). Ce travail a permis de mettre au point des procédés biotechnologiques réalisables à tous déchets solides issus de l'industrie pharmaceutiques et/ou agroalimentaires pour la production de bioéthanol et par conséquent contribuer au développement durable.

**Mots clés:** lignocellulose, *Erwinia chrysanthemi* EC3665, procédé biotechnologique, développement durable.

## BIOETHANOL AND SINGLE-CELL PROTEIN PRODUCTION BY *Erwinia chrysanthemi* EC3665 FROM WASTE DISTILLERY PLANT

**Abstract:** The distillation of essential oils from aromatic and medicinal plants causes formation of lignocellulosic waste (cellulose, hemicellulose, and phenolic compounds) in considerable quantities (32g example of waste per 100g rosemary distilled). The objective of this work is to deal, with bioprocessing, lignocellulosic waste from the distillation of rosemary to produce bioethanol. This waste was submitted to steam for the depolymerization. Then they were treated with sulfuric acid to liberate simple sugars. After settling and filtration, the filtrate was treated with calcium hydroxide (CaOH<sub>2</sub>) to precipitate the phenolic compounds which were reduced by 60%. The filtrate is supplemented with yeast extract, ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and disodium phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) to serve as fermentation medium for bacterial strains *Erwinia chrysanthemi* and *Klebsiella oxytoca* EC3665 for producing bioethanol. Bacterial fermentation of waste were served for the production of proteins of unicellular organisms. The results show that treatment of lignocellulosic material release fermentable sugars (Glucose 9.6 g.l<sup>-1</sup>; Xylose 7.33 g.l<sup>-1</sup>; Mannose 2.37 g.l<sup>-1</sup>; Galactose 1.2 g.l<sup>-1</sup>). These sugars have produced bioethanol with a higher yield with *Erwinia chrysanthemi* EC3665 (0.25 gP /gS) against *Klebsiella oxytoca* (0.16 gP /gS). This work has helped to develop biotechnological processes feasible at all solid waste from the pharmaceutical industry and/or agrifood for bioethanol production and consequently contribute to sustainable development.

**Keywords:** lignocellulose, *Erwinia chrysanthemi* EC3665, biotechnological process, sustainable development.

## Introduction

Les plantes aromatiques et médicinales occupent des surfaces très importantes au Maroc et dans tous les pays méditerranéens [1, 2]. Ces plantes restent insuffisamment valorisées car leur utilisation dans l'industrie des huiles essentielles fournit des quantités importantes de déchets lignocellulosiques solides qui sont mal exploitées. D'un autre côté, la recherche sur la production de bioéthanol pour substituer l'utilisation du pétrole ou pour d'autres utilisations de l'éthanol (alimentaire, pharmaceutique, cosmétique) revêt une importance grandissante [3]. En effet la biomasse lignocellulosique des plantes contenant des sucres polymérisés en cellulose et hémicellulose [4] peut fournir du bioéthanol après hydrolyse et fermentation par des micro-organismes tels que *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Pichia Stipitis* [5, 6].

Dans ce travail, les déchets issus des industries de distilleries (distillation de romarin et les parties de la plante non hydrodistillée, tiges et rameaux) ont été traités pour la production de sucres monomères. Ces sucres ont été ensuite utilisés comme source de carbone pour la production de bioéthanol par fermentation.

La performance de la fermentation par la bactérie *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 et les paramètres cinétiques de la production d'éthanol ont été aussi étudiés en comparaison avec la souche *Klebsiella oxytoca*.

## 1. Matériels et méthodes

### 1.1. Hydrolyse de la matière lignocellulosique

Pour augmenter l'efficacité de l'hydrolyse et améliorer la surface de contact avec les cellules végétales, il est

important de broyer préalablement la biomasse du romarin non hydrodistillée.

1kg de déchets de romarin après son hydrodistillation a été lavé avec de l'eau pure et filtré. Le résidu est prétraité à la vapeur (10 minutes à 205 C°) dans le but de faciliter la dépolymérisation des macromolécules lignocellulosiques. Ce résidu est traité ensuite par l'acide sulfurique dans un extracteur à reflux. La concentration de l'acide sulfurique et le temps de traitement ont été optimisés par la méthode de planification des expériences [7, 8]. Les conditions optimales utilisées sont 0,5% d'acide sulfurique pendant 50 minutes pour rompre les liaisons osidiques et produire des sucres simples [9, 10].

### 1.2. Elimination des inhibiteurs de la fermentation

La précipitation des composés phénoliques inhibiteurs de la fermentation est réalisée par l'augmentation du pH de l'hydrolysate à 9 avec le dihydroxyde de calcium (Ca(OH)<sub>2</sub>). Le pH du filtrat obtenu, est ensuite neutralisé avec l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2N).

### 1.3. Culture des bactéries

Les bactéries utilisées pour la fermentation sont *Klebsiella oxytoca* [5, 11] et *Erwinia Chrysanthemi* EC 3665 [12, 13]. La culture est réalisée dans un bioréacteur de 2 litres avec un volume utile de 1.2 l. Cette culture contient l'extrait de levure (2.5 g l<sup>-1</sup>), le sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25 g l<sup>-1</sup>), le sulfate de magnésium MgSO<sub>4</sub> (0.025 g l<sup>-1</sup>), le glycérol (0.5 ml), la pectine (0.625 g l<sup>-1</sup>), le phosphate disodique Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> (15 g l<sup>-1</sup>) et le phosphate monosodique NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> (0.7 g l<sup>-1</sup>), le pH est ajusté à 7 par NaOH (2.5M).

#### 1.4. Fermentation

La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyers de 500 ml. Le volume utile de fermentation est de 200 ml contenant l'hydrolysate de déchets du romarin comme source de carbone complétement par l'extrait de levure (2,5 g.l<sup>-1</sup>), le (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> (0,25 g.l<sup>-1</sup>), le Mg SO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) (0,025 g.l<sup>-1</sup>), et le NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (13,8 g.l<sup>-1</sup>). Ce milieu est ensuite inoculé par *Erwinia Chrysanthemi* EC 3665 ou par *Klebsiella oxytoca* (0.2 g de poids sec de bactéries par litre), puis incubé à 30°C sous agitation (50 rev/min).

Aussi, nous avons évalué la croissance de la souche *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 sur l'hydrolysate du romarin par la détermination de l'extrait sec et la détermination de la biomasse fraîche.

L'évaluation de l'extrait sec total est déterminée toutes les deux heures. 10 ml du milieu sont centrifugés pendant 10 minutes à 5000 rpm à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec l'eau distillée puis placé à l'étuve à 105°C pendant 24 heures suivie par une pesée avec une balance de précision. Les analyses chimiques et biochimiques sont réalisées sur le surnageant de la culture.

Le dénombrement des cellules viables est la méthode utilisée pour suivre la biomasse fraîche de la croissance d'*Erwinia chrysanthemi*. Le nombre de cellules a été évalué selon la technique de dilution dans l'eau physiologique stérile, suivi d'un étalement sur le milieu LB

gélifié. Après 24 heures d'incubation à 30°C, le comptage a été déterminé sur les boîtes de Pétri présentant un nombre adéquat de colonies.

#### 1.5. Analyses

La croissance cellulaire a été déterminée par la mesure de la densité optique à 625 nm (Spectronic 20 Boch Lamb) et par la détermination du nombre de cellules viables par la technique de dilution et étalement sur milieu solide.

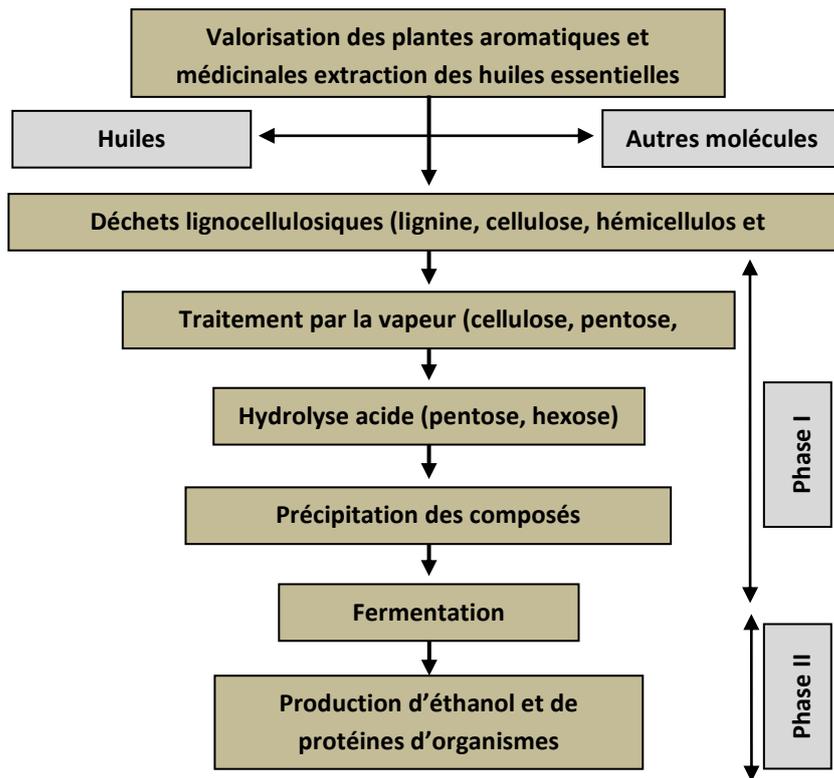
La teneur en sucres réducteurs est dosée par méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS) [14]. La méthode phénol-acide sulfurique est utilisée pour évaluer la proportion de chaque sucre monomère issu de l'hydrolyse [15].

Les composés phénoliques ont été analysés par la méthode Folin-Ciocalteu modifiée [16].

La quantité d'éthanol produite est déterminée par la lecture de l'indice de réfraction, après distillation des échantillons de milieu de culture. Une gamme contenant différentes concentrations d'éthanol, et un kit de dosage d'éthanol Boehringer Mannheim ont été utilisés.

#### 2. Résultat et discussion

Dans la présente étude, les paramètres cinétiques de bioconversion de la matière lignocellulosique traitée ont été étudiés. Le processus général de la production des sucres monomères, de bioéthanol et de la biomasse de protéines d'organismes unicellulaires ont été résumés dans la figure 1.



**Figure 1:** Processus de production d'éthanol et de protéines d'organismes unicellulaires à partir des déchets lignocellulosiques

La première partie de ces procédés consiste à traiter les résidus de romarin par la vapeur et par l'acide sulfurique pour libérer les sucres simples, ensuite un traitement par le dihydroxyde de calcium permet d'éliminer les composés phénoliques et les acides organiques. La deuxième partie est une étude de la fermentation de l'hydrolysate par les souches *Klebsiella oxytoca* et *Erwinia Chrysanthemi* EC 3665 et la production de protéines d'organismes unicellulaires de la biomasse d'*Erwinia Chrysanthemi* EC 3665

### 2.1. Constituants du résidu de romarin hydrodistillé

Les analyses de romarin distillé et les parties non distillées nous montrent que la cellulose est la composante majoritaire de ces déchets, elle est de l'ordre de 55%. En plus, l'hémicellulose est représentée par environ 33% de la biomasse du romarin non traitée, alors que la lignine et les extractibles présentent 10%.

### 2.2. Traitement de la matière lignocellulosique

#### Prétraitement de la biomasse :

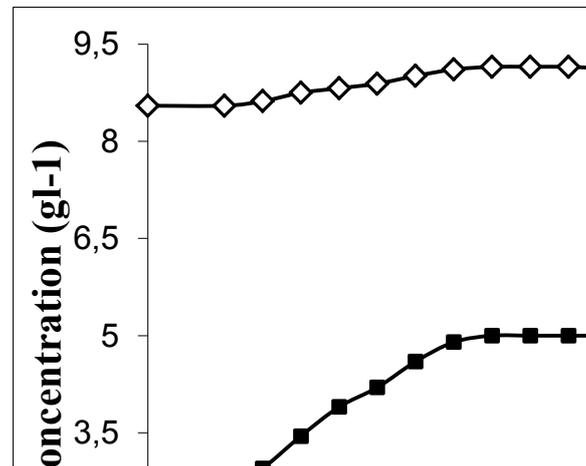
Les résultats initiaux et expérimentaux obtenus ont montré que le broyage est indispensable dans l'hydrolyse de la biomasse du romarin car il y a une différence significative entre le taux de sucres totaux et des composés phénoliques

obtenus avant et après cette opération. Le broyage de la biomasse végétale avant l'hydrolyse augmente l'efficacité des traitements en augmentant la surface de contact de la plante avec la vapeur et avec l'acide et les détoxifiants. Aussi, les gros copeaux de la plante peuvent occasionner

une perte de volume dans le réacteur de fermentation et par conséquent amollir le rendement de l'éthanol.

#### **Prétraitement à la vapeur:**

Le prétraitement a été optimisé à 205°C pendant 10 min. les résultats sont présentés dans la figure 2.



**Figure 2 :** Libération des composés phénoliques et des sucres totaux durant le prétraitement à la vapeur.

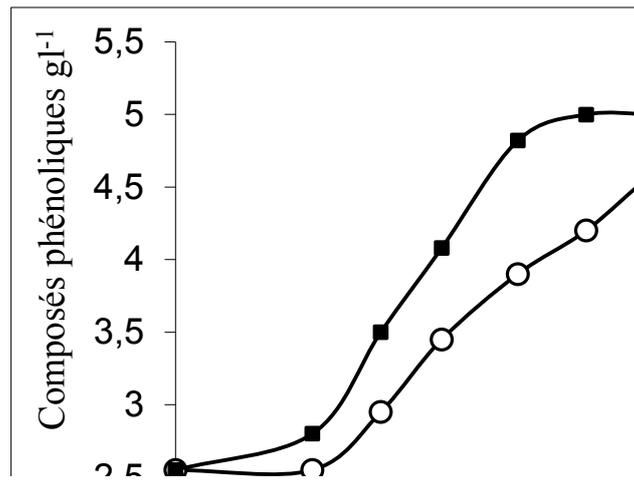
Ce procédé rompt les liaisons hydrogènes qui relient les molécules de cellulose et d'hémicellulose ce qui les rend disponibles en faveur pour l'hydrolyse acide. En plus, on constate une augmentation des composés phénoliques libérés en fonction du temps de prétraitement, tandis que le taux des sucres dans le milieu reste constant.

Le prétraitement de la biomasse végétale dégrade la cellulose mais la lignine est enfoncée dans la structure cellulosique et elle est l'obstacle majeur pour l'activité enzymatique lors de la fermentation des matières lignocellulosiques [17, 18]. Plusieurs chercheurs améliorent le taux d'hydrolyse et augmentent le niveau d'action

enzymatique par des prétraitements de la biomasse pour conformer les rendements théoriques et fondamentaux de l'éthanol [5, 6, 17, 18]. Donc le prétraitement permet de séparer les hémicelluloses de la cellulose, d'éliminer la lignine, de diminuer la cristallisation de la cellulose, et d'augmenter les dimensions des pores cellulosiques pour faciliter la pénétration des agents d'hydrolyse et de détoxification.

#### **Hydrolyse acide:**

Plusieurs concentrations de l'acide sulfurique ont été testées sur le substrat prétraité à la vapeur. Les résultats précédents changent à la concentration 5% d'acide sulfurique additionné au moment du prétraitement (figure 3).



**Figure 3 :** Effet du traitement acide de la biomasse sur la libération des composés phénoliques.

L'utilisation de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$  à 5%) permet de réduire le temps de prétraitement de 10 à 6 min, et de diminuer la température de réaction de 205 à 105°C. Aussi, à ces conditions optimales, la cellulose et l'hémicellulose ont été hydrolysés en sucre simple (tableau 1 et 2).

L'hydrolyse acide diluée reste une méthode rapide et facile, mais insuffisante

pour la production de l'éthanol [2, 9, 17, 18].

Les tests préliminaires de fermentation de la matière traitée à ce stade donnent des résultats allant de 30 à 50 % des valeurs théoriques du taux d'éthanol produit. Ainsi, une étape de détoxification s'est avérée nécessaire pour améliorer le rendement de fermentation.

**Tableau1:** Sucres totaux et composés phénoliques après 50 min de l'hydrolyse acide à 100 °C

Acide sulfurique (%)	Sucres totaux (g.l <sup>-1</sup> )	Composés phénoliques totaux (g.l <sup>-1</sup> )
0.1	10.85	14.25
0.5	22.5	14.25
1	22.5	14.25
2	22.5	14.25
5	22.5	14.25
10	22.5	14.25
20	22.5	14.25

**Tableau 2:** Sucres et composés phénoliques en fonction des traitements de la biomasse de romarin

Constituants de déchets d'hydro-distillation (g.l <sup>-1</sup> )	Procédés de valorisation de la matière lignocellulosique			
	Hydro-distillation	Traitement à la vapeur	Hydrolyse acide	Concentration des composés phénoliques
Glucose	6.05	6.55	9.6	9.5
Xylose	2.02	2.25	7.33	7.2
Mannose	0.015	0.02	2.37	2.37
Galactose	0.225	0.25	1.2	1.2
Cellulose et Hémicellulose	8.8	9.2	0	0
Composés phénoliques totaux	2.5	5.1	14.25	5.8

### Détoxification et Précipitation des composés phénoliques totaux:

Dans le but d'éliminer les composés phénoliques inhibiteurs de la fermentation et d'améliorer le rendement en éthanol à partir du substrat de l'hydrolyse, le Ca(OH)<sub>2</sub> a été utilisé pour sa capacité à précipiter et réduire la concentration de ces composés [19]. Dans ce travail, ces composés ont été réduits significativement de 14.25 g/l à 5.8 g/l (tableau 2). Le prétraitement à la vapeur suivie par l'hydrolyse acide et la détoxification provoquent une augmentation des sucres monomères dans le milieu de 6 à 9.5 g/l pour le glucose et de 2 à 7.2 g/l pour la xylose, et diminue le taux des polysaccharides (de 8.8 à 0 g/l). Aussi, il améliore le rendement de la fermentation alcoolique de 40%.

### 2.3. Fermentation

Le but principal du traitement des déchets de la biomasse est la production de bioéthanol. Une fermentation alcoolique maximale demande l'utilisation de tous les sucres monomériques issus de l'hydrolyse de la matière lignocellulosique (cellulose et

hemicellulose). En plus des sucres, les composés phénoliques sont aussi présents et ont des effets toxiques sur le processus de la fermentation [3, 4, 5, 6]. Le problème qui se pose est de trouver le microorganisme capable de croître dans ces conditions (5.8 g/l composés phénoliques totaux) et de dégrader tous les sucres monomériques du milieu (glucose 9.5 g/l, xylose 7.2 g/l, galactose 2.37 g/l, mannose 1.2 g/l) pour une production maximale d'éthanol.

*Erwinia chrysanthemi* EC3665 est une entérobactérie à Gram négatif réputée par sa capacité de dégrader la paroi des cellules végétale grâce à la production d'enzymes extracellulaires: pectinases, cellulases et protéases. Ces enzymes hydrolysent la pectine et la cellulose pour produire des sucres simples qui servent de sources de carbone assimilable pour le métabolisme bactérien [13, 16, 19]. Ces caractéristiques nous ont conduits à tester la capacité d'*Erwinia chrysanthemi* EC 3665 dans l'utilisation des sucres simples libérés pour la production d'éthanol. La souche *Klebsiella oxytoca* déjà utilisée

dans la production d'éthanol a servi de référence [5]. Les résultats obtenus dans le tableau 3 montrent, d'une part que *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 fermente l'hydrolysats avec un rendement d'éthanol Y (P/S) = 0.25 g P/g S. Ce dernier est supérieur à celui de *Klebsiella oxytoca* dans les mêmes conditions. D'autre part, la

xylose résiduelle est pratiquement nul (0.2 g/l) pour *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 alors qu'elle est très importante pour *Klebsiella oxytoca*. Ces résultats montrent que *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 est capable de fermenter la totalité de xylose du milieu alors que *Klebsiella oxytoca* en est relativement incapable [5].

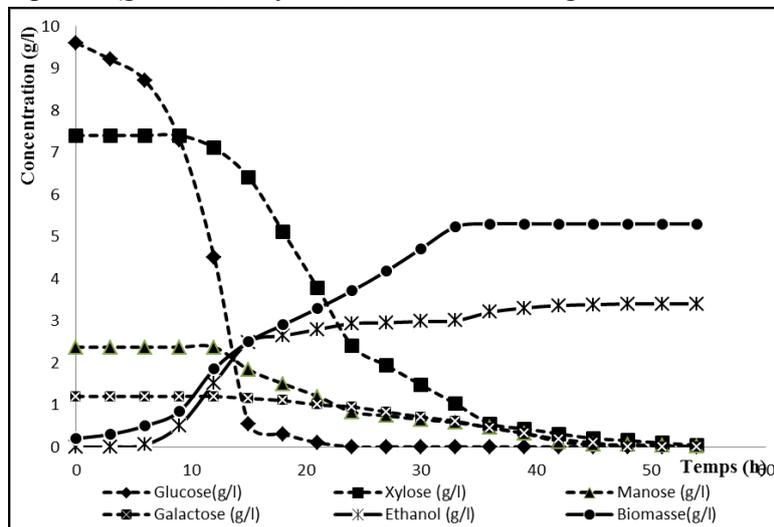
**Tableau 3** : Performance d'*Erwinia chrysanthemi* et *Klebsiella oxytoca* pour la fermentation alcoolique

	<i>Erwinia chrysanthemi</i> EC 3665	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Rendement en éthanol	0.25 gP /gS	0.16 gP /gS
Glucose résiduel	1.05 g/l	3.2 g/l
Xylose résiduel	0.2 g/l	4.01 g/l

**2.4. Cinétique de dégradation des sucres et de production de bioéthanol et de biomasse d'Erwinia chrysanthemi EC 3665**

Les courbes de consommation de substrats glucidiques (glucose, xylose,

galactose et mannose) et de production d'éthanol et de biomasse de protéines d'organismes unicellulaires en fonction du temps de fermentation par *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 sont représentées dans la figure 4.



**Figure 4** : Consommation du substrat glucidique de déchets traités au cours de la fermentation alcoolique

Cette figure présente deux phases qui signifient le phénomène de diauxie. Pendant la première phase les cellules

bactériennes utilisent seulement le glucose. Après 15 heures de fermentation, la deuxième phase se caractérise par la

dégradation et l'utilisation de la xylose, le mannose et le galactose avec une faible vitesse (0.1 kg. S.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>). On note alors que la bactérie *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 a pu utiliser la totalité de la matière lignocellulosique hydrolysée du romarin (les hexoses et les pentoses), elle a aussi montré et pour la première fois dans la

littérature la capacité de fermenter la xylose. Ces deux phases de production de l'éthanol sont confirmées par la variation de la biomasse d'*Erwinia chrysanthemi* EC3665 en fonction du temps et par les paramètres cinétiques résumés dans le tableau 4.

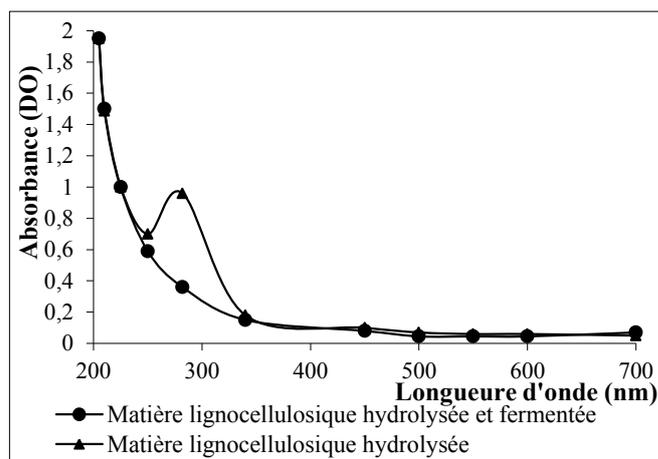
**Tableau 4:** Paramètres cinétiques de la fermentation par *Erwinia chrysanthemi* des déchets traitée

		Phase I (0-15 h)	Phase II (15-56 h)
Paramètres cinétiques	Y <sub>x/s</sub>	0.28	0,25
	Y <sub>p/s</sub>	0.27	0,078
	μ (h <sup>-1</sup> )	0.13	0.031
	Q <sub>s</sub> (g/lh <sup>-1</sup> )	0.50	0.10
	Q <sub>p</sub> (g/lh <sup>-1</sup> )	0,16	0,01
	W	0,53	0,13
	Z = (1-W)	0,47	0,87

Y<sub>x/s</sub> : Rendement de production de la biomasse par rapport au substrat ; Y<sub>p/s</sub> : Rendement théorique de production du produit par rapport au substrat ; μ (h<sup>-1</sup>) : taux de croissance ; Q<sub>s</sub> : Vitesse de consommation du substrat ; Q<sub>p</sub> : Vitesse de production du produit ; W : Fraction de substrat utilisée dans la production d'éthanol ; Z = 1 - W Fraction du substrat utilisée dans la croissance et la maintenance cellulaire.

Dans le processus de fermentation de l'éthanol, 53% (= W) du substrat sont utilisés dans la croissance et 47% (= Z) pour le maintien cellulaire dans la première phase. Tandis que dans la deuxième phase, 13% sont employés pour la croissance et

87% pour le maintien du métabolisme cellulaire. Dans un autre volet, *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 a exhibé des performances dans la déphénolisation de l'hydrolysate du romarin (figure 5).



**Figure 5 :** Spectre d'absorbance de déchets de romarin après les traitements et la fermentation en fonction de la longueur d'onde

La matière lignocellulosique hydrolysée montre une absorbance à 280nm, qui s'explique par l'existence de composés phénolique dans le contenu de l'hydrolysat des déchets de romarin traités. Plusieurs auteurs ont montré l'existence de composés phénoliques dans les hydrolysats des plantes, où le pic d'absorbance était à 280nm [18, 19, 20, 21]. L'air entre les deux courbes (matière lignocellulosique fermenté ou non) représente la fraction de composés phénoliques métabolisés par la souche *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 ou fixée sur la biomasse de cette dernière.

### Conclusion

Les résultats obtenus dans ce travail peuvent envisager des recherches plus approfondies pour la mise au point d'un procédé qui permettrait de produire des quantités non négligeables de bioéthanol à partir des centaines de milliers de tonnes de matière lignocellulosique produite par l'industrie d'extraction des huiles essentielles et d'autres industries agroalimentaires et pharmaceutiques. Les mises au point effectués ont montré que :

- Des étapes successives de prétraitement par le broyage, de traitement à la vapeur, d'hydrolyse acide sont très bénéfiques pour la libération des sucres fermentescibles.
- L'utilisation de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a aussi été utile pour précipiter et éliminer une grande partie des composés phénolique qui sont considérés comme des inhibiteurs de fermentation.
- La bactérie *Erwinia chrysanthemi* EC 3665 a été utilisée pour la première fois pour hydrolyser et fermenter la matière lignocellulosique en même temps.

Ce procédé a le mérite d'être dépolluant car il réduit énormément la

quantité de déchets solides et valorisant par la production de bioéthanol qui peut être considérée comme une très bonne forme d'énergie renouvelable, propre et ne générant pas de gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) supplémentaire dans l'atmosphère. Ce genre de procédé peut aussi améliorer les revenus des unités industrielles des pays producteurs d'huiles essentielles tel que le Maroc et permettre le développement d'activités industrielles propres qui peuvent créer des opportunités d'emploi et offrir une meilleure compétitivité sur le marché international et ainsi contribuer au développement durable de ces pays.

### Références bibliographiques

- [1].- Bhar H., Balouk A. 2011 - Les plantes aromatiques et médicinales, Ces plantes odorantes qui soulagent la douleur. *L'espace marocain*. 68 (2): 20-27.
- [2].- Eloutassi N., Louasté B., Boudine L., Remmal A. 2013 - Contribution au développement des régions rurales : Conservation de *Rosmarinus officinalis* *Environnement ScienceLib*. 5 (13) : 1-14.
- [3].-Kamdem I., Tomekpe K., Thonart P. 2011 - Production potentielle de bioéthanol, de biométhane et de pellets à partir des déchets de biomasse lignocellulosique du bananier (*Musa* spp.) au Cameroun *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15 (3): 471-483.
- [4].-O'Donohue O.M. 2013 - La biomasse, simple source d'énergie ou source de matières premières renouvelables? *Innovations Agronomiques*. 26: 41-50
- [5].- El Asli A., Boles E., Hollenberg CP., Errami M. 2002 - Conversion of xylose to ethanol by a novel phenol-tolerant strain of Enterobacteriaceae isolated from olive mill wastewater. *Biotechnology Letters*. 24 (13): 1101-1105

- [6].- Yong-Su Jin., Haiying N., Jose M.L., Jeffries T.W. 2003 - Optimal Growth and Ethanol Production from Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Require Moderate D-Xylulokinase Activity *Applied and environmental Microbiology*. 69: 495-503
- [7].-Carlson R., Nordahl A. 1993 - Exploring Organic Synthetic Experimental Procedures. *Topics in current chemistry*.166: 1-64.
- [8].-Errachidi F. 2006 - *Etude des sous-produits des unités productrices des jus d'agrumes au Maroc : Caractérisation et valorisation par génie fermentaire*. Doctorat Nationale ; Fès. Maroc.
- [9].-Eloutassi N., Louasté B., chaouch M. 2011 - Production Des Sucres Simples À Partir Du Lactose Issu Du Lactosérum. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* 5 (2):39-53.
- [10].-Yan L., Shuzo T. 2006 - Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69 (6), 627-642.
- [11].-Senthilkumar V., Gunasekaran P. 2013 - Bioethanol production from cellulosic substrates: Engineered bacteria and process integration challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 64 (11), 845-853.
- [12].-Barras F., Lepelletier M., Chippaux M. 1986 - Influence of gyrA mutation on the expression of *Erwinia chrysanthemi* clb genes cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 166: 346-348
- [13].-Chapon V., Czjzek M., El Hassouni M., Py B., Juy M., Barras F. 2001 - Type II protein secretion in Gram-negative pathogenic bacteria: the study of the structure/secretion relationships of the cellulase Cel5 (ex EGZ) from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Mol. Biol.* 310: 1053-1064.
- [14].-Givry S. 2006 - *Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de Lactobacillus bifementans*. Doctorat universitaire de Reims Champagne-Ardenne.
- [15].- Dubois M., Gilles A.K., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956 - Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28: 350-356.
- [16].- Shihui Y., Qiu Z., Jianhua G., Amy O. Glick B. Ibekwe M., Cooksey A., Yang C. 2007 -Global Effect of Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis on Multiple Virulence Factors of *Erwinia chrysanthemi*. *Appl. Environ. Microbiol.*73 (4): 1079-1088.
- [17].- Wright, R. S., Bond, B. H., Chen, Z. 2013 - Steam bending of wood; Embellishments to an ancient technique. *BioRes.* 8(4): 4793-4796.
- [18].-Poursorkhabi V., Misra, M., Mohanty, A. K. 2013 - Extraction of lignin from a coproduct of the cellulosic ethanol industry and its thermal characterization," *BioRes.* 8(4): 5083-5101.
- [19].-Lakhtar H. 2009 - *Culture du Lentinula edodes (Berk.) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : Transformation des polyphénols des margines*. Doctorat universitaire des Sciences de l'Environnement. Saint Jérôme. France.
- [20].-Vršanská M., Kolenová K., Puchart V., Biely P. 2007 - Mode of action of

glycoside hydrolase family 5  
glucuronoxylan xylanohydrolase from  
*Erwinia chrysanthemi* *FEBS J.* 274  
(7):1666-77.

[21].- Chuan L., Chang K., Ming Z.,  
Huang C., Hung J. 2011: Pretreatment and

hydrolysis of cellulosic agricultural wastes  
with a cellulase-producing *Streptomyces*  
for bioethanol production. *Biomass and*  
*Bioenergy.* 35 (5): 1878–1884.