



DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°/SNV/2023

THÈSE

Présentée par

DERABLI Besma

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{ème} CYCLE

Filière: **SCIENCES BIOLOGIQUES**

Spécialité: **MICROBIOLOGIE GÉNÉRALE**

**Valorisation de la biomasse lignocellulosique d'*Opuntia ficus indica*
pour la bioproduction d'acide lactique**

Soutenue publiquement le: **05/03/2023**.

Devant le Jury:

Président	M. HARZALLAH Daoud	Professeur à l'Université de Sétif 1
Directrice de thèse	M ^{me} NANCIB Aicha	Professeur à l'Université de Sétif 1
Examineur	M. SILINI Allaoua	Professeur à l'Université de Sétif 1
Examineur	M. KECHA Mouloud	Professeur à l'Université de Bejaia
Examineur	M. KACEM CHAUCHE Noredine	Professeur à l'Université de Constantine
Examinatrice	M ^{me} LAKHDARI Wassima	Professeur à l'INRA Touggourt

Remerciement

Je souhaite remercier en premier lieu ma directrice de thèse, **Aicha NANCIB**, Professeur à l'université Ferhat Abbas qui m'a permis de travailler sur un sujet de recherche d'actualité à la fois passionnant et novateur. J'ai eu la chance de travailler sous sa direction et je lui suis très reconnaissante pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé, sa patience, son aide, sa disponibilité et ses conseils pertinents. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela. Je remercie également le chef d'équipe et les membres du laboratoire pour m'avoir accueilli parmi eux.

Il m'est agréable d'exprimer mes sincères remerciements et ma considération aux honorables membres de jury.

Je remercie **HARZALLAH Daoud**, Professeur à l'Université de Sétif -1- pour avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie :

KECHA Mouloud, Professeur à l'Université de Bejaia ;

KACEM CHAUCHE Noredine, Professeur à l'Université de Constantine 1 ;

SILINI Allaoua, Professeur à l'Université de Sétif -1- ;

LAKHDARI Wassima, Professeur à l'INRA Touggourt ;

Pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également les techniciens du laboratoire pour leur disponibilité et leur aide.

Sans oublier de remercier mes collègues pour les bons moments que j'ai partagés avec eux durant mon parcours de doctorat.

Dédicace

‘Un peu de science éloigne de Dieu, beaucoup de science y ramène’

Louis pasteur

Je dédie cette thèse:

A mes parents, les seules personnes qui croient toujours en moi. Je suis là grâce à ma famille, et je serai plus loin grâce à leur soutien.

A mon ange gardien Samy qui m’a appris que la vie est très courte et l’échec n’est qu’une leçon.

A ma princesse et ma sœur Sofia qui m'a soutenue et réconfortée. Je la remercie pour sa générosité.

A toute ma famille,

Vous êtes mon trésor le plus cher.

Une pensée particulière pour ceux ou celles qui sont décédés lors de la pandémie de COVID.

Liste de Matières

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Liste des communications.....	iv
Résumé.....	v
المخلص.....	vi
Abstract.....	vii
Introduction.....	1

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1. L' <i>Opuntia ficus indica</i>	4
1.1. Distribution géographique d' <i>OFI</i>	5
1.2. Utilisation d' <i>OFI</i>	6
1.2.1. Domaine médical.....	6
1.2.2. Domaine alimentaire.....	6
1.2.3. Domaine cosmétique.....	7
1.2.4. Domaine de la biotechnologie.....	7
1.3. Composition d' <i>OFI</i>	8
1.3.1. Biomasse lignocellulosique.....	13
1.4. Prétraitement de la BLC.....	16
1.5. Méthodes de détoxification.....	22
2. Bactéries lactiques.....	24
2.1. Lactobacilles.....	26
2.2. Lactocoques.....	26
2.3. Besoins nutritionnels des bactéries lactiques.....	27
2.4. Métabolisme des bactéries lactiques.....	28
2.4.1. Métabolisme des glucides.....	28
2.5. Utilisation des bactéries lactiques.....	31
3. Acide lactique.....	31
3.1. Production d'acide lactique.....	31
3.1.1. Production d'acide lactique à partir de la BLC.....	33
3.2. Utilisation de l'acide lactique.....	37
4. Plans d'expériences.....	38
4.1. Plan de Box-Behnken.....	40
4.2. Plans composites centrés.....	41

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

1. Microorganismes utilisés	43
1.1. Conservation des souches	43
2. Milieux de culture	43
2.1. Milieux de préculture	43
2.2. Milieux de production	43
2.2.1. Milieux semi synthétiques	44
2.2.2. Milieux à base d' <i>OFI</i>	45
2.2.2.1. Extraction de jus de pelures de fruit	45
2.2.2.2. Hydrolyse des cladodes	45
2.3. Stérilisation	47
3. Procédé de culture discontinue	48
4. Méthodes analytiques	48
4.1. Mesure de l'humidité	48
4.2. Détermination de l'acidité titrable	48
4.3. Estimation de la biomasse	48
4.4. Dosage des sucres réducteurs (SR)	49
4.5. Dosage d'acide lactique	49
4.6. Dosage des protéines	49
4.7. Détermination des cendres	49
4.8. Dosage de furfural	50
4.9. Dosage de 5-Hydroxyméthyl-furfural (5-HMF)	50
4.10. Dosage des éléments minéraux	50
4.11. Détermination de phosphore	50
5. Paramètres cinétiques	50
6. Méthodologie de surfaces de réponse (MSR)	51

Chapitre 3. Résultats et discussion

1. Criblage des bactéries lactiques.....	53
1.1. Croissance sur xylose.....	53
1.2. Croissance sur un mélange de xylose et de glucose.....	55
2. Matière première d' <i>OFI</i>	56
2.1. Caractérisation de la BLC d' <i>OFI</i>	56
2.2. Optimisation des prétraitements des COFI par les plans d'expériences.....	59
2.2.1. Optimisation de l'hydrolyse acide de COFI par l' H_3PO_4	59
2.2.2. Optimisation de l'hydrolyse acide de COFI par l' HCl	63
2.2.3. Hydrolyse enzymatique de COFI.....	68
2.2.3.1. Effet du temps de l'hydrolyse enzymatique de COFI.....	68
2.2.3.2. Effet de la concentration de cellulase sur l'hydrolyse enzymatique de COFI.....	69
2.2.3.3. Hydrolyse enzymatique de COFI ₃₅₀	70
3. Production de l'acide lactique sur hydrolysats de COFI.....	72
3.1. Production d'acide lactique sur l'hydrolysats de COFI par H_3PO_4	72
3.1.1. Production d'acide lactique sur hydrolysats sans détoxification.....	72
3.1.2. Production d'acide lactique sur hydrolysats détoxifiés.....	72
3.1.3. Production d'acide lactique sur l'hydrolysats HAH_3PO_4 : effet des sels.....	74
3.1.4. Production d'acide lactique sur l'hydrolysats HAH_3PO_4 : effet de l'extrait de levure.....	74
3.2. Production d'acide lactique sur hydrolysats acides de COFI ₃₅₀	75
3.3. Production d'acide lactique sur hydrolysats enzymatiques de COFI ₃₅₀	75
4. Production d'acide lactique à partir de PFOFI.....	76
5. Production d'acide lactique sur un mélange de PFOFI et COFI ₃₅₀	78
Conclusion	79
Références bibliographiques	81
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique d' <i>OFI</i>	11
Tableau 2 : Les différents prétraitements (description, avantages et inconvénients)...	20
Tableau 3 : Différentes techniques de détoxification	23
Tableau 4: Classification des bactéries lactiques selon Orla Jensen (1919).....	25
Tableau 5: Production d'acide lactique à partir de la biomasse cellulosique	36
Tableau 6 : Concepts de base pour l'élaboration d'un plan d'expérience	39
Tableau 7 : Composition du milieu MRS modifié.....	44
Tableau 8 : Composition du milieu Elliker modifié	44
Tableau 9: Niveaux des facteurs hydrolyse acide de COFI par l' H_3PO_4 (121°C)	45
Tableau 10 : Niveaux des variables. Hydrolyse de COFI par l'HCl	47
Tableau 11: Conditions de fermentation des souches lactiques	48
Tableau 12 : Paramètres cinétiques des souches lactiques sur milieux modifiés	54
Tableau 13: Paramètres cinétiques des souches <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc20</i> et <i>Lc.lactis</i> sur MRSMGX et EllikerMGX	56
Tableau 14: Caractérisation chimique de la matière première	57
Tableau 15: Composition minérale d' <i>OFI</i> (COFI, COFI ₃₅₀ et PFOFI).....	59
Tableau 16: Matrice expérimentale du modèle composite centré	62
Tableau 17: Analyse de régression des résultats obtenus à partir du CCD	63
Tableau 18: Matrice expérimentale du modèle de Box-Behnken	64
Tableau 19 : Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box-Behnken	67
Tableau 20 : Comparaison entre différentes conditions d'hydrolyse de la BLC	71
Tableau 21 : Paramètres cinétiques de <i>Lb. plantarum</i> sur l'hydrolysate acide de COFI ...	74
Tableau 22 : Paramètres cinétique de de <i>Lb. plantarum</i> sur le mélange PFOFI/COFI ₃₅₀	78

Liste des figures

Figure 1 : Composants d' <i>Opuntia ficus indica</i>	5
Figure 2 : Structure de la cellulose	15
Figure 3: Monomères formant l'hémicellulose.....	15
Figure 4 : Monomères formant la lignine	16
Figure 5 : Prétraitements de la BLC	17
Figure 6 : Phylogénie des bactéries lactiques	25
Figure 7 : Voie de production d'acide lactique à partir de glucose par les bactéries lactiques	30
Figure 8 : Voies de synthèse d'acide lactique	33
Figure 9 : Applications commerciales d'acide lactique	37
Figure 10 : Différents types des plans d'expériences.....	40
Figure 11 : Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs.....	41
Figure 12: Plan composite centré à trois 3 variables	42
Figure 13: Cinétiques de croissance de <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. Brevis</i> et <i>Lb. plantarum</i> sur MRSMX et; <i>Lc 20</i> et <i>Lc. Lactis</i> sur EllikerMX.....	54
Figure 14 : Cinétiques de croissance de <i>Lb. brevis</i> et <i>Lb. plantarum</i> sur MRSMGX et de <i>Lc 20</i> et <i>Lc. lactis</i> sur EllikerMGX.....	55
Figure 15 : Composition en sucres réducteurs totaux (SRT) de COFI ₃₅₀ avant traitement, après hydrolyse acide (COFI ₃₅₀ HA) et après hydrolyse enzymatique (COFI ₃₅₀ HE).....	58
Figure 16 : Corrélation entre la concentration du sucre expérimental et du sucre prédit.....	61
Figure 17 : Corrélation entre la concentration du sucre expérimental et du sucre prédit.....	66
Figure 18 : Effet du temps de l'hydrolyse enzymatique sur la récupération des sucres réducteurs de COFI.....	68
Figure 19 : Effet de la concentration de cellulase sur la récupération des sucres réducteurs de COFI.....	69
Figure 20 : Cinétiques de croissance, de consommation et de production d'acide lactique de <i>Lb. plantarum</i> sur HAH ₃ PO ₄ D et HAH ₃ PO ₄ ND.....	73
Figure 21: Effet de la concentration initiale en sucre de jus de JPOFI sur le rendement, la productivité et la production d'acide lactique par <i>Lb. plantarum</i>	77

Liste des Abréviations

5HMF : 5-HydroxyMethyl Furfural.

AL : Acide Lactique.

APL : Acide Poly Lactique.

ATCC : American Type Culture Collection.

BLC : Biomasse LignoCellulosique.

CCD : Central Composite Design.

COFI : Cladodes d'*OFI*.

COFI₃₅₀ : Cladodes d'*OFI* granulées 350µm.

COFIH₃PO₄ : Cladodes d'*OFI* prétraité par H₃PO₄.

COFIHCl : Cladodes d'*OFI* prétraité par HCl.

DAPL : D- Acide Poly Lactique.

DLAPL : DL- Acide Poly Lactique.

EllikerMX : Elliker modifié (xylose)

EllikerMGX : Elliker modifié (glucose + xylose)

EMP : Embden-Meyerh of Pathway.

EPS : Exo- PolySaccharides.

FAO : l'Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture.

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

LAPL : L- Acide Poly Lactique.

Lb: *Lactobacillus*.

Lc : *Lactococcus*.

LDH : Lactate DésoHydrogénase.

MAC : Métabolisme Acide des crassulacées.

MRS : Man Rogosa et Sharpe.

MRSMGX : MRS modifié (glucose+ xylose).

MRSMX : MRS modifié xylose.

OFI : *Opuntia ficus indica*.

PFOFI : pelures de fruit d'*OFI*.

PKP : Pentose Ketose Pathway.

SHF : Separated Hydrolysis and Fermentation.

SSF : Simultaneous Saccharification and Fermentation.

Liste des communications

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont contribué à une publication et aux communications orales et affichées suivantes:

Publication:

Derabli, B., Nancib, A., Nancib, N., Aníbal, J., Raposo, S., Rodrigues, B., & Boudrant, J. (2022). *Opuntia ficus indica* waste as a cost effective carbon source for lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, 370, 131005.

Communications affichées:

-Journée doctorale, université de Sétif le 25 Avril 2018, Bioproduction d'acide lactique sur la biomasse lignocellulosique *d'OFI*

-Congrès international RAB Constantine, 7 Mai 2018, valorisation de la biomasse lignocellulosique *d'OFI* pour la production d'acide lactique.

Communication orale:

-Congrès international de valorisation des bioressources, Boumerdes, 26 et 27 Novembre 2019. Optimisation par la méthodologie des surfaces de réponse de l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique de l'*OFI* pour la production d'acide lactique.

Résumé

Ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte de valorisation de la biomasse lignocellulosique d'*Opuntia ficus indica* (*OFI*) et principalement de son utilisation dans la production d'acide lactique. La biomasse lignocellulosique de l'*OFI* est composée d'hexoses et de pentoses et son utilisation comme substrat bon marché représente une voie prometteuse de valorisation par la production de divers métabolites à haute valeur ajoutée. Cependant, peu de bactéries consomment efficacement les pentoses. Dans le but de fermenter ces derniers, des souches lactiques ont été testées pour leur capacité à fermenter le xylose. Une bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* isolée à partir de lait de chamelle a été retenue pour sa meilleure performance.

La source potentielle de sucres de la biomasse lignocellulosique des cladodes d'*OFI* est sous forme de cellulose et d'hémicelluloses exploitables pour la production d'acide lactique. Cette bioconversion fait intervenir trois étapes clés : une étape de prétraitement de la matière première, une étape d'hydrolyse enzymatique ou chimique, enfin, une étape de fermentation.

Afin d'optimiser l'hydrolyse acide de cladodes d'*OFI* (COFI) et récupérer le maximum de sucres fermentescibles, des méthodes statistiques de surfaces de réponse ont été appliquées. Un modèle statistique Composite Centré (CCD) a été réalisé pour l'hydrolyse de COFI par l' H_3PO_4 . La concentration de sucres obtenue est de 15,6 g/L. La production d'acide lactique à partir de l'hydrolysate acide enrichi en sels et en extrait de levure a permis d'obtenir 7,28 g/L d'acide lactique avec une productivité de 0,27 g/L.h et un rendement de 60%. Un modèle box behnken a été appliqué pour l'hydrolyse acide de COFI par l'HCl. Près de 28 g/L de sucres sont obtenus.

Un procédé conventionnel, d'hydrolyse enzymatique de COFI et de COFI₃₅₀ a été conduit également dans des conditions optimales par la cellulase. Plusieurs fermentations par *Lactobacillus plantarum* ont été réalisées : à partir de (i) l'hydrolysate acide de COFI₃₅₀, (ii) l'hydrolysate enzymatique de COFI₃₅₀ (hydrolyse acide suivie d'une hydrolyse enzymatique), les quantités d'acide lactique obtenues sont respectivement 6,4 et 9,17 g/L.

Enfin l'extrait de pelures de fruit d'*OFI* est très favorable à la croissance de *Lactobacillus plantarum* et à la production d'acide lactique. Près de 24 g/L d'acide lactique ont été obtenus avec une productivité de 0,95 g/L.h et un rendement de 78%.

Mots clés : *Opuntia ficus indica*, biomasse lignocellulosique, acide lactique, *Lactobacillus plantarum*, plans pour surfaces de réponse.

Abstract

This thesis is part of the context for the valuing of the lignocellulosic biomass of *Opuntia ficus indica* (*OFI*) and mainly of its use in the production of lactic acid. The lignocellulosic biomass of *OFI* is composed of hexoses and pentoses and their use as a cheap substrate represents a promising way of valorization through the production of various high value-added metabolites. However, few bacteria efficiently consume pentoses ; In order to ferment these last ones ; lactic strains were tested for their ability to ferment xylose. A lactic bacterium *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk was selected for its better performance.

The potential source of sugars in the lignocellulosic biomass of *OFI* cladodes is in the form of cellulose and hemicelluloses that can be used for the production of lactic acid. This bioconversion involves three key steps: a raw material pre-treatment step, an enzymatic or chemical hydrolysis step, and finally, a fermentation step.

In order to optimize the acid hydrolysis of cladodes of *OFI* (*COFI*) and recover the maximum of fermentable sugars, statistical response surface methods were applied. A Centered Composite (CCD) statistical model was carried out for the hydrolysis of *COFI* by H_3PO_4 . The concentration of sugars obtained is 15,6 g/L. The production of lactic acid from the acid hydrolyzate enriched with salts and yeast extract made it possible to obtain 7,28 g/L of lactic acid with a productivity of 0, 27 g/L.h and a yield of 60%. A behnken box model was applied for the acid hydrolysis of *COFI* by HCl. Nearly 28 g/L of sugars are obtained.

A conventional process, of enzymatic hydrolysis of *COFI* and of *COFI*₃₅₀ was also carried out under optimal conditions by cellulase. Several fermentations by *Lactobacillus plantarum* were carried out: from (i) the acid hydrolyzate of *COFI*₃₅₀, (ii) the enzymatic hydrolyzate of *COFI*₃₅₀ (acid hydrolysis followed by enzymatic hydrolysis), the quantities of lactic acid obtained are 6,4 and 9,17 g/L respectively.

Finally, *OFI* fruit peel extract is very favorable to the growth of *Lactobacillus plantarum* and the production of lactic acid. Nearly 24 g/L of lactic acid were obtained with a productivity of 0,95 g/L.h and a yield of 78%.

Keywords: *Opuntia ficus indica*, lignocellulosic biomass, lactic acid, *Lactobacillus plantarum*, Response surface methodology.

الملخص

يعد هذا العمل المطروح جزءاً من سياق تئمين الكتلة الحيوية lignocellulosique من التين الشوكي (OFI) وبشكل أساسي لاستخدامها في إنتاج حمض اللاكتيك. تتكون الكتلة الحيوية lignocellulosique للتين الشوكي من ستة وخمسة سكريات واستخدامها كركيزة رخيصة يمثل طريقة واعدة للتئمين من خلال إنتاج نواتج مختلفة ذات قيمة مضافة عالية. ومع ذلك ، فإن القليل من البكتيريا تستهلك بكفاءة الخمس السكريات. ولهذا ، تم اختبار سلالات اللاكتيك لقدرتها على تخمير السليلوز. ومن بينهم تم اختيار بكتيريا (*Lactobacillus plantarum*) المعزولة من حليب الإبل لأدائها الأفضل.

المصدر المحتمل للسكريات في الكتلة الحيوية lignocellulosique لنبته التين الشوكي: السليلوز والهيميسليلوز الذي يمكن استغلاله لإنتاج حمض اللاكتيك. يتضمن هذا التحويل الحيوي ثلاث خطوات رئيسية: خطوة المعالجة المسبقة للمواد الخام ، وخطوة التحلل المائي الأنزيمي أو الكيميائي ، وأخيراً ، خطوة التخمير.

من أجل تحسين التحلل المائي الحمضي لنبته التين الشوكي واستعادة الحد الأقصى من السكريات القابلة للتخمير بواسطة تطبيق طرق سطح الاستجابة الإحصائية. تم تنفيذ نموذج إحصائي مركب مركزي (CCD) للتحلل المائي الحمضي لنبته التين الشوكي بواسطة حمض الفوسفوريك (H_3PO_4). تركيز السكريات المتحصل عليها هو 15.6 جم / لتر. أتاح إنتاج حمض اللاكتيك من التحلل الحمضي المخضب بالأملاح وخالصة الخميرة الحصول على 7.28 جم / لتر من حمض اللاكتيك بإنتاجية 0.27 جم / لتر / ساعة وعائد 60%. تم تطبيق نموذج box-behnken للتحلل المائي الحمضي لـ COFI بواسطة HCl. يتم الحصول على ما يقرب من 28 جم / لتر من السكريات.

تم إجراء عملية تقليدية للتحلل المائي الإنزيمي لـ COFI و COFI₃₅₀ أيضاً في ظل الظروف المثلى بواسطة السليلاز. تم إجراء العديد من عمليات التخمير بواسطة *Lactobacillus plantarum*: من (1) التحلل الحمضي لـ COFI₃₅₀ ، (2) التحلل الأنزيمي لـ COFI₃₅₀ التحلل المائي الحمضي متبوعاً بالتحلل المائي الأنزيمي ، كميات حمض اللاكتيك التي تم الحصول عليها هي 6.4 و 9.17 جم / لتر على التوالي.

أخيراً ، يعد مستخلص قشر فاكهة التين الشوكي مناسباً جداً لنمو *Lactobacillus plantarum* وإنتاج حمض اللاكتيك. تم الحصول على ما يقرب من 24 جم / لتر من حمض اللاكتيك بإنتاجية 0.95 جم / لتر في الساعة وعائد 78%.

الكلمات المفتاحية: *Opuntia ficus indica* ، الكتلة الحيوية lignocellulosic ، حمض اللاكتيك ، *Lactobacillus plantarum* ، خطط لأسطح الاستجابة.

Introduction

Actuellement la réduction des déchets générés par le secteur commercial et la rationalisation de la consommation des ressources naturelles représentent les principales motivations des grandes entreprises. C'est une démarche environnementale préventive. Elle contribue à l'atteinte des objectifs d'augmentation de la valorisation organique des déchets et de diminution des quantités de déchets orientées en incinération ou en décharge.

La biomasse végétale constitue un potentiel inestimable de matière lignocellulosique: une ressource abondante et renouvelable ayant un impact sur l'environnement. L'importance de cette ressource réside dans son abondance, son faible coût ainsi que dans le fait qu'elle représente une source organique naturelle disponible. En effet, les composants majeurs de cette ressource sont les composants macromoléculaires de la paroi cellulaire : cellulose, hémicellulose et lignine. L'utilisation rationnelle de cette biomasse comme substitut au carbone fossile constitue donc un enjeu majeur et est la force motrice du développement des bioraffineries qui auront un rôle important à jouer dans un avenir proche.

L'Algérie possède un potentiel énorme en ressources naturelles renouvelables qui peuvent être utilisées comme sources de carbone pour la production de divers métabolites à haute valeur ajoutée. En effet, l'*Opuntia ficus indica* (*OFI*) constitue une ressource encore très largement inexplorée et très prometteuse vue ses caractéristiques biotechnologiques. C'est une ressource naturelle ayant un impact sur l'environnement, d'où l'urgence de trouver des applications convenables de cette matière. Sa grande disponibilité et sa biodégradabilité, font d'elle une bonne candidate pour une valorisation et une meilleure exploitation. En effet, la bioconversion des sous-produits issus de l'*OFI* pourrait constituer un programme d'avenir pour le développement de l'agriculture

Comme toutes les industries alimentaires, la transformation industrielle de l'*OFI* génère des déchets et sous-produits dont la valorisation est largement reconnue comme une solution privilégiée pour leur gestion, réduisant la charge polluante des matières déversées et offrant des opportunités pour le développement de nouveaux produits naturels.

Cette plante peu exigeante en eau et même plus rentable que les céréales suscite l'intérêt grandissant de plusieurs organisations alimentaires internationales, à l'instar de l'Organisation des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO).

Une alternative de l'utilisation économique de cette biomasse étant son utilisation comme substrat de fermentation en vue de la production d'acide lactique, un précurseur pour la production d'acide polylactique (PLA) occupant une place importante au sein de la grande famille des polymères biodégradables, biocompatibles et biorecyclables.

En raison de l'importance de l'utilisation de ces produits verts dérivés de l'acide lactique dans de nombreux secteurs de l'activité humaine, il a été estimé que la demande mondiale d'acide lactique passera de 1 220,0 kilotonnes en 2016 à 1 960,1 kilotonnes d'ici 2025 (**De Oliveira et al., 2018**). En effet, le marché mondial de cet acide était évalué à 2,7 milliards de dollars en 2020 et devrait augmenter à un taux de croissance annuel de 8 % (**Grand View Research., 2021a**) pour atteindre 5,02 milliards de dollars en 2028 (**Grand View Research., 2021b**).

Néanmoins, une grande difficulté dans le processus de fermentation est le coût élevé des matières premières utilisées comme sources d'énergie et de carbone, principalement des sucres raffinés, représentant un coût opérationnel important.

Différentes matières premières à bon marché sont utilisées en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique. Toutefois pour une production rentable, un bon équilibre s'impose, entre la qualité nutritionnelle de la matière première, son prix et sa disponibilité sur le marché. Il convient donc de trouver des solutions, notamment dans une meilleure valorisation des ressources naturelles.

Ce travail s'inscrit dans cette volonté de valorisation de la biomasse lignocellulosique telle que l'*OFI* pour la production d'acide lactique par *Lactobacillus plantarum*.

Nous commencerons dans le chapitre I par des rappels bibliographiques afférents à notre étude. Ce dernier est dévolu à l'état des lieux des connaissances sur l'*OFI* et sa valorisation; hydrolyse de la matière lignocellulosique; les bactéries lactiques et leurs métabolismes carbonés; l'acide lactique, son application et sa production.

Le matériel et méthodes de ce mémoire seront décrits dans le chapitre II.

Le chapitre III sera consacré aux résultats et discussion. Ainsi le travail de recherche s'articule autour de ces points principaux:

☞ Caractérisation de l'*OFI*

☞ Mise au point d'un milieu de culture à base de jus d'*OFI* en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique.

Cette étude concerne :

- La mise au point de la technique d'extraction de jus d'*OFI* (cladodes et pelures)
- La mise en œuvre des plans d'expériences du type Composite Centré et Box behnken afin d'optimiser les conditions d'hydrolyse acide des cladodes
- L'hydrolyse enzymatique des cladodes
- L'étude du comportement cinétique de *Lactobacillus plantarum* sur les différents hydrolysats d'*OFI*
- Enfin, dans la dernière partie des résultats, nous examinerons la production d'acide lactique à partir de pelures de fruits d'*OFI*.

Nous terminerons par une conclusion générale en envisageant les perspectives possibles à la poursuite de ce travail.

Synthèse bibliographique

1. *L'Opuntia ficus indica (OFI)*

L'Opuntia ficus indica (OFI) communément appelé figuier de Barbarie, est une plante robuste originaire des zones arides et des régions semi arides du Mexique. Elle a été introduite dans l'Afrique du nord au 16^{ème} siècle (**Griffith, 2004 ; Reyes-Agüero et al., 2005 ; Loretta et al., 2019**). Elle appartient au règne: Plantae, Famille des Cactaceae, Sous famille des Opuntioideae et Genre: *Opuntia* (**Ventura-Aguilar et al., 2017**).

La famille des Cactaceae est un groupe d'environ 1600 espèces subdivisées en trois sous-familles Cactoideae, Opuntioideae et Pereskioideae (**Ventura-Aguilar et al., 2017**).

C'est une plante qui peut atteindre jusqu'à 2 mètres de hauteur avec un tronc succulent et segmenté. Ses articles aplatis mais épais, en forme de raquettes ovales (Cladodes) de couleur vert mat, ayant une longueur de 20 à 35 cm et une largeur de 10 à 20 cm. Les fleurs mesurent 5 à 6 cm de diamètre ont une couleur jaune ou orange (**Vilà et al., 2003 ; Barba et al., 2020**). Ses fruits sont des baies charnues, ovoïdes ou piriformes pourvues d'épines, ils sont généralement verdâtres ou jaunes à maturité. La pulpe est juteuse, de couleur jaune-orangé, rouge ou pourpre (**Sutton et al., 1981; Lüttge, 1993**), la pulpe parsemée de nombreuses petites graines représentant 10 à 15% de la pulpe (**Figure 1**). Sur le plan physiologique, l'*OFI* est une plante de type MAC (Métabolisme Acide des Crassulacées). Elle a la particularité de fixer le dioxyde de carbone et de libérer l'oxygène pendant la nuit et de fermer ses stomates pendant le jour. Ce qui permet de limiter les pertes d'eau par évapo-transpiration pendant les heures les plus chaudes (**Sutton et al., 1981; Lüttge, 2004; Nobel, 2002 ; Barba et al., 2020**).



Figure 1 : Composants d'*Opuntia ficus indica* (a) les cladodes (b) les fleurs et (c) Fruit.

1.1. Distribution géographique d'*OFI*

La plupart des espèces de cette famille sont dans le genre *Opuntia* et sont distribuées en Europe, la Méditerranée, l'Afrique, l'Espagne, l'Amérique du Sud, le sud des États-Unis, le nord du Mexique, et d'autres régions (Loretta et al., 2019; De Farias et al., 2021). On le trouve dans les régions tempérées (Italie), les zones africaines et américaines subtropicales, en Asie (Chine, Corée du Sud) ainsi que dans les régions froides comme le Canada et l'Argentine (Russel et Felker, 1987; Mohamed-Yasseen et al., 1995; Mounir et al., 2020). De vastes zones rencontrées en Algérie, en Chili, et en Brésil sont cultivées d'une part pour prévenir l'érosion du sol dans les zones arides, et d'autre part en tant que substituant de fourrage pour l'alimentation animale pendant les périodes de sécheresse (Malainine et al., 2001; Azizi et al., 2019 ; De Farias et al., 2021).

Il existe deux variétés d'*OFI*: une variété inerme et une variété épineuse (Brutsch et Zimmermann, 1993). La variété inerme présente par rapport à la variété épineuse, l'avantage d'être facilement manipulée et exploitée comme fourrage (Sadok, 2014). En Algérie les deux variétés existent : Variété inerme : se trouve à Tebessa (Kissa) et M'sila (Belaiba), la variété épineuse est répandue à Doukkara (Tébessa), Choucha (Laghouat) et Zaafrane (Djelfa) (Chaouche et Abdul- Hossain, 2008).

1.2. Utilisation d'*OFI*

L'importance de l'*OFI* est liée aux nombreuses utilisations économiques de l'espèce.

1.2.1. Domaine médical

Le jus de cladodes d'*OFI* est utilisé pour le traitement des brûlures, des blessures, de l'œdème, et de l'indigestion. Il contribue à la réduction du taux de glucose sanguin chez les diabétiques et permet notamment de ralentir l'absorption des lipides par l'organisme. L'effet de satiété que le mucilage de la plante entraîne et sa capacité à absorber les graisses alimentaires lui confèrent des vertus amaigrissantes (**Saenz, 2000; Hassan et al., 2011**)

Les cladodes sont également employés pour le traitement de l'ulcère gastrique. (**Galati et al., 2002**). Les fleurs d'*OFI* sont utilisées comme régulant diurétique et comme remède au dysfonctionnement de la prostate (**Pimienta-Barrios et al., 1993 ; Aruwa et al., 2018**). De nombreuses études ont montré l'activité analgésique, anti-inflammatoire, antioxydante et anticancéreuse du genre *Opuntia*. Ce qui lui permet d'être le traitement approuvé en médecine mexicaine traditionnelle (**Aruwa et al., 2018 ; Rocchetti et al., 2018; De Farias et al., 2021 ; Pensamiento-Niño et al., 2021**).

1.2.2. Domaine alimentaire

Les cladodes d'*Opuntia* peuvent être traités pour obtenir les produits suivants : jus, conserves au vinaigre, saumures, gelées, farines, sucreries, sauces, (**Moreno-Álvarez et al., 2009**). Les fruits sont consommés à l'état frais, congelés, confits ou transformés en jus concentré, en boisson alcoolisée (**López, 1995; Mohamed- Yasseen et al., 1995; Hamdi, 1997 ; Ramadan et Mörsel, 2003**).

En Algérie et dans d'autres pays de la méditerranée tel que la Tunisie et le Maroc l'*OFI* est plus souvent utilisé comme haies et aussi pour son fruit comestible. Ce dernier se consomme exclusivement frais et les cladodes sont utilisées comme fourrage pour le bétail. (**Ennouri et al., 2006 ; Ayadi et al., 2009 ; Mounir et al., 2020 ; Bouazizi et al., 2020**).

Quelques espèces d'*Opuntia* sont intéressantes comme sources alternatives de bétalaïnes. Des travaux ont montré que les fruits d'*Opuntia stricta* ont des concentrations très élevés en bêtacyanines (800 mg/kg), encore plus importante que celles obtenues pour quelques variétés de betterave rouge (**Fernández-López et al., 2002; Castellar et al., 2003**). D'autres domaines secondaires utilisent aussi certaines propriétés d'*OFI*. C'est le cas de la production du carmin, un colorant rouge recherché à cause de ses qualités naturelles et biochimiques (produit par l'élevage des cochenilles, des insectes hôtes d'*OFI*) (**Arba, 2009**).

1.2.3. Domaine cosmétique

L'huile de la graine d'*OFI* appartient à la catégorie des huiles polyinsaturées, composée majoritairement d'acide linoléique (oméga 6) et d'acide oléique et constitue donc un excellent adoucissant et réparateur cutané. Cette huile est un allié exceptionnel pour lutter contre le vieillissement. Sa richesse en vitamine E, lui confère une aptitude à protéger la peau contre les radicaux libres. Riche en matière insaponifiable (stérols et tocophérols), elle pourrait être un bon atout pour son exploitation dans le domaine de la cosmétologie étant donné les effets bénéfiques de ces substances sur l'élasticité de la peau (Sawaya *et al.*, 1983; Barbagallo et Spagna, 1999).

Les cladodes sont utilisés comme additifs dans la fabrication du shampooing, lotions astringentes, crème, savon, gel hydratant pour le visage et assouplissant de cheveux (Pimienta– Barrios, 1994; Barbera, 1995; Saenz, 2006; Arba, 2009).

1.2.4. Domaine de la biotechnologie

➤ Production de levure

La valorisation biotechnologique d'*OFI* pour la production de la levure boulangère est un investissement possible et compétitif. Diboune *et al.* (2019) ont exploré le jus de fruit et l'extrait de pelures d'*OFI* en tant que substrats pour la production de biomasse de type *Saccharomyces cerevisiae*. Afin d'acquérir le maximum d'informations sur les paramètres les plus influents à maîtriser durant la production de levure de boulanger à partir de jus de fruit d'*OFI*, un modèle statistique Composite à faces centrées (CCFD) a été réalisé. Le maximum de biomasse obtenue est de 9,29 g/L. Le jus de peau de fruit d'*OFI* est favorable à la croissance de la souche, c'est une source de carbone appropriée pour la production de la levure de boulanger. La concentration maximale de la biomasse obtenue est de 12,51 g/L.

➤ Production d'acide lactique

Des travaux ont été entrepris par Tamine *et al.* (2018), ont montré que le jus de fruit et l'hydrolysat acide des cladodes d'*OFI* peuvent servir comme matières premières de fermentation pour la production d'acide lactique par une souche de *Lactococcus lactis* isolée à partir de lait de chamelle. Le maximum d'acide lactique est obtenu (32 g/L) à partir du jus de fruit. L'hydrolysat de cladodes a permis d'obtenir près de 17 g/L d'acide lactique.

➤ **Biofloculant**

Une étude porte sur l'application d'un nouveau produit biodégradable, non polluant et biofloculant économique à base de cladodes d'*OFI* pour la clarification de l'eau a été réalisée. L'objectif principal de ce travail est de remplacer les produits commerciaux conventionnels se révélant insuffisants, infructueux ou coûteux à appliquer. En effet, la génération de biomatériaux devrait permettre de réduire le coût du traitement de l'eau dans une optique sanitaire, environnementale et durable (**Barka et al., 2013; Asnam et al., 2017**).

➤ **Boisson alcoolisée**

Le colonche est une boisson alcoolisée fermentée à faible teneur en alcool, douce, préparée à partir de la pulpe de fruit d'*OFI* (**Navarrete-Bolaños et al., 2013; Ojeda-Linares et al., 2020**).

➤ **Production d'éthanol**

Le fruit d'*OFI* et l'hydrolysat des cladodes ont été utilisés comme sources de carbone pour la production d'éthanol par différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Les cladodes subissent un traitement d'hydrolyse chimique (HCl) ou enzymatique (cellulase) qui a pour but de générer des sucres simples fermentescibles. La conversion du sucre est de 90% pour le fruit et 60% pour les cladodes (**Retamal et al., 1987**). Des concentrations allant jusqu'à 19,5 et 20,6 g/L ont été obtenues avec *Kluyveromyces marxianus* et *Saccharomyces cerevisiae*, respectivement sur hydrolysat de cladodes (**Kuloyo et al., 2014**).

1.3. Composition d'*OFI*

Le cactus a été largement ignoré par les scientifiques jusqu'au début des années 1980; ce regain d'intérêt est en partie attribué à la multifonctionnalité du fruit d'*OFI*. Ce dernier se caractérise par des niveaux élevés de certains composés chimiques, tels que la taurine, le calcium, le magnésium, les composés phénoliques et les bêtaïnes qui contribuent à la forte valeur nutritionnelle du fruit (**Piga, 2004; Bouzoubaâ et al., 2016; Rocchetti et al., 2018 ; De Farias et al., 2020**).

L'analyse de la littérature sur la composition chimique des différentes parties d'*Opuntia ficus-indica* est résumée dans le **Tableau 1**. Les cladodes sont particulièrement riches en polymères contenant des glucides, connues sous le nom de mucilage, constitués de plusieurs résidus de sucre tels que l'arabinose, le galactose, le rhamnose, le xylose et l'acide galacturonique (**Kuloyo et al., 2014; De Farias et al., 2021**).

Ils contiennent différentes molécules bioactives et fonctionnelles dont les composés phénoliques antioxydants et les caroténoïdes et ils sont particulièrement riches en fibres et en minéraux (**Aruwa et al., 2018**). La composition chimique des cladodes varie en fonction de la nature du sol, des conditions climatiques, de la saison et l'âge de la plante (**Méndez et al., 2015 ; Silva et al., 2021**). Le constituant principal des cladodes d'*OFI* est l'eau (94 %) (**Méndez et al., 2015**), les glucides représentent 57,87 % de la matière sèche, les fibres 15,54 % (**Guevara- Figueroa et al., 2010**) et les protéines 11,20 % (**Astello-García et al., 2015**). La teneur de la cellulose dans les cladodes par rapport à la matière sèche est de 22%, l'hémicellulose représente 13% (**Malainine et al., 2005**).

Le fruit d'*OFI* se compose de 43 à 57 % de pulpe, 33 à 55 % de peau et 2 à 10% de graines (**Jana, 2012**). La pulpe est caractérisée par une teneur élevée en sucre (59,40% de la matière fraîche) (**Chiteva et Wairagu, 2013**) dont le glucose (30,8%) et le fructose (20,17%) sont les sucres prédominants (**El-Beltagi et al., 2019**) (**Tableau 1**). Ils constituent 10 à 15 % du poids frais et plus de 50 % du poids sec de la pulpe (**El-Kossori et al., 1998; Feugang et al., 2006; Diboune et al., 2019**). Leur teneurs dépend des conditions climatiques et du stade de maturité (**Boutakiout et al., 2015**). La coloration des fruits est due à des pigments de type bétalaïnes (bétanine, isobétanine, bétanidine, isobétanidine et phyllocactine) responsables de la couleur rouge- violette du fruit (**Aruwa et al., 2018 ; Barba et al., 2020**).

La peau d'*OFI* est considérée comme une bonne source de minéraux (12,10%), en particulier le calcium et le potassium. elle est riche en composés bioactifs à la fonction nutraceutique et fonctionnelle. Elle contient des quantités importantes de fibres (40,8 %) (**El-Kossori et al., 1998; Aruwa et al., 2018**).

Elle est riche également en sucres essentiellement le glucose (12,16%) (**El-Beltagi et al., 2019**), en protéines (8,6%) (**Habibi et al., 2004**), en lipides neutres (acide linoléique majoritairement suivi par l'acide oléique et l'acide palmitique), en vitamines dont la vitamine C (87,82%). En plus, elle a une haute teneur en caroténoïdes et en flavonoïdes (**Ramadan et Mörsel, 2003**; ; **Cerezal et Duarte, 2005**; **El-Beltagi et al., 2019**; **Barba et al., 2020**).

Les graines constituent 10 à 15% de la pulpe. L'huile extraite des graines ne représente que 7 à 10% du poids des graines. Cette huile est très chère d'un plan nutritionnel est riche en acides gras (6,77%) (**El-Kossori et al., 1998**). Les graines sont également riches en acides organiques tels que l'acide oxalique, quinique et malique (**Aruwa et al., 2018**) et possèdent plus de 20 composés poly phénoliques, entre autres, les flavonoïdes et les tanins. L'acide aminé qui se trouve en grande quantité au niveau des graines, est l'acide glutamique suivie de l'arginine (**Borchani et al., 2021**).

Tableau 1 : Composition chimique d'*OFI*

Composant	Unité	Pulpe	Graines	Cladodes	Peau	Références
Humidité	% MF	94,40± 2,61	18,05± 2,53		90,33± 0,21	Nebache et al., 2009
				94± 0,78		Méndez et al., 2015
Fibres totaux	% MF	5,37±0,87				Medina et al., 2007
	% MS	20,5 ±0,94	54,2 ± 1,06		40,8 ±1,32	EL-Kossori et al., 1998
	g/100g Carbo-hydrates			51,24 ±2,12		Ayadi et al., 2009
	%MS		46,97 ±1,38			Sawaya et al., 1983
	%MS			15,54		Guevara-Figueroa et al., 2010
	%MS				32,67	Anwar et Sallam 2016
Hémi-cellulose	g/100g (fibres totaux)	15,5± 0,45	9,95 ± 0,58		20,8 ± 0,55	EL-Kossori et al., 1998
	%MS			13		Malainine et al., 2005
Cellulose	g/100g (fibres totaux)	14,2± 1,07	83,2 ± 0,25		71,4 ±1,99	EL-Kossori et al., 1998
	%MS			22		Malainine et al., 2005
Lignine	g/100g (fibres totaux)	0,01 ± 0,01	0,19 ± 0,04		0,06 ±0,01	EL-Kossori et al., 1998
	%MS			7,9 ± 0,8		Kuloyo et al., 2014
Carbo-hydrates	% MF	59,40 ± 0,10				Chiteva et Wairagu, 2013
	% MS			57,87 ± 19,39		Guevara-Figueroa et al., 2010
						60,65± 1,56
Fructose	% MS	20,17			1,24	El-Beltagi et al., 2019
Glucose	% MS	30,8			12,16	
Sucrose	% MS	0,34			1,86	Anwar et Sallam, 2016

Tableau 1 : Composition chimique d'*OFI* (Suite).

Composant	Unité	Pulpe	Graines	Cladodes	Peau	Références
Cendres + Minéraux						
Cendres	% MS			14,40± 0,38		Astello-García et al., 2015
					11,5	Habibi et al., 2004
		8,50 ± 0,82	5,90 ± 1,25		12,10± 1,46	EL-Kossori et al., 1998
Ca	% MS mg/100g	163	258		2090	EL-Kossori et al., 1998
				626,67		Astello-García et al., 2015
P		0,06	110		0,06	EL-Kossori et al., 1998
				2403,3		Astello-García et al., 2015
Na		7,77	Traces		traces	EL-Kossori et al., 1998
				63,33		Astello-García et al., 2015
K		559	275		3430	EL-Kossori et al., 1998
				2403,3		Astello-García et al., 2015
Mg		76,1	208		322	EL-Kossori et al., 1998
Mn		6,99	Traces		72,9	EL-Kossori et al., 1998
Zn	1,55	4,16		1,7	EL-Kossori et al., 1998	
Protéines	% MS	5,13± 0,29	11,8±1,17		8,30± 0,90	EL-Kossori et al., 1998
				11,2		Astello-García et al., 2015
					8,6	Habibi et al., 2004
Lipides	% MS	0,97± 0,06	6,77±0,51		2,43± 0,32	EL-Kossori et al., 1998
				0,69		Astello-García et al., 2015

MS: Matière Sèche.

MF: Matière fraîche.

1.3.1. Biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique (BLC) est une ressource abondante et renouvelable ayant un impact sur l'environnement (**De Farias et al., 2021**). Le matériel lignocellulosique représente 90 % du poids sec de la matière végétale. Ce substrat complexe est composé de trois polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (**Kumar et al., 2009 ; Fatma et al., 2018**). Ces trois macromolécules forment une paroi rigide grâce à la cristallinité de la cellulose, l'hydrophobie de la lignine et l'encapsulation de la cellulose dans le complexe Hém-lig (Hémicellulose-lignine) ce qui permet de résister aux attaques parasitaires (**Fatma et al., 2018**). Les cladodes d'*OFI* contiennent approximativement 22% de cellulose, 13% hémicellulose et 34% acide polysaccharidiques (**Malainine et al., 2005**).

✓ Cellulose (C₆H₁₀O₅)_n

La cellulose est la macromolécule la plus abondante, avec une production annuelle de $7,5 \times 10^{10}$ tonnes (**Okolie et al., 2021**). C'est un polymère très stable composé de 100 à 14000 unités de glucose liés les unes aux autres par des liaisons glycosidique β -1-4 formant une structure linéaire (**Figure 2**). Les extrémités hydroxylique stabilisent la structure par des liaisons hydrogènes fortes inter et intra moléculaire formant une molécule fibreuse amphipathique (possède une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe) qui assure la stabilité thermique. La cellulose a un poids moléculaire de 342,3 g/mol (**Abraham et al., 2020 ; Lorenci Woiciechowski et al., 2020**). Les chaînes de cellulose peuvent s'associer et constituer des microfibrilles dans lesquelles certaines régions sont désordonnées (zones amorphes) et d'autres ordonnées (zones cristallines). Ces microfibrilles sont pour la plupart indépendantes et faiblement liées par une liaison hydrogène (**Laureano-Perez et al., 2005 ; Abraham et al., 2020**).

✓ Hémicellulose

Un polymère hétérogène à chaînes plus courtes facilement hydrolysable composé de pentoses d'hexoses et des acides (**Figure 3**) tels que le xylose, l'arabinose, le glucose, le mannose, le rhamnose, le galactose, l'acide galacturonique et l'acide glucuronique.

Le poids moléculaire de l'hémicellulose est inférieur à celui de cellulose (**Fengel et Wegener, 1984 ; Hendriks et Zeeman, 2009 ; Fatma et al., 2018 ; Abraham et al., 2020 ; Lorenci Woiciechowski et al., 2020**).

Les mannanes font partie des hémicelluloses avec le xyloglucane et le xylane.

Ce dernier, est le composant principal de l'hémicellulose, c'est une chaîne d'unités de xylose liées par des liaisons 1,4- β -D-xylopyranose. Le Xyloglucane composé principalement de glucose, xylose et arabinose dans les proportions 3:4:1 respectivement liés avec β -(1,4) D-glucopyranose. Le mannane un polysaccharide formé d'unités de mannose liées les unes avec les autres par des liaisons β -(1,4). On distingue différents types : Le glucomannane (mannose et glucose liés par des liaisons β -(1,4) avec un ratio de 1:3), galactomannane (liaison entre la chaîne de mannose et une unité de galactose via le pont α -1,6) (Okolie et al., 2021).

✓ Lignine

La lignine est un polymère complexe tridimensionnel de différentes unités de propane phénoliques qui sont liés ensemble par des liaisons éther et des liaisons carbone-carbone. Trois alcools propioniques phénoliques existent comme monomères de lignine (Figure 4) : alcool p-coumaryl, coniferyl et sinapyl (Fatma et al., 2018; Abraham et al., 2020; Lorenci Woiciechowski et al., 2020). En raison de sa configuration moléculaire, la lignine est extrêmement résistante à la dégradation chimique et enzymatique (Palmqvist et al., 1999 ; Okolie et al., 2021).

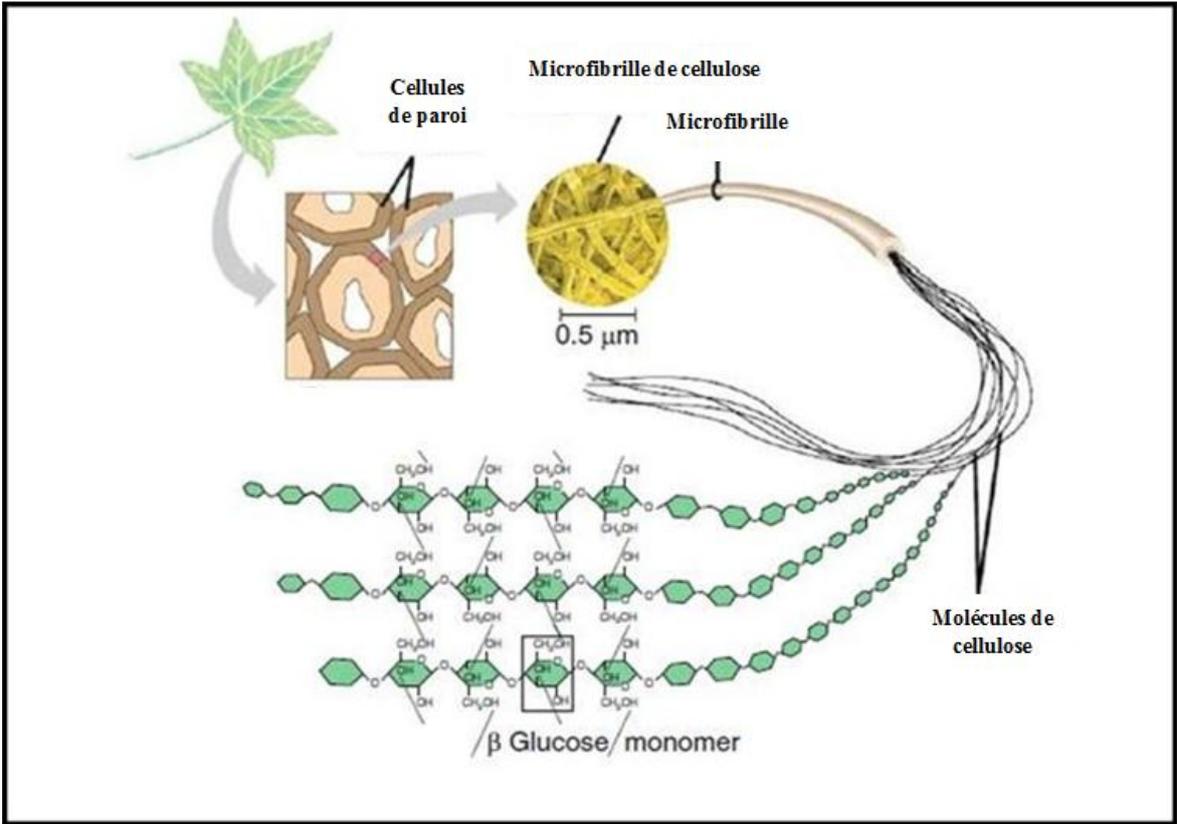


Figure 2 : Structure de la cellulose (Al-Jawhari , 2020).

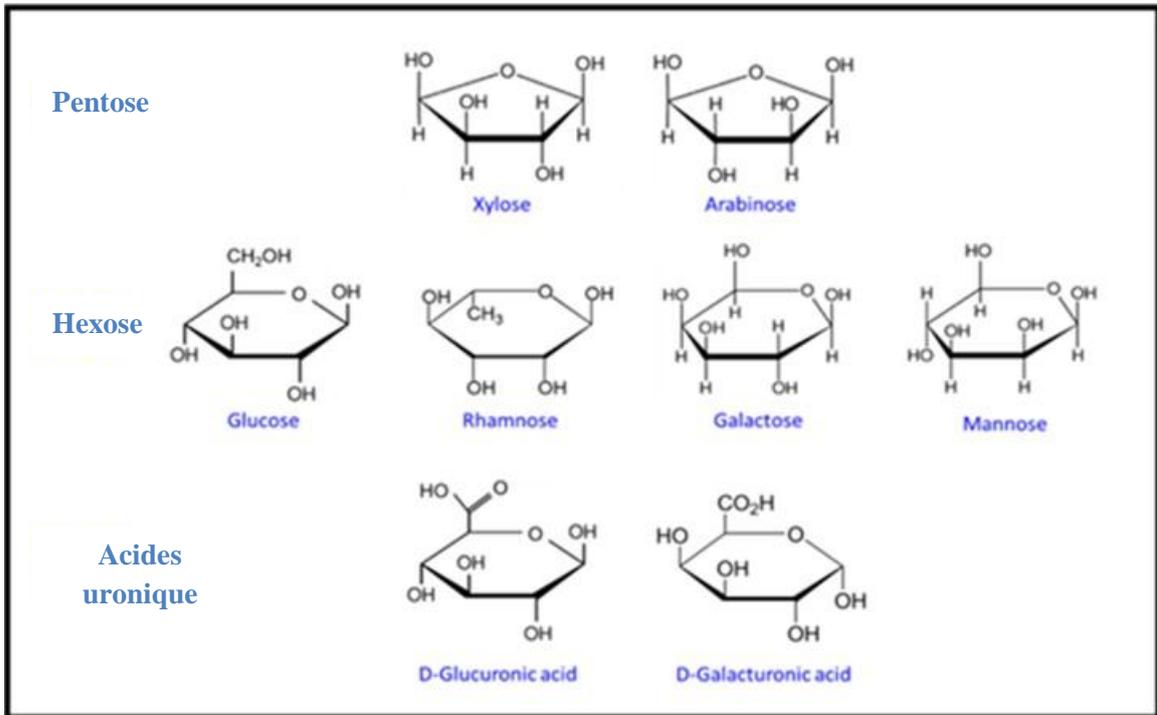


Figure 3: Monomères formant l'hémicellulose (Okolie et al., 2021).

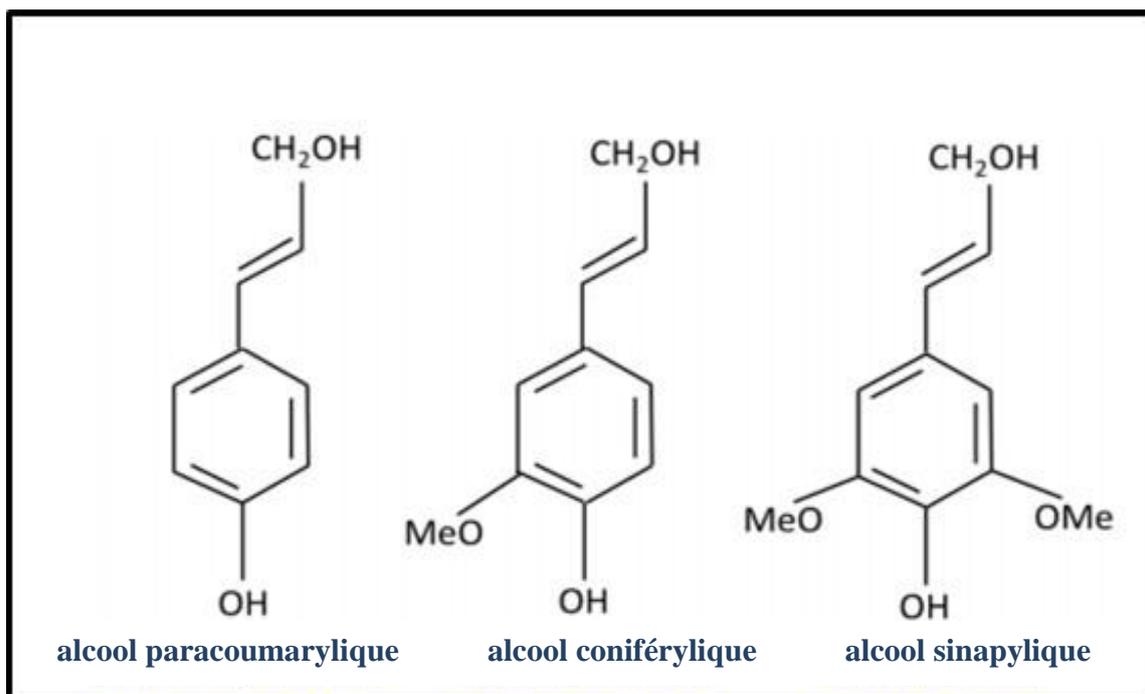


Figure 4 : Monomères formant la lignine (Okolie et *al.*, 2021).

1.4. Prétraitement de la BLC

Le procédé de prétraitement est une étape cruciale dans la bioconversion de lignocellulose. En général, la valorisation de la BLC se fait en trois étapes: d'abord le prétraitement qui vise à séparer et rendre accessible les constituants intimement liés et cristallisés, puis l'hydrolyse de l'hémicellulose et de la cellulose en sucres simples et enfin, la fermentation du sucre pour la production de métabolites. Si l'hémicellulose est facilement hydrolysable, parfois dès le prétraitement, l'hydrolyse de la cellulose en glucose est une opération difficile, qui doit être catalysée soit par un acide, soit par des enzymes.

Il existe plusieurs procédés de prétraitement (**Tableau 2**). Le choix dépend en grande partie du substrat et du procédé d'hydrolyse choisi. Chaque prétraitement a son propre effet sur les composants lignocellulosiques (**Hendriks et Zeeman, 2009 ; Brodeur et al., 2011**).

Ces prétraitements peuvent être physiques, chimiques, physico-chimiques, biologiques (**Figure 5**), ou une combinaison de ces processus (en couplant deux types de prétraitements ou plus) qui reste un choix d'excellence pour optimiser le rendement en sucres fermentescibles (**Hassan et al., 2018**). Le **Tableau 2** résume le principe de chaque prétraitement, ses avantages et ses inconvénients.

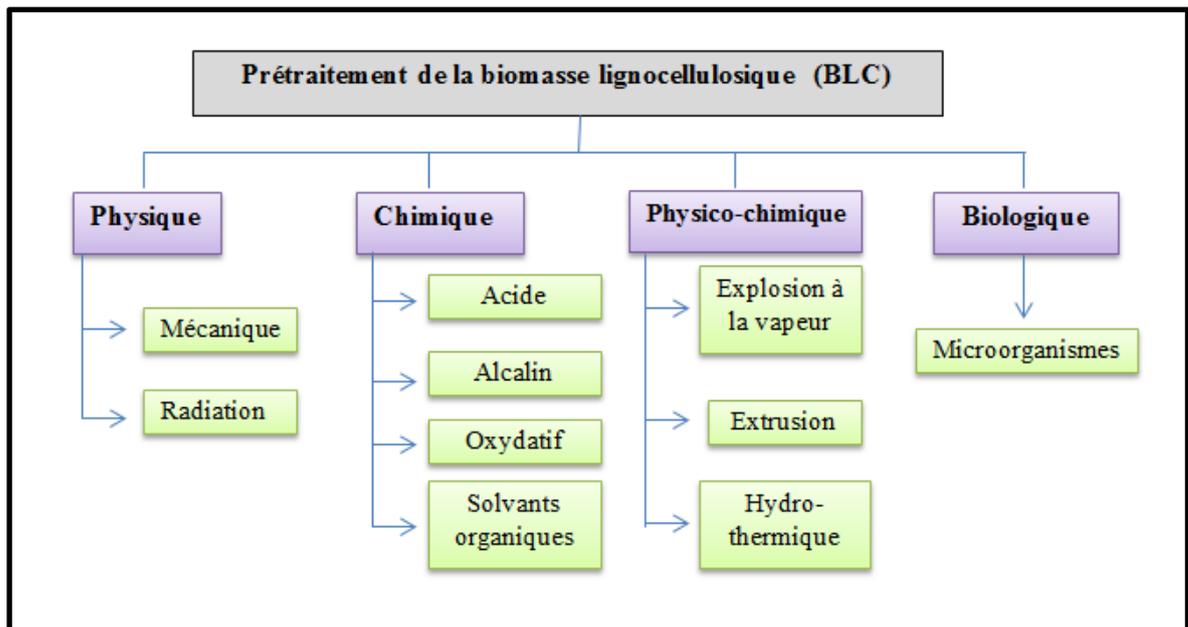


Figure 5 : Prétraitements de la BLC (Abraham *et al.*, 2020).

a) Prétraitement physique

L'effet du prétraitement physique doit réduire le matériel lignocellulosique en particules fines qui sont plus sensibles à l'hydrolyse acide ou enzymatique, donc réduire le degré de cristallinité de la cellulose (Champagne et Li 2009), sans l'addition des produits chimiques ou la production des résidus nocifs. Le broyage mécanique, irradiation, ultrasonication, et les micro-ondes sont parmi les méthodes physiques du prétraitement. Les besoins énergétiques pour ces prétraitements dépendent de la taille des particules et de la réduction finale de la cristallinité du matériel lignocellulosique (Jönsson et Martín, 2016 ; Abraham *et al.*, 2020).

b) Prétraitement chimique

Le prétraitement chimique inclut l'addition des agents chimiques (ozone, acides, bases, peroxyde d'hydrogène et solvants organiques) qui permettent de modifier la structure de BLC. Dans certains cas, des prétraitements chimiques sont combinés avec des prétraitements physiques tels que l'explosion à la vapeur (Shafiei *et al.*, 2015).

Le principe de prétraitement acide est de rompre les liaisons Van der Waals, les liaisons hydrogène et covalente (Abraham *et al.*, 2020). Plusieurs types d'acides, concentrés ou dilués, peuvent être utilisés pour l'hydrolyse de la BLC.

Les acides les plus utilisés sont l'acide phosphorique (H_3PO_4) et l'acide sulfurique (H_2SO_4) par rapport à leur efficacité et leur coût. En revanche l'acide chloridrique (HCl) est plus volatile et plus efficace mais plus onéreux comme agent d'hydrolyse, de même pour l'acide nitrique (HNO_3) (**Bensah et Mensah, 2013 ; Jönsson et Martín, 2016 ; Abraham et al., 2020 ; Lorenci Woiciechowski et al., 2020**).

Les conditions réactionnelles de l'hydrolyse à l'acide dilué sont entre 0,2 et 2,5% d'acide à des températures élevées (121-210°C). Ce traitement permet de solubiliser l'hémicellulose mais pas la cellulose et la lignine.

La concentration en acide utilisé dans les processus d'hydrolyse acide concentré est dans la gamme de 65-86% (p/v) pour l'acide sulfurique, 41% pour l'acide sulfurique et 85% (p/p) pour l'acide phosphorique. Le processus se produit à des basses températures, produisant des rendements élevés d'hydrolyse de la cellulose. En effet, les acides concentrés sont toxiques, corrosifs, nécessitent des réacteurs résistants à la corrosion (**Verardi, 2012; Bensah et Mensah, 2013**).

Une méthode très utilisée dans la délignification qui permet d'augmenter les pores et la réduction de degré de polymérisation. Il s'agit de l'application d'agents alcalins tels que l'hydroxyde de sodium (NaOH) et l'ammoniaque (**Bensah et Mensah, 2013 ; Abraham et al., 2020**).

c) Prétraitement physico-chimique

Son principe est de rompre les polymères d'hémicellulose et la lignine. Durant ce traitement les liaisons d'hydrogène entre les complexes sont rompues. En outre, cette étape augmente la surface pour une activité enzymatique ou microbienne efficace (**Hassan et al., 2018 ; Abraham et al., 2020**).

d) Prétraitement biologique

C'est un prétraitement écologique qui implique l'utilisation directe d'un ou plusieurs micro-organisme (s) (Mycètes ou bactéries) ou l'un des produits de métabolisme comme la cellulase. Ceci a pour avantage d'économiser l'énergie, et de minimiser l'émission de produits toxiques. Mais, l'inconvénient majeur est le temps d'incubation et la perte des glucides nécessaire lors de prétraitement de la biomasse lignocellulosique (**Maurya et al., 2015; Abraham et al., 2020 ; Zanellati et al., 2021**).

L'hydrolyse enzymatique est la méthode la plus prometteuse pour obtenir des rendements élevés en sucres fermentescibles à partir de la BLC (**Romo-Buchelly et al., 2019**). Son efficacité dépend de l'activité de l'enzyme et de sa concentration, de sa spécificité pour les substrats, de sa résistance à divers inhibiteurs et de sa stabilité dans diverses conditions de température de pH et de temps d'incubation (**Kiran et al., 2015; Thomas et al., 2016; Abraham et al., 2020**). Deux catégories d'enzymes convertissent la cellulose et l'hémicellulose en sucres simples :

- la Cellulase dont l'endoglucanase (dégrade la liaison intramoléculaire β -1,4-glucosidique de la cellulose), la cellobiohydrolase (dégrade l'extrémité terminale de cellulose donnant un cellobiose ou glucose soluble), la β -glucosidase (ou cellubiose qui dégrade le cellubiose en 2 glucoses) les trois réagissent individuellement mais avec des limites ou en synergie pour une meilleur dégradation.
- l'hémicellulase responsable de la dégradation des hémicelluloses, telles que les xylanes, les xyloglucanes, les arabinoxylanes et les glucomannanes (**Kumar et al., 2008 ; Abdel-Rahman et al., 2011 ; Romo- Buchelly et al., 2019**).

Tableau 2 : Les différents prétraitements (description, avantages et inconvénients)

Pré-traitements	Approches	Description	Avantages	Inconvénients	Références
Physique	Mécanique	Broyage et fraisage	Réduction de la cristallinité de la cellulose et augmentation de la surface et les pores des particules	Forte demande d'énergie	Abraham <i>et al.</i> , 2020 Fatma <i>et al.</i> , 2018
	Radiations	Implique les rayons gamma, les UV, les faisceaux électroniques, le champ électrique pulsé, et les microondes	Diminution de degré de polymérisation et de la cristallinité de la cellulose, hydrolyse des hémicelluloses et la dépolymérisation partielle de la lignine	Consomme de l'énergie, nocif pour l'environnement	Abraham <i>et al.</i> , 2020 Fatma <i>et al.</i> , 2018
Chimique	Acide	Utilisation des acides concentrés et dilués.	Hydrolyse l'hémicellulose, Rendement en sucres élevé.	Production des inhibiteurs, corrosion de l'équipement et le coût élevé des acides.	Abraham <i>et al.</i> , 2020 Fatma <i>et al.</i> , 2018 Bordeur <i>et al.</i> , 2011 Lorenci Woiciechowski <i>et al.</i> , 2020
	Alcalin	Délicignification par des bases : NaOH, NH ₃ , etc.	Hydrolyse de la lignine, et altérer la structure de la cellulose.	Production des inhibiteurs et le coût élevé des bases.	Abraham <i>et al.</i> , 2020 Fatma <i>et al.</i> , 2018 Bordeur <i>et al.</i> , 2011 Jönsson et Martín, 2016
	Oxydatif	Le peroxyde d'eau est convertis aux radicaux hydroxyles (OH).	Elimine la lignine et l'hémicellulose.	Formation des inhibiteurs.	Abraham <i>et al.</i> , 2020 Jönsson et Martín, 2016
	Solvants organiques	Utilise des solvants organiques (éthanol,...) pour séparer la cellulose de la BLC. Les liquides ioniques (IL) ont la capacité de dissoudre la cellulose	Render la BLC soluble	Coûts élevés des solvants, récupération et recyclage des solvants	Abraham <i>et al.</i> , 2020 Jönsson et Martín, 2016 Bordeur <i>et al.</i> , 2011

Tableau 2 : Les différents prétraitements (description, avantages et inconvénients) (Suite)

Pré-traitements	Approches	Description	Avantages	Inconvénients	Références
Physico-chimique	Prétraitement hydro-thermique	Le prétraitement à l'eau chaude liquide utilise l'eau à haute température (170–230°C) et haute pression	Améliore la digestibilité enzymatique, ne nécessite aucun catalyseur et ne cause pas des grands problèmes de corrosion.	Formation des inhibiteurs, une grande énergie, utilisation haute de l'eau.	Abraham et al., 2020 Baruah et al., 2018 Jönsson et Martín, 2016
	Explosion à la vapeur	Utilise de la vapeur à haute pression (5-50 bar) à 160-250 °C pendant des intervalles variables pour modifier la structure de la BLC	Hydrolyse l'hémicellulose et de la lignine, une destruction de la cristallinité de cellulose, utilisation limitée de produits chimiques	Formation des inhibiteurs, délignification partielle de complexe lignine-cellulose	Abraham et al., 2020 Baruah et al., 2018 Fatma et al., 2018
	Prétraitement d'extrusion	La BLC subit divers traitements tels que le chauffage, le mélange et la chute de pression qui provoque la libération d'eau intracellulaire de la matière première, provoquant une dégradation structurelle. Cela peut faciliter la digestion enzymatique de la BLC.	Récupération significative des sucres et bonne adaptation aux divers changements de processus	Formation des inhibiteurs	Abraham et al., 2020 Zheng et al., 2014 Zheng et Rehmann, 2014
Biologique	Microorganismes	Des bactéries ou des champignons dégradant la lignine sont utilisés sous forme de cellules entières ou d'enzymes pour prétraiter la BLC. Les champignons sont idéaux en raison de leur capacité à décomposer la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.	Altération de la cellulose et l'hydrolyse de la lignine et l'hémicellulose, pas de formation d'inhibiteur pendant le processus, une faible consommation d'énergie et un respect de l'environnement	Nécessite des grandes surfaces stériles, demande une source de carbone et processus très lent	Abraham et al., 2020 Baruah et al., 2018 Fatma et al., 2018

1.5. Méthodes de détoxification

Suite aux conditions sévères des prétraitements, des molécules indésirables sont élaborées (**Jönsson et Martín, 2016; Kumar et al., 2020**). Dans les conditions acides, les liaisons inter, intra et les ponts hydrogènes de la cellulose sont interrompus pour libérer un ose (C6) qui après déshydratation donne le 5-hydroxymethyl furfural (5-HMF). Ce dernier est composé d'un cycle de furane porteur d'une fonction aldéhyde et d'une fonction alcool. Le furfural est obtenu à partir de la déshydratation des pentoses tel que le xylose, essentiellement présent sous forme de xylane dans les hémicelluloses.

Le 5-HMF et le furfural sont des substances toxiques qui inhibent la croissance des microorganismes (**Jönsson et Martín, 2016 ; Kumar et al., 2020**). En plus, les conditions fortes d'acide peuvent provoquer une corrosion du matériel et la libération des métaux lourds qui peuvent également inhiber la culture (**Jönsson et Martín, 2016 ; Basak et al., 2020**). Une phase ultérieure de détoxification est indispensable pour améliorer les conditions de fermentation (**Basak et al., 2020 ; Kumar et al., 2020**).

En outre, La dégradation limitée des composants de lignine : p-hydroxyphenyle, guaiacyle et syringyle donnent naissance à l'acide 4-hydroxybenzoïque, vanilline et syringaldéhyde respectivement (**Basak et al., 2020**). Selon **Kumar et al. (2020)**, les composés phénoliques sont les molécules les plus toxiques suivies par les furannes et les acides carboxyliques.

A côté de l'hydrolyse acide, les conditions d'eau chaude avec un pH acide favorisent la production des acides acétiques et des acides uroniques. Ces molécules indésirables peuvent inhiber la croissance des microorganismes ou bien freiner l'activité enzymatique de la cellulase (**Jönsson et Martín, 2016**).

Plusieurs scientifiques suggèrent des technique de détoxification afin de remédier au problème des inhibiteurs (**Heer et Sauer, 2008; Jönsson et Martín, 2016**). Le **Tableau 3** résume ces différentes techniques avec leurs principes et effets.

Tableau 3 : Différentes techniques de détoxification (Kumar et al., 2020).

Méthodes	Technique	Procédure	Effet
Physique	Adsorption	Charbon actif, zéolite, bentonite, diatomite	Éliminer les contenus phénolique
	Filtration par membrane	Microfiltration, Ultrafiltration et Nanofiltration	Séparation basée sur le poids moléculaire
	Résines échangeuses d'ions	Fixer des ions sur des groupements spécifiques greffés sur une résine afin d'éliminer les inhibiteurs par adsorption. Différents types de résines existent, anionique OH ⁻ , cationique H ⁺ ou encore à groupements non chargé	Elimination des teneurs en sel, acide et phénol
	Séparation à lit mobile	Est une chromatographie continue sophistiquée, largement utilisée pour les séparations	Amélioration de la productivité et de la pureté
Chimique	Neutralisation	NaOH, CaCO ₃ , Ba(OH) ₂ , CaOH ₂ , Mg(OH) ₂ , KOH, CaSO ₄	Précipitation des composés phénoliques et des inhibiteurs de grand poids moléculaire
	Extraction liquide- liquide	Acétate d'éthyle, extraction par fluide supercritique, trialkylamine, 1-butanol, acétate d'isobutyle et méthyl-isobutyl- cétone	Élimination des acides organiques et des composés phénoliques
	Extraction des sucres - Extraction relargage	Acétonitrile, Isopropanol, eau.	Séparation de phases pour le sucre.
Biologique	Pile à combustible microbienne (MFC)	Cellules électrochimiques microbiennes	Réduction du niveau de furfural, 5-HMF, acide vanillique, 4-hydroxybenzaldéhyde et 4-hydroxyacétophénone
	Traitement microbien	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) recombinante, billes hybrides immobilisées.	Utilisation de l'hydrolysate comme substrat sans détoxification. Saccharification enzymatique
	Traitement enzymatique	Enzymes laccases	Élimination des composés phénolique

2. Bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques réunit plusieurs genres des bactéries hétérogènes caractérisés par leur capacité à fermenter les sucres en produisant de l'acide lactique. La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés aussi présents : l'acide acétique, éthanol et CO₂ (Tailliez, 2004 ; Sauer *et al.*, 2008 ; Papagianni, 2012).

Les bactéries lactique sont en général aérotolérantes (Litchfield, 2009 ; Khalid, 2011). Cependant certaines espèces sont anaérobies strictes (Taskila et Ojamo, 2013). Plusieurs de ces bactéries sont qualifiées comme GRAS (Generally Recognized As Safe) par l'U.S. Food and Drug Administration. Ce sont des bactéries à GRAM positifs, non sporulées, micro-aérophiles, à faible teneur en GC %, immobiles, acidotolérantes, catalase (-), chimiotrophes, se développent généralement dans des conditions anaérobies.

Les bactéries lactiques représentent un groupe de bactéries omniprésentes qui sont largement répandues dans la nature dans les aliments fermentés (produits laitiers, produits carnés et des légumes), dans le tractus gastro-intestinal (microbiote) et la flore vaginale des animaux et l'homme, ainsi que dans le sol et l'eau. L'écologie des bactéries lactiques a changé au fil du temps, passant des habitats du sol et des plantes à l'intestin des mammifères (Brooijmans *et al.*, 2009 ; Hooper et Macpherson, 2010 ; Liu *et al.*, 2014 ; Mozzi, 2016).

Les bactéries lactiques font partie du phylum des Firmicutes, la classe des Bacilli, l'ordre des Lactobacillales. Ces derniers sont répartis en six grandes familles renfermant sept genres. Le genre *Bifidobacterium* fait partie du phylum Actinobacteria (Figure 6). Orla-Jensen (1919) a proposé la systématique des bactéries lactiques selon plusieurs caractéristiques : Morphologie cellulaire, mode de fermentation, capacité à fermenter les sucres et température de croissance (Tableau 4). Et comme les méthodes phénotypiques présentent des limites en termes de capacité de précision, l'emploi d'approches moléculaires telles que : l'analyse de la séquence du gène codant l'ARNr 16S est nécessaire pour l'identification des souches bactériennes (Mozzi, 2016 ; Mora-Villalobos *et al.*, 2020).

Tableau 4: Classification des bactéries lactiques selon Orla Jensen (1919) (Moizzi, 2016).

Morphologie	Coques	<i>Streptocoques, Lactococcus</i>
	Bacilles	<i>Thermobacterium, Streptobacterium, Betabacterium</i>
Mode de fermentation	Homofermentaire	<i>Lactococcus, Streptococcus, Pidiococcus, Entrococcus</i> et quelques souches de <i>Lactobacillus</i> .
	Hétérofermentaire	<i>Leuconostoc, Oenococcus</i> et <i>Lactobacillus</i> .
	Homo-Hétéro	<i>Leuconostoc, Oenococcus</i> et <i>Weissella</i> et certaines souches de <i>Lactobacillus</i> .

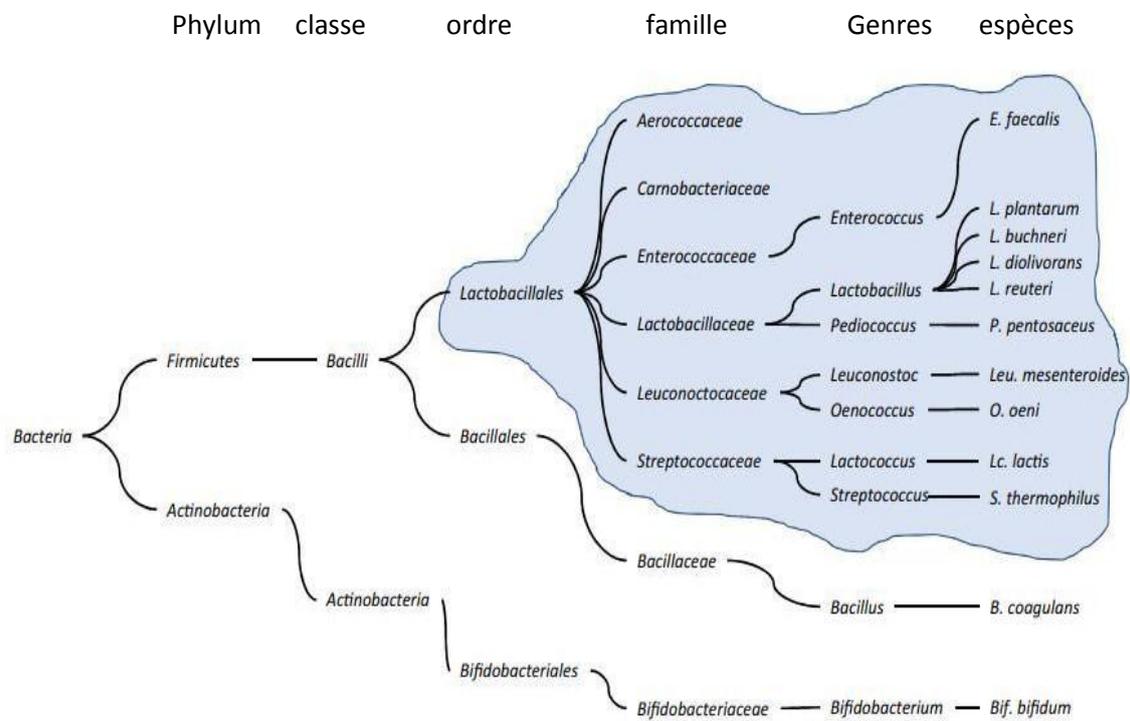


Figure 6 : Phylogénie des bactéries lactiques (Sauer et al., 2017).

2.1. Lactobacilles

Les Lactobacilles représentent le plus grand genre du groupe des bactéries lactiques avec plus de 261 espèces (Mars 2020) extrêmement diversifiées aux niveaux phénotypique, écologique et génotypique (Zheng et al., 2020). Le genre *Lactobacillus* a été proposé par Beijerinck en 1901 et comprend des micro-organismes à Gram positif, microaérophiles, acido-tolérants, asporulés, immobiles. Peuvent apparaître sous forme de bâtonnets longs et fins ou très courts, courbés ou ovoïdes (Tailliez, 2004 ; John et al., 2007; Brooijmans, 2009). Le genre est classé dans le phylum des Firmicutes, classe de Bacilli, ordre des Lactobacillales, famille du Lactobacillaceae, qui contient les genres *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*. Les espèces de *Lactobacillus* peuvent être divisées en trois groupes :

Groupe I : homofermentaire obligatoire tel que : *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*.

Groupe II : hétérofermentaire facultative comprenant : *Lactobacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus sakei*.

Groupe III : hétérofermentaire obligatoire : *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus bucheri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*.

Les relations phylogénétiques des lactobacilles ont été étudiées en séquençant l'ARNr 16S de toutes les espèces décrites précédemment, ce qui nous a permis d'attribuer les lactobacilles aux groupes suivants : groupe (bu) : *Lactobacillus bucheri*, groupe (ca) : *Lactobacillus casei*, groupe (de) : *Lactobacillus delbrueckii*, groupe (pl) : *Lactobacillus plantarum*, groupe (re) : *Lactobacillus reuteri*, groupe (sa) : *Lactobacillus sakei* et groupe (sl) *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus perorens* (Calasso et Gobbetti, 2011 ; Zheng et al., 2020).

2.2. Lactocoques

Le genre *Lactococcus* comprend un groupe de micro-organismes connus sous le nom de *Streptocoques lactiques*, a été proposé en 1985 par Schleifer et al. pour reclasser les anciennes espèces des *Streptococcus* appartenant au groupe sérologique N de Lancefield. Cette reclassification était basée sur l'hybridation des acides nucléiques et les relations immunologiques de la superoxyde dismutase.

Elle a conduit à la proposition de cinq espèces à l'intérieur du genre *Lactococcus*: *Lactococcus plantarum* (*Lc. plantarum*), *Lc. garviae*, *Lc. piscium*, *Lc. raffinolactis* et *Lc. lactis*. Ce dernier comprend trois sous-espèces, *Lc. lactis*, *Lc. cremoris* et *Lc. hordniae*. (Schleifer et al., 1985; Demarigny 2014). Les lactocoques sont des organismes mésophiles dont la température de croissance optimale est de 25 à 30°C. Leur temps de génération maximal est de 60 à 70 min dans le lait ou de 35 à 40 min dans un milieu synthétique. La croissance est inhibée à pH 4,5 ou moins; par conséquent, les densités cellulaires les plus élevées peuvent être obtenues dans un milieu tampon (M17) (Courtney, 2000 ; Issa et Tahergorabi, 2019). *Lc. lactis* a été largement en industrie laitière pour fabriquer des fromages à pâte molle, des fromages de type cheddar et de nombreux laits fermentés (Demarigny, 2014).

2.3. Besoins nutritionnels des bactéries lactiques

D'après Les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont très exigeantes au point de vue nutritionnel. Elles requièrent, pour leur croissance non seulement des substrats carbonés et azotés, mais aussi des facteurs de croissance tels que les vitamines et les oligoéléments. En général elles sont incapables d'effectuer la synthèse d'acides aminés à partir d'une source d'azote plus simple, et doivent faire appel à des sources exogènes (extrait de levure, extrait de viande, peptone etc..) pour assurer le métabolisme (Mozzi, 2016). En outre, elles ont besoin aussi des acides nucléiques, esters et une petite quantité d'acide gras comme les polysorbates (une classe d'émulsifiant) tel que le tween 80 et 85 qui contiennent de l'acide oléique qui améliore la croissance. Cet acide a pour rôle d'augmenter la fluidité des membranes des bactéries lactiques et les protéger contre les conditions abiotiques (pH, T°C, O₂). Les minéraux aussi jouent un rôle appréciable dans l'activité enzymatique et sur la croissance bactérienne. Les ions métalliques permettent d'assurer plusieurs fonctionnalités :

- Activateur de co-facteurs d'une variété d'enzyme ;
- Le transport membranaire.

Les besoins vitaminiques des bactéries lactiques sont plus complexes. Toutes les espèces ont un besoin absolu en :

- Vitamines essentielles : pantothénique, riboflavine et l'acide nicotinique ;
- Vitamines stimulatrices : biotine (**Saeed et Salam 2013**).

2.4. Métabolismes des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques étant incapables d'obtenir leur énergie par la respiration, elles nécessitent une source de carbone fermentescible pour la croissance et la production d'énergie cellulaire (ATP). Elles possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques.

2.4. 1. Métabolisme des glucides

Les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces, homofermentaires ou hétérofermentaires selon la nature, et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation des sucres.

Dans la voie homofermentaire, une molécule d'hexose est métabolisée en deux molécules d'acide lactique et deux molécules d'ATP. Les bactéries lactiques homofermentaires convertissent en excès quantitativement le glucose en acide lactique (>90%).

La voie homofermentaire, qui emprunte la voie Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) ou la glycolyse, est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* (**Figure 7**).

Cette voie réduit une mole d'hexose en 2 moles de trioses-3-phosphates, converties en 2 moles de pyruvate en produisant 2 moles d'ATP. L'acide lactique provient de la réduction de l'acide pyruvique catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH).

La plupart des bactéries lactiques homofermentaires y compris *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus lactis* sont incapables de convertir le xylose en acide lactique (**Fukushima et al., 2004; Kosugi et al., 2010 ; Abdel-Rahmane et al., 2011 ; Moon et al., 2012 ; Zhang et Vadlani, 2013**).

La voie hétérofermentaire conduit à la production d'un acide lactique, d'un éthanol, d'un CO₂ et d'une ATP par mole de glucose. Cette voie utilise la voie des pentoses phosphate pour produire de xylose-5- phosphate, qui est clivé en glycéraldéhyde-3- phosphate (GAP) et en acétyl phosphate (L'acétyl-P). Le GAP est convertit en acide lactique et L'acétyl-P en acétate ou éthanol (**Figure 7**).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires ne possèdent ni un système de PTS, ni la fructose- 1,6- bisphosphate aldolase ni la triose phosphate isomérase (**Garde et al., 2002; Abdel-Rahmane et al., 2011; Gänzle, 2015; Romo-Buchelly et al., 2019**).

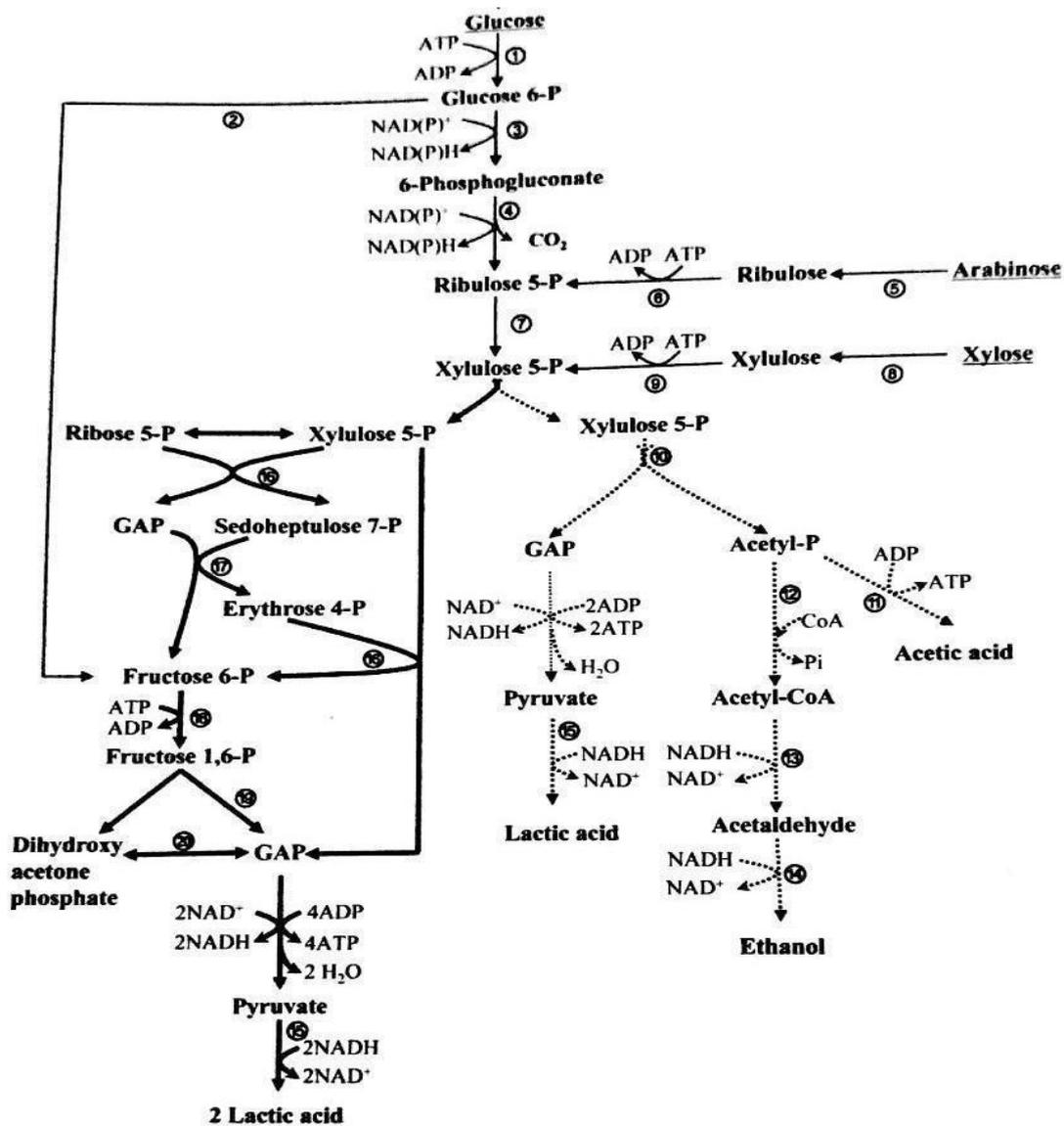


Figure 7 : Voie de production d'acide lactique à partir de glucose par les bactéries lactiques (Abdel-Rahmane et al., 2011). Enzymes : (1) Hexokinase. (2) glucose-6 phosphate isomérase (3) glucose-6-phosphate déshydrogénase ; (4) 6-phosphogluconate déshydrogène; (5) arabinose isomérase ; (6) ribrokinase ; (7) ribulose-5- phosphate (8) xylose isomérase, (9) xylulokinase, (10) phosphocétolase, (11) acétate kinase, (12) phosphotransacétylase, (13) aldéhyde déshydrogénase, (14) Alcool déshydrogénase (15) lactate déshydrogénase (16) transcétolase (17) transaldolase (18) 6 phosphofructokinase (19) fructose diphosphate aldolase; (20) triosephosphate Isomérase. Les lignes en gras : la voie homofermentaire Les lignes pointées : la voie PK.

2.5. Utilisation des bactéries lactiques

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus les bactéries lactiques ont une grande diversité métabolique et elles sont capables d'améliorer la qualité organoleptique et nutritionnelle des aliments. Les bactéries lactiques sont impliquées dans plusieurs domaines:

- Préservation et production des aliments fermentés ;
- Probiotiques;
- Médicaments thérapeutiques ;
- Catalyseurs biologiques ;
- Vaccins d'ADN (**Hatti-Kaul et al., 2018**).

3. Acide lactique

L'acide lactique (AL) ou l'acide 2-hydroxy-propanoïque ($\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$) est l'un des acides organiques les plus importants. C'est un produit naturel non toxique, odorant, soluble dans l'eau, incolore et très peu volatil. Il est classé comme GRAS (Generally Recognized As Safe) donc utilisé comme un additif alimentaire par la FDA (Food and Drug Administration). L'acide lactique est synthétisé soit par voie chimique soit par voie microbienne, il se présente sous deux formes optiquement actives L(+) et D(-) (**Narayanan et al., 2004 ; Abdel- Rahman et al., 2013 ; Romo-Buchelly et al., 2019**).

3.1. Production d'acide lactique

Poussé par sa forte demande, le marché mondial d'acide lactique est en nette progression. La production globale d'AL est approximativement 270.000 tonnes/an. Son taux de croissance annuel est de 10% et sa demande annuelle est estimée à 9,8 milliards de dollars d'ici 2025. (**Alexandri et al., 2019 ; Manandhar et Shah, 2020**).

La production d'acide lactique par voie chimique présente l'intérêt d'utiliser des coproduit de l'industrie chimique, mais surtout de produire de l'acide lactique thermostable d'une haute pureté et incolore. La synthèse chimique est une cascade de plusieurs étapes clés (**Figure 9**).

Au préalable, le lactonitrile est produit suite à une réaction entre l'acétylaldéhyde et le cyanure d'hydrogène en phase liquide et sous pression atmosphérique. Ensuite, le lactonitrile est récupéré, purifié et par la suite hydrolysé avec un acide (H_2SO_4 ou HCl) pour donner un sel d'ammonium et l'acide lactique (Narayanan et al., 2004 ; Martinez et al., 2013).

La synthèse chimique donne naissance à un mélange racémique (DL) d'acide lactique (Alexendri et al., 2019).

Contrairement à la synthèse chimique, la voie microbienne donne des isomères purs utilisables (Figure 8). Les micro-organismes généralement utilisés pour la production d'acide lactique sont très variables, mais ce sont les lactobacilles qui sont les plus fréquemment utilisés. Ils se développent à haute température et à faible pH ce qui limite les contaminations.

D'autres microorganismes sont utilisés comme les champignons filamenteux du genre *Rhizopus* (*R. oryzae* et *R. arrhizus*) qui ont l'avantage: d'avoir une capacité de dégrader l'amidon, d'être moins exigeants par rapport aux bactéries lactiques, leur séparation facile des milieux de fermentation et leur capacité d'assimiler des substrats complexes tels que diverses biomasses lignocellulosiques. Les levures sont également capables de produire d'acide lactique comme le genre *Candida*, *Kluyveromyces sp.*, *Pichia sp.* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les autres espèces productrices d'AL sont les algues et les cyanobactéries. Ces dernières sont des bactéries photosynthétiques qui ont la capacité de se développer sur des milieux minimum (Abedi et Hashemi, 2020).

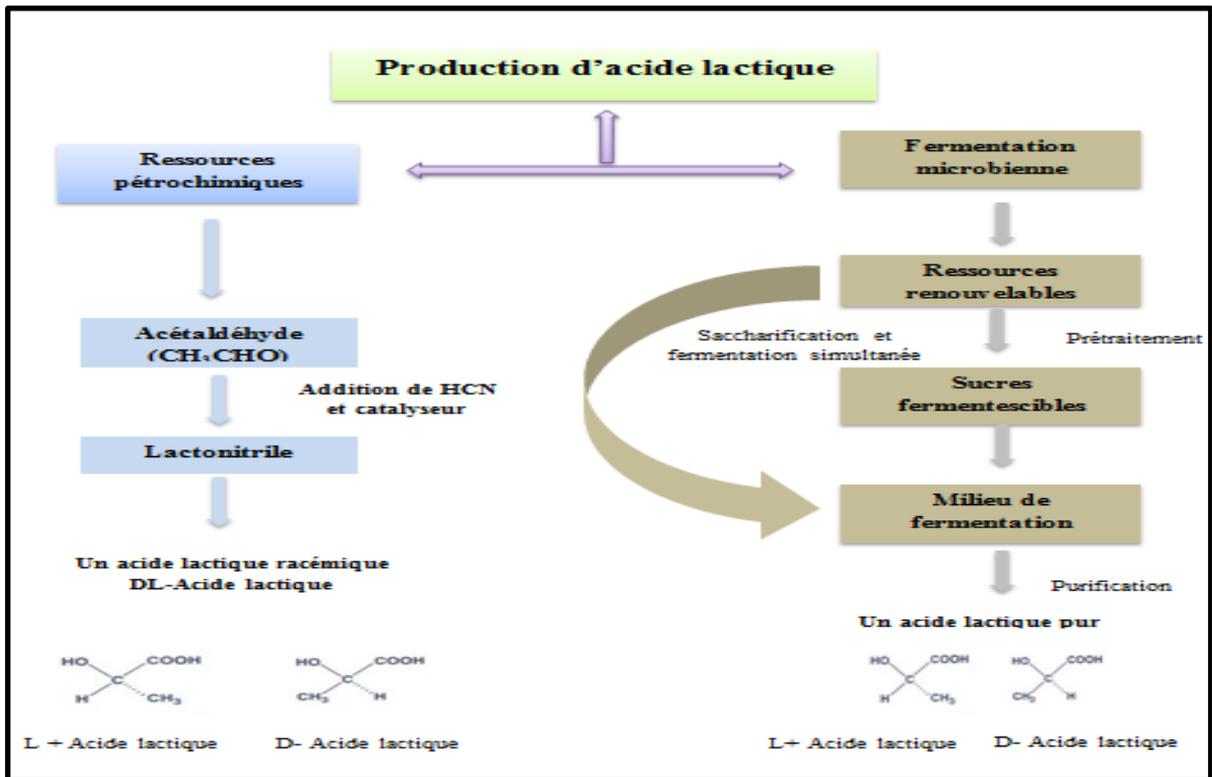


Figure 8 : Voies de synthèse d'Acide lactique (Ahmad *et al.*, 2020).

3.1.1. Production d'acide lactique à partir de la BLC

Les enjeux économique et environnementaux sont devenus des aspects déterminants pour l'avenir de la planète et une préoccupation primordiale des projets économiques (Abraham *et al.*, 2020).

Les matières amylacées et cellulosiques présentent un grand intérêt économique, ils sont abondants et sont moins onéreux. Plusieurs substrats amylacés ont été utilisés : sorgho (Diaz Gonzalez et Morawiki, 2022), le maïs (Manandhar et Shah, 2020), la pomme de terre (Smerilli *et al.*, 2015), le manioc (Sharma *et al.*, 2021). L'hydrolyse de l'amidon de ces substrats est facilitée par la production à l'échelle industrielle et à bon marché d'enzymes spécifiques telles que les amylases et les amyloglycosidases.

La BLC est une des principales ressources renouvelables les plus abondantes et les moins chères. Vu sa structure complexe, la BLC n'est pas accessible aux enzymes et doit subir des prétraitements afin d'améliorer la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose et éventuellement d'hydrolyser la fraction hémicellulosique en sucres monomères (Ahmad *et al.*, 2020).

Il existe plusieurs procédés de prétraitement de la BLC. Le choix dépend en grande partie du substrat et du procédé d'hydrolyse choisi. Si l'hémicellulose est facilement hydrolysable dès le prétraitement, l'hydrolyse de la cellulose en glucose est une opération difficile, qui doit être catalysée soit par un acide fort, soit par des enzymes. La production d'acide lactique à partir de la BLC a fait l'objet de très nombreux travaux visant à améliorer les performances des procédés de production. Diverses matières lignocellulosiques ont été utilisées et différents mode de conduite des cultures ont été appliqués (**Tableau 5**).

En culture mode batch appelé discontinu, le réacteur est considéré comme un système fermé contenant le milieu de culture inoculé avec des microorganismes. Ce mode de culture est caractérisé par une productivité faible, limitée par la concentration en substrat qui doit être adéquate afin d'éviter l'inhibition des capacités fermentaires du microorganisme (**Abdel-Rahman et al., 2013**).

Au contraire, le mode Fed-batch appelé semi continu est un batch alimenté qui réduit la phase de latence et fonctionne pour des longues périodes assurant une bonne productivité (**Abdel-Rahman et al., 2013**).

Le réacteur en mode continu est un système ouvert, dans lequel un état d'équilibre est maintenu par l'alimentation de milieu et le soutirage de façon continue. Le microorganisme reste dans un état physiologique constant.

Abdel-Rahman et al. (2019) ont étudié la production d'acide lactique à partir des déchets alimentaires par la souche *Enterococcus faecium* FW26. Les pelures de bananes additionnées de déchets alimentaires sans prétraitement ont été utilisées à un ratio de 1/1,5 w/w avec un pH contrôlé à 9 et une température de 50°C. La concentration finale d'acide lactique est de 33,3 g/L avec une productivité de 0,28 g/L/h et un rendement de 0,789 g/g.

Une des voies préconisée pour la production d'acide lactique est la voie biochimique qui consiste à convertir la BLC en acide lactique en utilisant deux étapes distinctes : l'hydrolyse et la fermentation réalisées séparément (Hydrolyse et fermentation séparée: HSF) ou dans le même réacteur (Saccharification et fermentation simultanée: SSF) (**Abdel-Rahman et al., 2011**).

- **Hydrolyse et fermentation séparée (SHF)** est le procédé le plus courant qui consiste à réaliser l'hydrolyse dans un premier temps, et la fermentation dans un deuxième temps. Ce dernier a l'avantage d'optimiser les conditions d'hydrolyse d'une part et les conditions de fermentation d'autre part. Il présente également des inconvénients, comme, l'inhibition rétroactive des enzymes (**Abdel-Rahman et al., 2013 ; Ahmad et al., 2020**).

- **Saccharification et fermentation simultanée (SSF)**, un procédé où l'hydrolyse enzymatique et la fermentation sont réalisées conjointement afin de diminuer l'inhibition des enzymes et réduire le coût d'investissement. Les sucres issus de la conversion enzymatique de la BLC sont fermentés rapidement après leur production ce qui permet de réduire le temps de conversion (**Abdel-Rahman et al., 2011 ; Ahmad et al., 2020**).

Tableau 5: Production d'acide lactique à partir de la biomasse cellulosique

Microorganismes	Substrat	Procédé de fermentation	AL (g/L)	Références
<i>Lb. casei</i>	Bois tendre	Batch	21,1-23,75	Iyer et al., 2000
<i>Lb. plantarum</i>	Fibres d'alfalfa	SSF	46,4	Sreenath et al., 2001
<i>Lb. delbreuckii</i>	Fibres d'alfalfa	SSF	35,4	Sreenath et al., 2001
<i>Lb. brevis</i> et <i>Lb. pentosus</i>	Hémicellulose de la paille	Batch	7,1	Garde et al., 2002
<i>Lb.coryniformis</i> ATTC 25600	Cellulose	SSF	54	Yáñez et al., 2003
<i>Lb. brevis</i> ATCC367 et <i>Lb.rhamnosus</i>	Hydrolysats de BLC		21	Patel et al., 2004
<i>E. mundtii</i> QU 25	Hydrolysats du bois	Batch	93	Wee et al., 2004
<i>Lb. casei</i> NCIMB 3254	Canne à sucre	Batch SSF	83, 8	John et al., 2006
<i>Lb.pentosus</i> CECT4023T	Maïs		33	Moldes et al., 2006
<i>Lb. casei</i> et <i>Lc.lactis</i>	Jus de dates	Batch	60,3	Nancib et al., 2009
<i>Lb. sp.</i> RKY2	Hydrolysats de BLC		42	Singhvi et al., 2010
<i>Lb.brevis</i>	Maïs	Batch	39,1	Guo et al., 2010
<i>E. mundtii</i> QU 25	Cellubiose	Batch	119	Abdel-Rahman et al., 2011
<i>E. mundtii</i> QU 25	Corn steep liquor	Continu	41	Abdel-Rahman et Sonomoto 2016
<i>Lc. lactis</i>	Bois de sciure	Batch	9.87	Nancib et al., 2017
<i>E.faecium</i> FW26	Pelures de bananes + les déchets cosmétiques (1:1,5% w/w)	Batch (Erlen)	33,3	Abdel-Rahman et al., 2019
<i>E. durans</i> BP130	Les déchets Alimentaires	Batch	28,8	Hassan et al., 2019
<i>Pediococcus acidilactici</i> PA204	Raffles de maïs	Fed- batch + SSF	92,01	Zhang et al., 2020
<i>E.faecium</i> WH51-1	L'eau de corn Steep	Batch	44,6	Selim et al., 2021
<i>Bacillus coagulans</i>	Déchets de dates	Batch	72,9	Gaber et al., 2021

3.2. Utilisation de l'acide lactique

L'acide lactique est un produit important industriellement en raison de ses propriétés multifonctionnelles intéressantes. Il est utilisé comme un agent conservateur dans l'industrie alimentaire. En effet, 70 à % à 85% d'acide lactique produit annuellement est destiné vers cette industrie (Martinez et al., 2013; Ahmad et al., 2020). Vue ses propriétés physiques et sa stabilité, l'acide lactique est considéré comme une molécule plateforme importante pouvant être utilisée directement ou en tant qu'intermédiaire dans la fabrication de produits industriels (Figure 9).

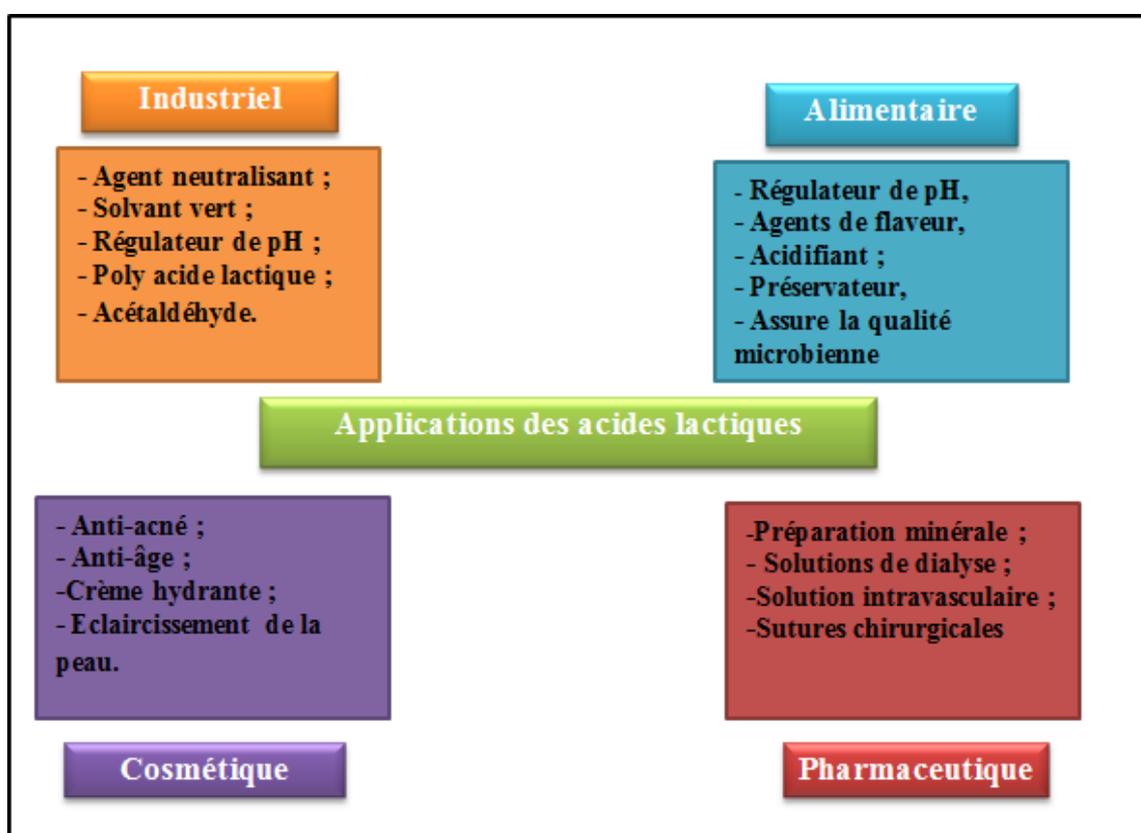


Figure 9 : Applications commerciales d'acide lactique (Ahmad et al., 2020).

L'acide lactique est un précurseur de l'acide poly lactique (APL). Synthétisé la première fois en 1932, par Carothers (**Farah et al., 2016**) ce bio polymère vert, biodégradable et biocompatible est utilisé dans la production d'emballage alimentaire à cause de ses caractéristiques semi cristalline, sa stabilité thermique et son effet non toxique. Ce type de plastique est un bon choix pour la substitution du plastique dérivé de la pétrochimie en raison de la faible émission des gaz à effet de serre. Il est également utilisé dans le domaine médicale et dans l'agriculture (**Abdel-Rahman et al., 2011 ; De Albuquerque et al., 2021**). Lors de la pandémie de 2020, le PLA est utilisé comme un composant de l'équipement de protection du personnel contre le SARS-CoV-2 (**De Albuquerque et al., 2021**).

L'APL issu du mélange racémique DL d'acide lactique (DLAPL) est moins stable que le L-poly acide lactique (LAPL) et le D-poly acide lactique (DAPL) pures (**Abdel-Rahman et al., 2011**). La stabilité de ces derniers est due à la présence des liaisons hydrogènes et des interactions Van de Waals (**Klotz et al., 2017 ; Alexandri et al., 2019**).

4. Plans d'expériences

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y ou appelé aussi réponse, et des variables, x_i (facteurs). La méthode des plans d'expériences est au moins trois à quatre fois plus efficace que les démarches conventionnelles. Elle permet une interprétation rapide et sans équivoque en fournissant un modèle expérimental précis du système étudié (**Leardi, 2009 ; Mäkelä, 2017**).

Les principaux avantages de cette méthode sont :

- Diminution du nombre d'essais
- Possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs
- Détection des interactions entre les facteurs
- Modélisation des réponses étudiées
- Précision optimale des résultats

La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées. Le **Tableau 6** présente quelques concepts de base pour une meilleure compréhension des plans d'expériences.

Tableau 6 : Concepts de base pour l'élaboration d'un plan d'expérience (Leardi, 2009).

Facteurs	Les variables à étudier qu'influencent l'expérience
Réponses	Ce sont les résultats mesurables suite au changement des variables
Domaine expérimental	Une interprétation géométrique pour une meilleure exploitation des résultats.
Matrice d'expérience	Regroupe les expériences sous forme codée et non codée
Effet de facteurs	Variance de la réponse dans l'intervalle des niveaux.
Interaction	L'effet d'un facteur par rapport aux autres facteurs
Modèle mathématique	La relation mathématique qui démontre la variation d'une réponse par rapport au changement d'un ou plusieurs facteurs.

Les plans de modélisation ont pour objectif de trouver la relation mathématique qui lie les réponses mesurées aux variables associées. Parmi les divers plans mis au point (**Figure 10**), les plus utilisés sont : les plans de box behnken et et les plans composites centrés (Czyrski et Jarzębski, 2020).

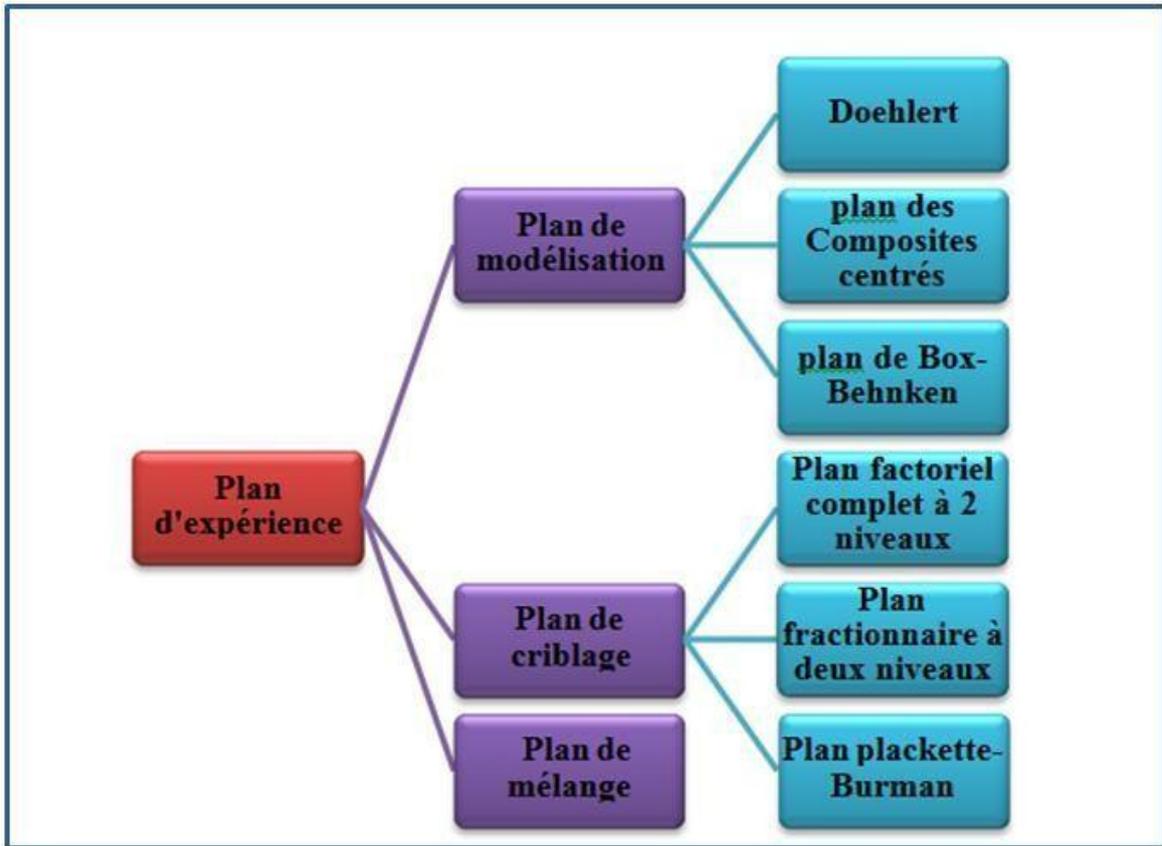


Figure 10 : Différents types des plans d'expériences.

4.1. Plan de Box-Behnken

Box et Behnken, (1960) ont développé des plans hautement fractionnés permettant d'obtenir le nombre maximum d'effets avec le minimum d'essais. Ces plans sont composés d'une matrice factorielle à 2 niveaux et de blocs incomplets équilibrés suivant un arrangement particulier. Ces matrices sont ensuite complétées d'un point au centre du domaine. Ces plans sont une alternative aux plans composites parce qu'ils requièrent seulement 3 niveaux pour chaque facteur et permettent aussi de modéliser une surface de réponse de degré 2. Ces plans ayant leurs points sur les axes factoriels du domaine, ne remplissent pas correctement l'espace. Ils ont toutefois l'avantage d'être économiques et donc particulièrement utiles lorsque les essais expérimentaux à réaliser sont coûteux. Ils demandent souvent moins d'essais que les composites. La figure présente un plan à trois facteurs. On constate qu'en plus du point central (3 points) le dispositif de Box et Behnken est constitué dans ce cas de 12 points, qui se situent au milieu des 12 arêtes du cube délimitant le domaine expérimental. Le plan de Box-Behnken à 3 facteurs possède donc 15 essais (**Figure 11**).

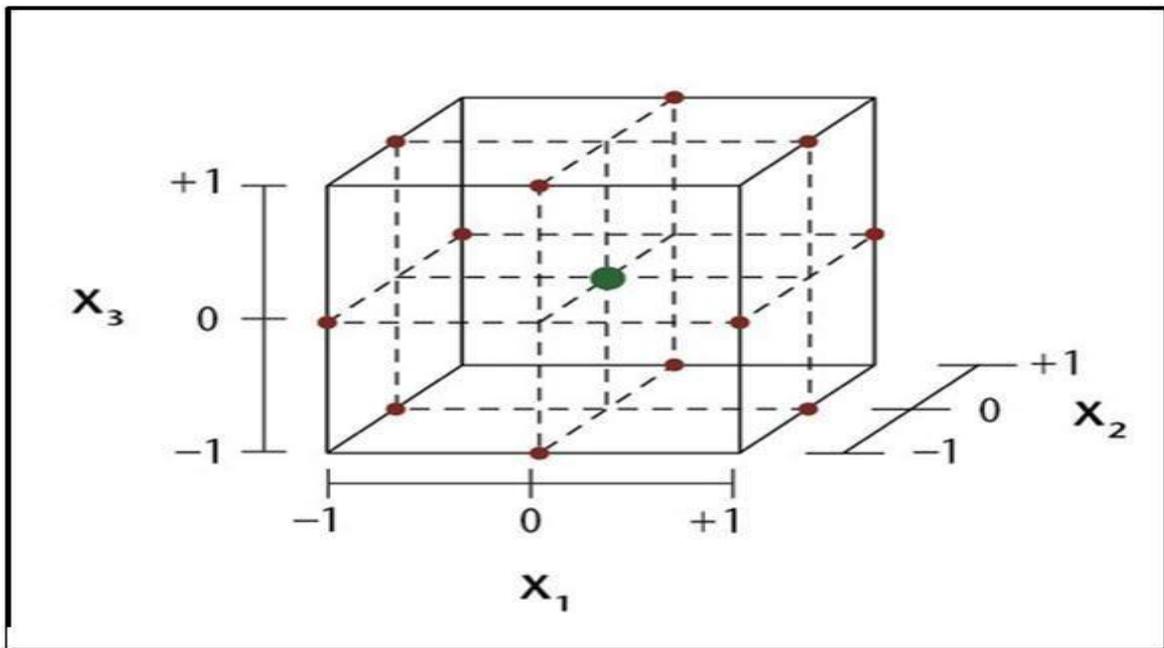


Figure 11 : Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs.

4.2. Plans composites centrés

Les plans composites sont souvent utilisés en expérimentation classique pour approcher des surfaces de réponse de degré 2. Il est possible de générer différents plans de ce type en faisant varier la distance entre le point central et les points aux bords du domaine. Le nombre d'expériences des plans composites augmente rapidement avec le nombre de variables étudiées et cette augmentation de points est surtout due à la matrice factorielle. Ils ne testent que 3 ou 5 niveaux par paramètres. En raison de leur construction, ces plans sont bien adaptés à une démarche séquentielle (**Embadi et al., 2009 ; Panasuriya et Singhal, 2010**).

Ces plans comprennent 3 catégories d'essais:

- Les essais du plan factoriel
- Les essais au centre du domaine expérimental
- Les essais en étoile situés sur les trois axes du cube et qui se trouvent à la même distance de l'origine des axes. La **Figure 12** présente un plan composite à trois facteurs.

Le plan permet de tester cinq niveaux par facteur et est constitué de trois blocs :

- Les essais du plan factoriel 2^k (8)
- Les essais en étoile, à une distance α du centre (6)
- Les essais du centre du domaine (6)

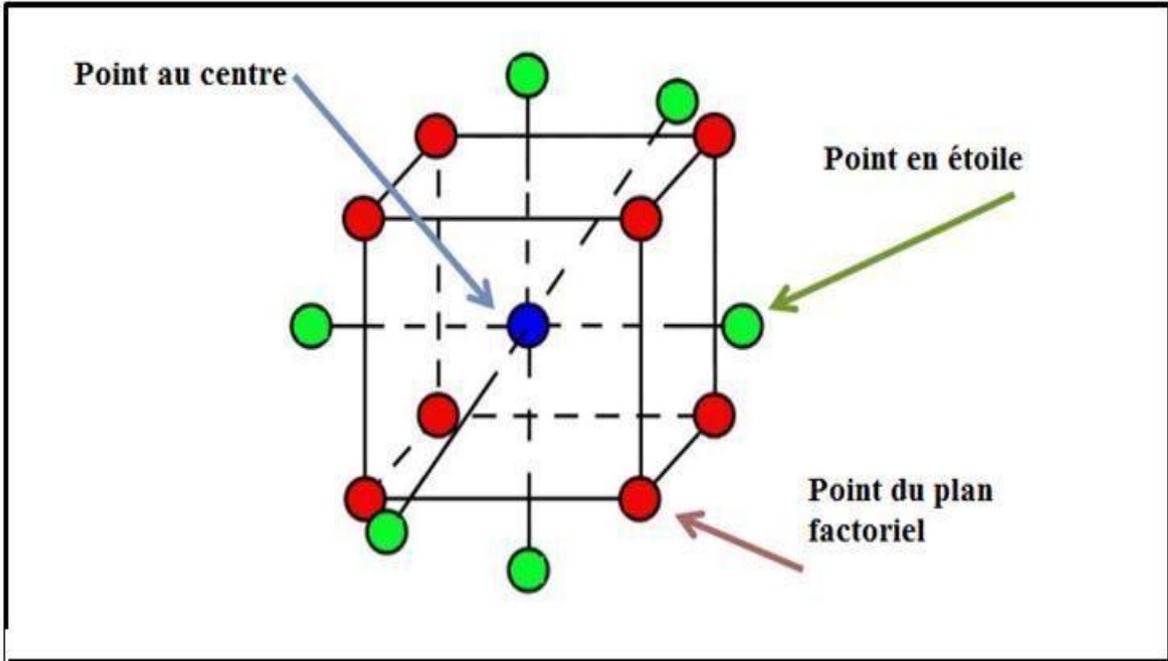


Figure 12: Plan composite centré à trois 3 variables (Leardi, 2009).

Les modèles mathématiques étudiés sont sous la forme suivante :

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad [\text{Eq1}]$$

Où Y_i est la réponse prédite, X_i et X_j sont les variables du modèle, k est le nombre de variables, β_0 est la constante du modèle, β_i est le coefficient linéaire, β_{ii} est le coefficient quadratique et β_{ij} est le coefficient d'interaction.

Matériel et Méthodes

1. Microorganismes utilisés

La souche utilisée dans ce travail est une bactérie lactique isolée du lait de chamelle, à savoir *Lactiplantibacillus plantarum* : *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*).

En plus de cette souche, quatre autres souches ont été testées pour leur aptitude à fermenter le xylose: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (*Lc20*) isolé à partir de lait de chamelle, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 (*Lc. lactis*), *Lacticaseibacillus casei* : *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*) et *Levilactobacillus brevis* : *Lactobacillus brevis* (*Lb. brevis*) isolés à partir de Lben.

1.1. Conservation des souches

Les souches sont conservées à moyen terme au congélateur à - 20°C dans des eppendorfs de 1,5 ml remplis des milieux liquides additionnés de 20% de glycérol, Man Rogosa et Sharpe (MRS) pour les *Lactobacillus*, Elliker pour les *Lactococcus* (**Annexe 1**).

Les cultures stocks sont décongelées au fur et à mesure des besoins, puis utilisées. Les eppendorfs de conservation servent à inoculer le milieu de préculture. Cette dernière est prise à l'ensemencement en phase exponentielle de croissance. Puis le milieu de culture est inoculé à raison de 10 % (v/v).

2. Milieux de culture

2.1. Milieux de préculture

Le milieu MRS est utilisé pour les *Lactobacillus* et le milieu Elliker est utilisé pour les *Lactococcus*.

2.2. Milieux de production

Différentes sources de carbone ont été utilisées: milieux synthétiques MRS et Elliker modifiés et milieux naturels à base d'*OFI*: Hydrolysats de cladodes et extrait de pelures de fruit.

2.2.1. Milieux semi synthétiques

Les milieux MRS et Elliker modifiés (**Tableaux 7 et 8**) ont été utilisés pour étudier le comportement de souches lactiques sur xylose et sur un mélange de glucose et de xylose.

Pour ce faire ces milieux ont été modifiés comme suit:

- a) en substituant la source de carbone avec du xylose
- b) en substituant la source de carbone avec un mélange de glucose et du xylose.

Tableau 7 : Composition du milieu MRS modifié.

Composition	MRS (g/L)	MRSMX (g/L)	MRSMGX (g/L)
Peptone	10	10	10
Extrait de levure	5	5	5
Citrate d'ammonium	2	2	2
Sodium acétate	2	2	2
Glucose	20	0	10
Xylose	0	20	10
K ₂ HPO ₄	0,1	0,1	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1	0,1	0,1
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05	0,05	0,05
Tween 80	1	1	1

MRSMX: La source de carbone est le xylose.

MRSMGX: La source de carbone est un mélange de glucose et du xylose.

Tableau 8 : Composition du milieu Elliker modifié.

Composition	Elliker (g/L)	EllikerMX (g/L)	EllikerMGX (g/L)
Tryptone	20	20	20
Extrait de levure	5	5	5
Acétate de sodium	1,5	1,5	1,5
Lactose	5	0	0
Saccharose	5	0	0
Glucose	5	0	7,5
Xylose	0	15	7,5
Acétate de sodium	1,5	1,5	1,5
Acide ascorbique	0,5	0,5	0,5

EllikerMX: La source de carbone est le xylose.

EllikerMGX: La source de carbone est un mélange de glucose et du xylose.

2.2.2. Milieux à base d'*OFI*

Les fruits et les cladodes ont été collectés dans des plantations situées dans les régions de Ras El Ain et Ouled Rahmoune Wilayas d'Oum El bouaghi et Constantine respectivement. La récolte des cladodes a été réalisée en Octobre jusqu'au début de Décembre. Les fruits sont récoltés à la fin de mois d'Août jusqu'au mois de Septembre.

2.2.2.1. Extraction de jus de pelures de fruit

Les pelures de fruits ont été séchées dans une étuve ventilée à 60 °C pendant 72 h. Après broyage et tamisage la poudre obtenue est reconstituée avec l'eau distillée à raison de 15% de substrat. Le mélange obtenu est soumis à un traitement thermique à 150 °C pendant 1 h. L'extrait obtenu est centrifugé à 4000 rpm pendant 20 min afin de séparer les débris celluloseux (**Diboune et al., 2019**). Le surnageant obtenu est utilisé comme source de carbone dans le milieu de fermentation.

2.2.2.2. Hydrolyse des cladodes

a/ Hydrolyse acide de H_3PO_4

Pour ce prétraitement, trois paramètres ont été évalués : l'acide phosphorique (H_3PO_4), le substrat : poudre de cladodes d'*OFI* (COFI) et le temps d'hydrolyse. Les trois facteurs choisis pour cette étude ont été désignés comme X_1 , X_2 , X_3 et prescrits en cinq niveaux, codés $-\alpha$; -1 ; 0 ; 1 et α (**Tableau 9**). Les plages de ces variables de processus contrôlables sont sélectionnées sur la base d'expériences d'essai menées en utilisant une approche un facteur à la fois.

La conception expérimentale désignée par 20 essais réalisés suivant la matrice du modèle postulé.

Tableau 9: Niveaux des facteurs hydrolyse acide de COFI par l' H_3PO_4 (121°C).

Variables	Codes	Niveaux des variables				
		$-\alpha$	-1	0	1	α
H_3PO_4 % (v/v)	X_1	0,66	1	1,5	2	2,34
Substrat % (p/v)	X_2	3,63	5	7	9	10,36
Temps % (mn)	X_3	13,18	20	30	40	46,82

$\alpha=1,682$

Une détoxification a été réalisée afin de réduire la toxicité de l'hydrolysat acide. Pour ce faire, Le pH de l'hydrolysat acide obtenu est ajusté à 10 en utilisant le NaOH, suivi d'une filtration puis acidification à pH 5,5 avec de l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4 , 96 %) et finalement une filtration pour éliminer le précipité. Le pH est alors ajusté à 6.

L'hydrolysat non détoxifié est enrichi en sels ($MgSO_4$: 0,5 g/L, $MnSO_4$: 0,07 g/L, CH_3COONa : 6g/L, K_2HPO_4 :0,5 g/L, KH_2PO_4 : 0,5 g/L) et en extrait de levure.

b/ Hydrolyse acide par HCl

Les cladodes sont d'abord lavées, coupées en dés. Ces derniers sont séchés dans une étuve ventilée à 60°C pendant 48 h et par la suite broyés et tamisés en utilisant une colonne à tamis constituée de tamis d'ouverture de maille 250, 350 et 450 μm .

Le modèle statistique Box-Behnken a été appliqué afin d'optimiser l'hydrolyse acide de cladodes. Dans cette partie nous avons réalisé 46 essais avec cinq facteurs et trois niveaux. L'impact de ces cinq facteurs: la concentration en acide chloridrique (HCl), la température, le substrat, la granulation de la poudre de cladodes COFI et le temps de traitement a été évalué.

Comme le montre le **Tableau 10**, les cinq facteurs choisis pour cette étude ont été désignés comme X_1 , X_2 , X_3 , X_4 et X_5 et prescrits en trois niveaux, codés -1 ; 0; +1.

La poudre de cladodes de différentes granulations (250, 350 et 450 μm) est répartie dans des tubes à essai à raison de 5, 10 et 15% en présence d'une solution d'HCl diluée (1, 3 et 5 %). Différents temps de traitement sont appliqués (25, 35 et 45 mn) à différentes températures (60, 90 et 120 °C).

Après filtration l'hydrolysat est centrifugé à 4000 rpm pendant 12 mn. Le dosage des sucres réducteurs est effectué sur le surnageant recueilli.

Tableau 10 : Niveaux des variables. Hydrolyse de COFI par l'HCl.

Variables	Codes	Niveaux des variables		
		-1	0	+ 1
HCl (%)	X_1	1	3	5
Température (°C)	X_2	60	90	120
Temps (mn)	X_3	25	35	45
Granulation (μm)	X_4	250	350	450
Substrat (%)	X_5	5	10	15

c/ Hydrolyse enzymatique

Deux échantillons de poudre de cladodes ont été hydrolysés: la poudre de cladode entière et la poudre de cladodes à 350 μm de granulation. La poudre est répartie dans des tubes à essai à raison de 5% en présence d'une solution de cellulase à différentes activités enzymatiques (20, 30 et 40 UI/g). Après ajustement du pH à 4,5 par l'acide acétique, les tubes sont incubés à 47 °C avec une agitation maximale au bain marie à différents temps de traitement (4, 24 et 48 h).

L'hydrolysate est centrifugé à 10000 rpm pendant 5 mn. Le dosage des sucres réducteurs est effectué sur le surnageant recueilli.

2.3. Stérilisation

La stérilisation des milieux et des solutions est réalisée par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. Pour éviter les réactions de brunissement non enzymatique, les milieux à base d'*OFI* et les solutions supplémentées (sources d'azote et sels minéraux) sont stérilisés séparément.

3. Procédés de culture discontinue

Les fermentations sont réalisées dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture. Les conditions de culture sont les suivantes:

- ❖ Taux d'inoculum : 10%;
- ❖ Température : 32-37°C;
- ❖ pH ajusté à 6;
- ❖ Age d'inoculum (**Tableau 11**)
- ❖ Agitation : 150 rpm.

Toutes les expériences sont effectuées en triplicata.

Tableau 11: Conditions de fermentation des souches lactiques

Souches		Température (°C)	Age d'inoculum (h)
Lactococcus	<i>Lc. lactis (Lc20)</i>	32	6
	<i>Lc. lactis ATCC 19435</i>	32	12
Lactobacillus	<i>Lb. plantarum</i>	37	10
	<i>Lb. brevis</i>	37	6
	<i>Lb. caseii</i>	37	4

Les appareils et produits chimiques sont mentionnés en **annexe 2**.

4. Méthodes analytiques

4.1. Mesure de l'humidité

La teneur en eau a été déterminée par dessiccation des échantillons dans une étuve ventilée à une température de 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant (**AOAC, 2000**).

4.2. Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable est déterminée par titration de 10 ml d'échantillon avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,1N en présence d'un indicateur coloré la phénolphthaléine. Les résultats sont exprimés en % d'acide citrique (**AOAC, 2000**).

4.3. Estimation de la biomasse

La croissance bactérienne est estimée par la mesure de densité optique (DO) suivie en temps réel (chaque heure) à 650 nm.

4.4. Dosage des sucres réducteurs (SR)

Les sucres réducteurs sont des sucres simples donneurs des électrons dans une réaction d'oxydoréduction, quantifiés par la méthode colorimétrique de 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) qui absorbe à une longueur d'onde de 540 nm (**Miller, 1956**). En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs (en raison de leurs groupements carbonyle libres C=O) en acide 3-amino 5 nitrosalicylique rouge orangé. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la teneur en sucres. Les différentes concentrations des échantillons sont déterminées à partir d'une gamme étalon.

4.5. Dosage d'acide lactique

L'acide lactique présent dans le milieu réactionnel est mesuré par la méthode de **Taylor (1996)** dont le principe repose sur la réaction suivante: l'acide sulfurique concentré provoque à chaud la libération d'acétaldéhyde à partir de l'acide lactique. L'acétaldéhyde réagit avec le cuivre et le p-phénylphénol en donnant un chromogène qui absorbe à 570 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'acide lactique présent dans l'échantillon à doser. Les teneurs sont déterminées en référence à une gamme étalon.

4.6. Dosage des protéines

Cette méthode repose sur la formation d'un complexe protéine/cuivre et la réduction d'un réactif, le phosphomolybdate phosphotungstate (réactif de Folin-Ciocalteu) par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en milieu alcalin (pH à peu près égal à 10) (**Lowry et al., 1951**). Cette réduction se traduit par une coloration bleue. La densité optique est mesurée à 750 nm.

4.7. Détermination des cendres

La quantité des cendres a été déterminée par la pesée des cendres issues de la minéralisation de la matière sèche à 550 °C pendant 3-5 heures (**AOAC, 2000**).

4.8. Dosage de furfural

Le furfural réagit avec l'aniline en présence d'acide acétique et donne un complexe coloré en rouge qui est dosé par colorimétrie à 540 nm. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la teneur en furfural. Le dosage s'effectue sur le distillat de l'hydrolysate acide de COFI et de l'extrait de pelures de fruit d'*OFI* (PFOFI). Les concentrations des échantillons sont déterminées à partir d'une gamme étalon préalablement établie (**Ariffin et al., 2009**). Un dosage est également réalisé par HPLC.

4.9. Dosage de 5-Hydroxyméthyl-furfural (5-HMF)

Le 5-HMF réagit avec l'acide barbiturique et la para-toluidine pour donner un composé rouge qui est dosé par colorimétrie à 550 nm. Les concentrations des échantillons sont déterminées à partir d'une gamme étalon (**Leblanc et al., 2009**).

4.10. Dosage des éléments minéraux

Les teneurs en Ca, Mg, K et Mn ont été analysées par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) après digestion acide par voie humide des échantillons avec HNO₃ et H₂O₂. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre AAnalyst 800 de Perkin.

4.11. Détermination de phosphore

Le phosphore total a été déterminé après incinération de l'échantillon. L'analyse est réalisée en milieu acide par Colorimétrie au vanado-molybdate à 420 nm (**Mueller-Harvey et Baker, 2002**).

5. Paramètres cinétiques

- Vitesse spécifique maximale de croissance

La vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{\max}) est déterminée graphiquement pendant la phase de croissance exponentielle (c'est la période pendant laquelle (μ) est maximale est constante) en traçant ($\ln X/X_0$) en fonction du temps.

- **Productivité volumétrique**

La productivité volumétrique est la quantité de produit par unité de temps et de volume.

$$\delta = \frac{P - P_0}{t}$$

- **Rendement de bioconversion**

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Avec :

X : Densité optique.

S : Concentration en substrat (sucres réducteurs) (g/L).

P : Concentration en l'acide lactique (g/L).

P₀: Concentration initiale de l'acide lactique (g/L).

S₀ : Concentration initiale de sucres (g/L).

t : Temps de la fermentation (h).

δ : Productivité volumétrique (g/L.h).

6. Méthodologie de surface de réponse (MSR)

Des modèles statistiques ont été appliqués afin d'optimiser l'hydrolyse acide de la BLC de l'*OFI*. Il s'agit de modèle composite centré (Central Composite Design: CCD) et de modèle Box Behnken (Box Behnken design: BBD) qui permettent d'étudier l'influence simultanée de plusieurs facteurs et de leurs interactions sur le processus d'hydrolyse de COFI.

- **Pour le CCD à 3 facteurs**

C'est est un modèle du second degré avec interactions d'ordre 2. La réponse Y est la grandeur que l'on mesure pour évaluer l'effet des facteurs sur l'hydrolyse acide. La fonction qui lie la réponse aux facteurs est représentée par la fonction polynomiale suivante:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{33} X_{32} + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Pour l'hydrolyse acide (H₃PO₄; HCl) Y désigne le sucre.

- **Pour le BBD à 5 facteurs**

La fonction qui lie la réponse aux facteurs est représentée par la fonction polynomiale suivante :

$$\mathbf{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{55} X_5^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{15} X_1 X_5 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{25} X_2 X_5 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{35} X_3 X_5 + \beta_{45} X_4 X_5.$$

β_0 est la constante du modèle

X_1 à X_5 sont les variables indépendantes

β_1 à β_5 , sont des coefficients linéaires

β_{12} , β_{13} , β_{14} , β_{15} , β_{23} , β_{24} , β_{25} , β_{34} , β_{35} et β_{45} sont les coefficients d'interaction

β_{11} , β_{22} , β_{33} , β_{44} et β_{55} sont des coefficients quadratiques

L'analyse de régression des données obtenues a été réalisée par le logiciel Minitab16.

Résultats et discussion

1. Criblage des bactéries lactiques

Les applications industrielles des ressources renouvelables telle que la BLC, sont en plein essor. La valorisation optimale de la BLC passe par l'exploitation de tous ses composants en particulier la cellulose et l'hémicellulose. Elle est donc étroitement dépendante de la manière dont ces dernières sont valorisées. L'hydrolyse de la cellulose conduit à la production de sucres monomères fermentescibles tels que le glucose. Cependant, l'hémicellulose conduit à des hexoses et des pentoses (essentiellement le glucose et le xylose), et l'utilisation de ces sucres hémicellulosiques, en particulier le xylose, est essentiel pour une conversion efficace et rentable de la BLC.

Le but de cette étude préliminaire est de cribler différentes bactéries lactiques afin de détecter une souche performante capable de croître sur les pentoses tel que le xylose et de le fermenter en acide lactique. Les souches testées sont: *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lc 20* et *Lc. lactis*.

Le comportement des différentes souches sur MRS modifié (pour les Lactobacillus) ou Elliker modifié (pour les Lactococcus) a été étudié. Le milieu synthétique contient du xylose ou un mélange de glucose et de xylose.

1.1. Croissance sur xylose

Afin d'étudier, l'effet de xylose comme seule source de carbone sur la croissance des souches et la production d'acide lactique, des cultures discontinues ont été réalisées en utilisant des milieux de culture synthétiques MRS modifié (MRSMX) et Elliker modifié (EllikerMX) avec des concentrations initiales de xylose de 20 et 15g/L respectivement.

Les cinétiques de croissance sur les milieux modifiés sont illustrées sur la **Figure 13**. La souche *Lb. casei* ne fermente pas le xylose comme source de carbone et de ce fait ne se développe pas sur le milieu MRSMX. Le même constat a été rapporté par **Erliana et al. (2020)**. En revanche, les autres souches ont la capacité de fermenter le xylose comme seule source de carbone avec des taux de croissants différents. Le taux le plus faible est observé pour *Lc. lactis* avec une vitesse maximale de croissance μ_{\max} de $0,14 \text{ h}^{-1}$ suivie par *Lb. brevis* ($0,17 \text{ h}^{-1}$), *Lc 20* ($0,19 \text{ h}^{-1}$) et *Lb. plantarum* ($0,24 \text{ h}^{-1}$) (**Tableau 12**). Cette capacité de croître sur le xylose exclusivement est déjà mentionnée pour les souches naturellement isolées par **Tanaka et al. (2002)** (*Lc lactis* IO-1), **Zhang et Vadlani, 2014** (*Lb. brevis* et *Lb. plantarum*).

Les meilleures performances en termes de production d'acide lactique (4,18 g/L), de rendement (0,22 g/g) et de productivité (0,14 g/L.h) sont obtenues avec la souche *Lb. plantarum*.

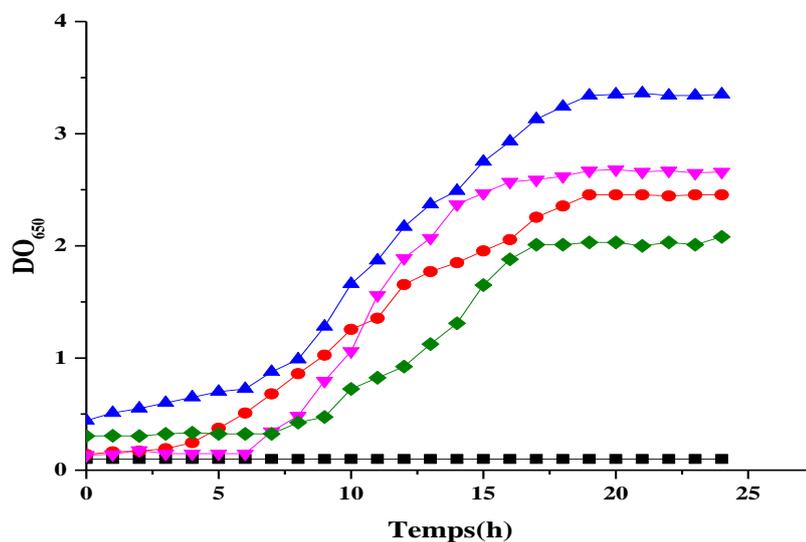


Figure 13: Cinétiques de croissance de *Lb. casei* (■), *Lb. brevis* (●) et *Lb. plantarum* (▲) sur MRS MX et; *Lc 20* (▲) et *Lc. Lactis* (■) sur Elliker MX.

Tableau 12 : Paramètres cinétiques des souches lactiques sur milieux modifiés.

Souches	μ_{\max}	Acide lactique (g/L)	Yp/s (g/g)	Productivité (g/L.h)
<i>Lb. brevis</i> sur MRS MX	0,17	2,32 ± 0,01	0,15	0,10
<i>Lb. plantarum</i> sur MRS MX	0,24	4,18 ± 0,3	0,22	0,14
<i>Lc20</i> sur Elliker MX	0,19	2,89 ± 0,05	0,24	0,12
<i>Lc. lactis</i> sur Elliker MX	0,14	2,05 ± 0,02	0,21	0,09

1.2. Croissance sur un mélange de xylose et de glucose

L'hémicellulose donne un mélange de pentoses (xylose, arabinose) et d'hexoses (glucose, galactose etc.) dont le xylose est le composant principal. L'objectif de cette partie d'étude consiste à étudier le comportement des souches lactiques sur un mélange de glucose et de xylose. Pour ce faire, les milieux synthétiques MRS et Elliker ont été modifiés de telle sorte que la source de carbone présente contient un mélange de glucose et de xylose à un ratio de 50%/50%. Pour le milieu MRS modifié (MRSMGX) la concentration de sucre est de 20 g/L (10 g/L de glucose et 10 g/L de xylose). Pour le milieu Elliker modifié la concentration de sucre est de 15 g/L (7,5 g/L de glucose et 7,5 g/L de xylose). La présence de glucose et de xylose dans le milieu influence positivement l'allure générale des cinétiques de croissance des quatre souches comme le montre la **Figure 14**. Le maximum de croissance (DO 4,75) et de production d'acide lactique (6,82 g/L) est obtenu avec la souche *Lb. plantarum* (**Tableau 13**) avec un rendement et une productivité de 0,43 g/g et 0,25 g/L.h respectivement.

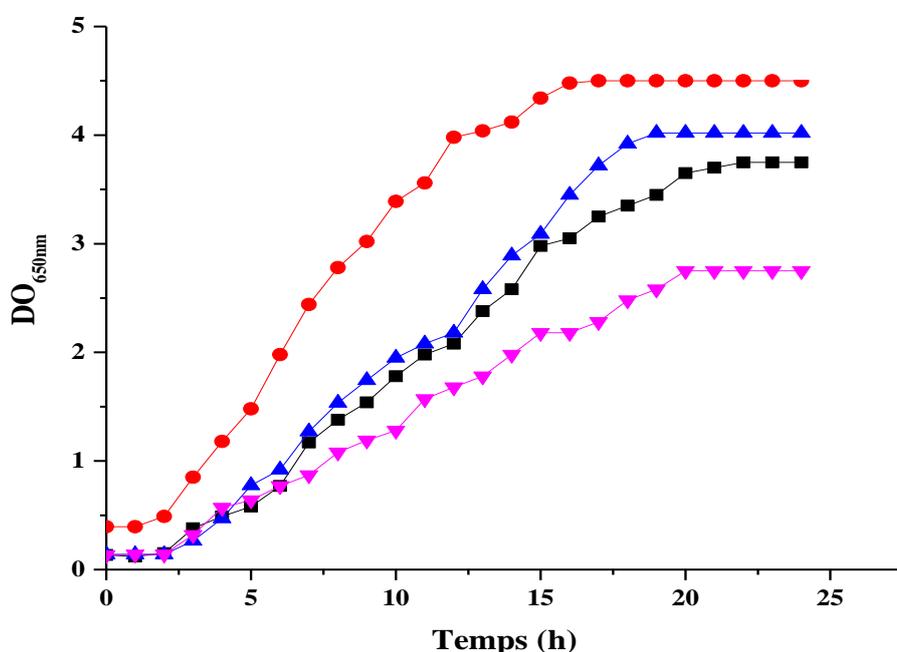


Figure 14 : Cinétiques de croissance de *Lb. brevis* (■) et *Lb. plantarum* (●) sur MRSMGX et de *Lc 20* (▲) et *Lc. lactis* (▲) sur EllikerMGX.

Tableau 13: Paramètres cinétiques des souches *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lc20* et *Lc. lactis* sur MRSMGX et EllikerMGX.

	μ_{\max}	AL (g/L)	Yp/s (g/g)	Productivité g/L.h
<i>Lb. brevis</i> sur MRSMGX	0,30	4,26 ± 0,01	0,30	0,15
<i>Lb. plantarum</i> sur MRSMGX	0,36	6,82 ± 0,4	0,43	0,25
<i>Lc20</i> sur EllikerMGX	0,32	4,85 ± 0,05	0,40	0,20
<i>Lc. lactis</i> sur EllikerMGX	0,29	3,36 ± 0,02	0,34	0,14

L'ensemble de ces résultats obtenus nous a amené à choisir pour la suite de notre travail de conserver la bactérie lactique *Lb. plantarum* pour réaliser une étude plus approfondie sur la production d'acide lactique à partir de la BLC de l'*OFI*.

2. Matière première d'*OFI*

2.1. Caractérisation de la BLC d'*OFI*

La composition chimique de la matière première utilisée est indiquée dans le **Tableau 14**. Les cladodes d'*OFI* (COFI) sont essentiellement constitués d'eau. Ils présentent un taux d'humidité de 92,5 % proche de celui rapporté (90,67%) par **Ayadi et al. (2009)**. Cette forte teneur en eau est due au stockage d'eau qui permet l'adaptation physiologique du *cactus* à la sécheresse (**Dahmoune et al., 2014**). Le pH d'*OFI* est légèrement acide allant de 4,75 pour les cladodes au 5,03 pour la peau. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par **Ayadi et al. (2009)** qui ont rapporté un pH de 4,6 pour les cladodes, et ceux obtenus par **Diboune et al. (2019)** qui ont rapporté un pH de 5,08 pour le jus de peau. Cette baisse de pH est justifiée par la présence d'une quantité d'acides organiques (malique, citrique et oxalique) qui assure l'activité antibactérienne (**Dahmoune et al., 2014**). Dans le même contexte, l'acidité titrable (exprimée en acide citrique) confirme ces résultats.

Les COFI ne présentent que 4,8 g/L de sucres réducteurs, une teneur légèrement faible par rapport à celle (6,4 g/L) rapportée par (Stintzing *et al.*, 2005). Tandis que la granulation 350 des cladodes d'*OFI* (COFI₃₅₀) présente une concentration en sucre de 11,31 g/L dont 3,26 de maltose, 4,20 g/L de glucose et 3,85 g/L d'arabinose (**Figure 15**). Après le traitement enzymatique la teneur en sucres de COFI est multipliée par six et celle de COFI₃₅₀ a triplé (38,43 g/L).

La PFOFI présente une concentration en sucre de 22,36 g/L dont le maltose est 2,7 g/L, l'arabinose 17,03 g/L et le glucose 2,63 g/L. Après le traitement thermique (150 °C, 1h) la concentration de sucres a presque doublé (41,21 g/L).

Tableau 14: Caractérisation chimique de la matière première

Matière	pH (25 °C)	SR (g/L) Avant traitement	SRT (g/L) Après traitement	Acidité titrable	Humidité (%)	Protéines (%)	Furfural	5-HMF (%)
COFI	4,75 ± 0,072	4,8	29,6 ± 0,03 ^(b)	1,54 ± 0	92,5 ± 0 ^(a)		ND	0,02
COFI ₃₅₀	4,8±0,01	11,31±0,47	38,43± 1,71 ^(b,c)	1,28 ± 0,01	89,12 ± 0,07 ^(a)	8,6	ND	0,054
PFOFI	5,03 ± 0,01	22,36± 0,05	41,21 ± 0,42 ^(c)	0,42 ± 0,01	81,8 ± 0,47 ^(a)	7,6	ND	0,376

Moyenne ± Ecart type (n=3)

SR: Sucres réducteurs : glucose, maltose

SRT: Sucres réducteurs totaux

(a) : matière fraîche

(b) : conditions optimales

(c) : glucose, maltose, arabinose

ND : non détectable

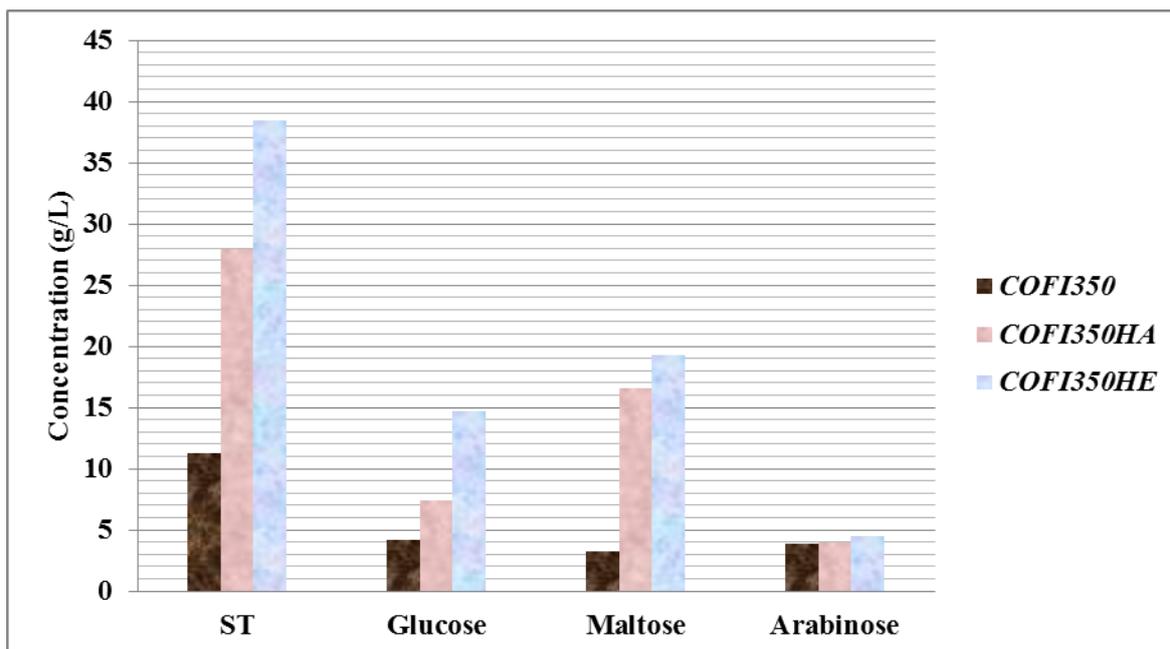


Figure 15 : Composition en sucres réducteurs totaux (SRT) : Glucose, maltose et arabinose de COFI₃₅₀ avant traitement, après hydrolyse acide (COFI₃₅₀HA) et après hydrolyse enzymatique (COFI₃₅₀HE).

L'*OFI* est une source appréciable d'éléments minéraux. Les résultats illustrés dans le **Tableau 15** le confirment. Les COFI contiennent 6,3% de cendre et la PFOFI contient 14,4%. L'analyse de la teneur en Mg, K, Ca, Mn et P_{total} montre une dissemblance en teneur et en dominance. On constate que, les COFI et les COFI₃₅₀ sont riches en potassium (K) et en calcium (Ca) avec une concentration plus importante en phosphore (P) (83,8 mg/100 g) pour les COFI₃₅₀. Concernant la PFOFI, les éléments majeurs sont le potassium (2460,8 mg/100 g) et le magnésium (Mg) (1817,9 mg/100 g). **El-Said et al. (2011)** ont rapporté des concentrations plus faibles pour la PFOFI, de 320,0 mg/100 g pour le K et 987,20 mg/100 g pour le Mg.

Les cladodes sont riches en Ca, K et Mg. La concentration en Ca (1743,4 mg/100) est presque double que celle de PFOFI (949,1 mg/100g) et cela grâce à son aspect épineux d'après les travaux d'**Ayadi et al. (2009)**. **Bakari et al. (2017)** ont rapporté une faible teneur en Ca de 44,42 mg/100g MS pour les cladodes, de même pour **El-mostafa et al. (2014)** qui ont rapporté une teneur de 5,64 à 17,95 mg/100g MS. Par ailleurs, **Alves et al. (2017)** et **Jana (2012)** ont rapporté des teneurs plus importantes de 2 146 à 6 275 mg/100 g MS et de 5640 mg/100 g MS respectivement.

Tableau 15: Composition minérale d'*OFI* (COFI, COFI₃₅₀ et PFOFI)

Minéraux (mg/100g)	COFI	COFI ₃₅₀	PFOFI
Cendres (%)	6,3	-	14,4
Mg	1496,9 ± 19,3	1143,3 ± 1	1817,9 ± 15,0
Ca	1743,4 ± 253,8	2122,4 ± 238,2	949,1 ± 117,0
Mn	1,5 ± 0,1	2,1 ± 0,0	4,3 ± 0,0
K	1585,8 ± 86,6	3098,9 ± 65,2	2464,8 ± 1,3
P _{total}	48,7 ± 0,1	83,8 ± 0,1	54,8 ± 1,3

2.2. Optimisation des prétraitements des COFI par les plans d'expériences

Le prétraitement est une étape incontournable pour réduire la récalcitrance et accroître la réactivité de la biomasse lignocellulosique vis-à-vis des procédés de conversion. La récalcitrance est principalement due à la présence de la lignine et à la forme cristalline de la cellulose. Le but de cette partie est d'appliquer des prétraitements chimiques afin d'altérer la structure lignocellulosique de la matière première et de ce fait accroître l'accessibilité de la cellulose et de l'hémicellulose aux acides et enzymes utilisés. Ces prétraitements dépendent de plusieurs facteurs internes et externes déterminants l'efficacité de processus de conversion.

L'optimisation des prétraitements a été effectuée en utilisant la méthodologie de surface de réponses. Dans cette étude des plans d'expériences ont été établis.

2.2.1. Optimisation de l'hydrolyse acide de COFI par l'H₃PO₄

Un modèle CCD a été appliqué afin d'optimiser l'hydrolyse acide de COFI en utilisant l'acide phosphorique H₃PO₄. Trois facteurs à cinq niveaux ont été évalués : la concentration d'H₃PO₄, le substrat (COFI) et le temps de réaction.

Le **Tableau 16** montre les 20 essais expérimentaux réalisés avec diverses combinaisons des trois variables et des réponses expérimentales. Les résultats montrent que la concentration en sucres obtenue varie avec les niveaux des facteurs dans une gamme de 4,67 g/L (expérience 17) à 15,17 g/L (expérience 16).

L'écart de réponse du modèle par rapport aux résultats expérimentaux est représenté sur la **Figure 16** qui montre que ce dernier arrive à simuler l'évolution de la concentration de sucres d'une façon satisfaisante, ce qui indique que le modèle estimé est proche de la réalité expérimentale.

L'expression mathématique caractérisant l'équation de régression (en termes codés) est la suivante :

$$Y (\text{Sucres réducteurs g/L}) = 10,10 - 1,6 X_1 + 2,03X_2 - 0,82X_3 - 0,53X_1^2 + 0,03X_2^2 - 1,19 X_3^2 + 1,02 X_1X_2 + 0,96X_1X_3 + 0,5X_2X_3$$

Les coefficients de régression, avec les valeurs de la probabilité P correspondantes, pour le modèle sont présentés dans le **Tableau 17**. A partir de ce dernier, on peut conclure que le coefficient linéaire X_2 (substrat) est très significatif avec une valeur de $P = 0$. Les coefficients linéaires X_1 (H_3PO_4) et X_3 (temps), les coefficients quadratiques X_3^2 (temps*temps) et les interactions X_1X_2 (H_3PO_4 *substrat), X_1X_3 (H_3PO_4 *temps) sont significatifs avec une valeur de $P < 5\%$.

Les résultats obtenus montrent que l'hydrolyse acide peut être décrite par le modèle avec un coefficient de détermination (R^2) de 90,93 %. Les conditions optimales d'hydrolyse estimées par l'équation du modèle sont les suivantes : 0,75 % H_3PO_4 , 9% de substrat et 15 mn de traitement. Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions théoriques optimales ont été appliquées. La concentration des sucres réducteurs obtenue sous ces conditions est de 15,6 g/L. Cette concentration est proche de la quantité (17 g/L) prédite par le modèle.

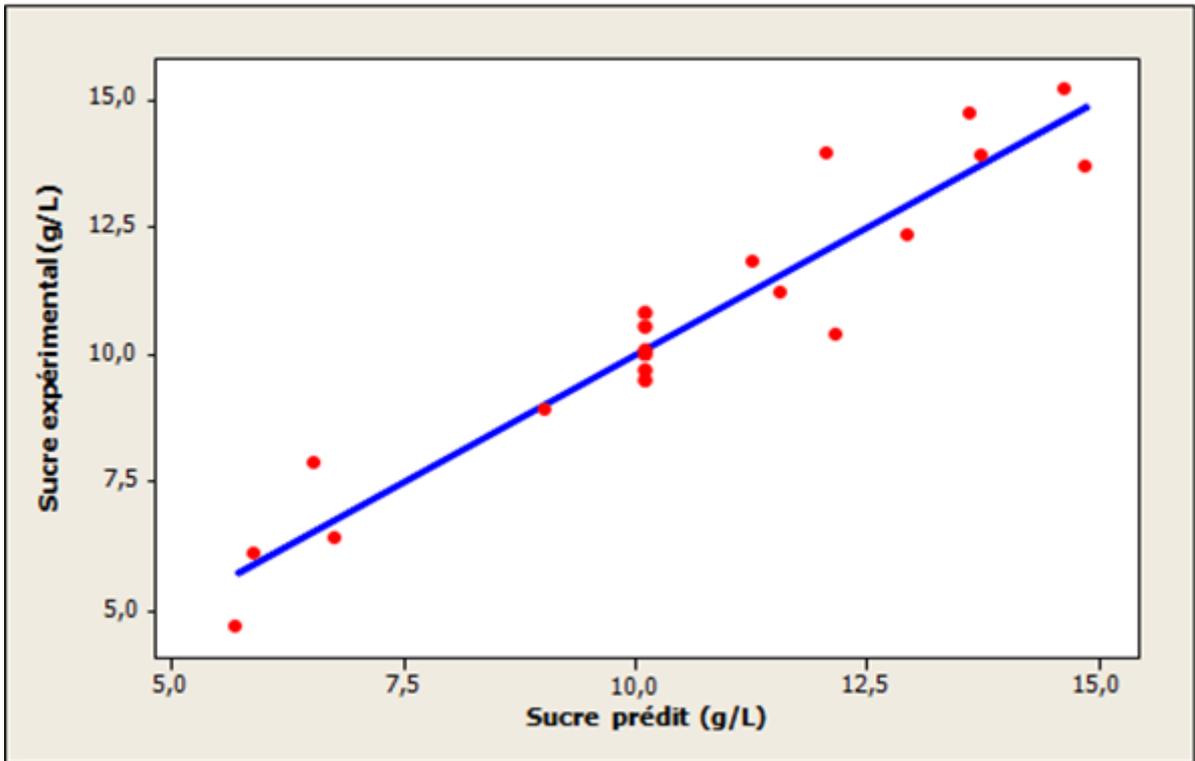


Figure 16 : Corrélation entre la concentration du sucre expérimental et du sucre prédit.

Tableau 16: Matrice expérimentale du modèle Composite centré.

Expériences	H ₃ PO ₄ (%)	Substrat (%)	Temps (mn)	Sucre mesuré (g/L)	Sucre prédit (g/L)	Différence (g/L)
1	α	0	0	6,06	5,88	0,18
2	0	0	α	13,96	12,08	1,88
3	1	1	1	12,33	12,94	-0,61
4	0	0	0	10,80	10,10	0,70
5	0	- α	0	6,37	6,77	-0,40
6	-1	-1	-1	13,85	13,73	0,12
7	1	-1	-1	7,85	6,55	1,30
8	0	0	0	9,48	10,10	-0,62
9	0	0	0	10,52	10,10	0,42
10	0	0	- α	13,68	14,87	-1,19
11	-1	-1	1	8,91	9,03	-0,13
12	0	α	0	14,70	13,62	1,09
13	-1	1	1	10,38	12,17	-1,79
14	1	1	-1	11,198	11,56	-0,36
15	0	0	0	10,05	10,10	-0,05
16	-1	1	-1	15,17	14,63	0,54
17	1	-1	1	4,67	5,70	-1,03
18	0	0	0	9,65	10,10	-0,45
19	- α	0	0	11,79	11,28	0,51
20	0	0	0	9,98	10,10	-0,11

Tableau 17: Analyse de régression des résultats obtenus à partir du CCD

Variables	Coefficient	Erreur standard	t Ratio	P
Constant	10,1007	0,4928	20,496	0,000
H ₃ PO ₄	-1,6043	0,3270	-4,906	0,001*
Substrat	2,0369	0,3270	6,229	0,000**
Temps	-0,8290	0,3270	-2,535	0,030*
H ₃ PO ₄ *H ₃ PO ₄	-0,5380	0,3183	-1,690	0,122
Substrat*Substrat	0,0328	0,3183	0,103	0,920
Temps*Temps	1,1929	0,3183	3,748	0,004*
H ₃ PO ₄ *Substrat	1,0265	0,4272	2,403	0,037*
H ₃ PO ₄ *Temps	0,9614	0,4272	2,250	0,048*
Substrat*Temps	0,5577	0,4272	1,306	0,221

**Très significatif

*Significatif à $P < 5\%$

2.2.2. Optimisation de l'hydrolyse acide de COFI par l'HCl

Nous avons appliqué le concept d'optimisation de box-behnken qui est un plan basé sur un modèle du second degré. Ce plan est appliqué pour évaluer les effets et les interactions des facteurs qui affectent l'hydrolyse acide de COFI. Cinq paramètres ont été établis par le plan de box-behnken, à savoir : la concentration en acide chloridrique (HCl), la température, le substrat, la granulation de COFI et le temps de traitement. Les cinq facteurs choisis pour cette étude ont été désignés comme X_1 , X_2 , X_3 , X_4 et X_5 et prescrits en trois niveaux, codés -1 ; 0; +1. 46 expériences ont été réalisées pour la modélisation des surfaces (**Tableau 18**). Des variations considérables des concentrations en sucres réducteurs ont été obtenues. La réponse pour la production de sucres réducteurs a montré une grande hétérogénéité des résultats, qui prouve l'importance de ces facteurs sur le procédé d'hydrolyse. En effet, la production des sucres réducteurs varie suivant les niveaux des facteurs dans une gamme de 4,58 (expérience 43) à 21,63 g/L (expérience 5). Cette variation reflète l'importance de l'optimisation pour atteindre une meilleure production. L'écart de réponse du modèle par rapport aux résultats expérimentaux montre qu'en moyenne la différence entre les sucres réducteurs mesurés et ceux simulés est inférieure à 2, ce qui indique que le modèle estimé est proche de la réalité expérimentale (**Figure 17**).

Tableau 18: Matrice expérimentale du modèle de Box-Behnken.

Experiences	HCl (%)	T (°C)	Temps (mn)	Granulation (µm)	Substrat (%)	Sucre mesuré (g/L)	Sucre simulé (g/L)
1	0	0	0	0	0	11,48	11,83
2	0	1	-1	0	0	5,56	5,66
3	0	1	1	0	0	15,97	16,93
4	-1	0	1	0	0	10,12	10,15
5	-1	1	0	0	0	21,63	20,10
6	0	1	0	0	-1	11,45	11,20
7	0	0	1	-1	0	8,99	8,02
8	1	0	1	0	0	14,01	12,85
9	0	0	0	1	-1	7,69	7,57
10	0	-1	0	1	0	6,99	8,37
11	0	0	0	0	0	11,48	11,83
12	0	-1	-1	0	0	12,79	11,51
13	1	0	0	0	1	9,93	11,42
14	0	0	1	0	-1	9,76	10,56
15	-1	0	0	0	1	5,03	6,37
16	-1	-1	0	0	0	8,17	7,63
17	0	0	-1	0	1	4,63	5,46
18	0	0	-1	1	0	4,18	5,36
19	0	0	0	0	0	10,92	11,83
20	0	0	0	-1	1	6,49	5,12
21	1	1	0	0	0	5,72	6,63
22	-1	0	0	1	0	11,70	11,22
23	0	0	1	1	0	9,67	9,61
24	0	0	0	0	0	12,25	11,83
25	0	0	0	1	1	8,31	7,29
26	0	0	-1	0	-1	5,04	5,88
27	0	1	0	-1	0	9,18	9,03
28	1	-1	0	0	0	13,76	15,66
29	0	-1	0	-1	0	9,28	9,55
30	0	-1	0	0	-1	11,21	10,96
31	0	-1	1	0	0	8,09	7,66
32	-1	0	0	0	-1	15,90	15,54
33	0	0	0	0	0	12,53	11,83
34	0	-1	0	0	1	9,13	8,09
35	-1	0	-1	0	0	12,25	11,86
36	0	0	0	0	0	12,30	11,83
37	0	0	0	-1	-1	8,09	7,63
38	0	1	0	0	1	12,32	11,28
39	0	1	0	1	0	11,35	12,32
40	1	0	0	1	0	9,75	7,88
41	1	0	0	0	-1	5,24	5,03
42	1	0	-1	0	0	5,30	3,72
43	0	0	-1	-1	0	4,58	4,85
44	0	0	1	0	1	7,41	8,20
45	1	0	0	-1	0	6,94	7,44
46	-1	0	0	-1	0	7,65	9,55

La concentration maximale de sucres (21,63 g/L) est obtenue avec les conditions suivantes: concentration HCl 1%, température 120 °C, temps 35 mn, granulation 360 µm et substrat 10%.

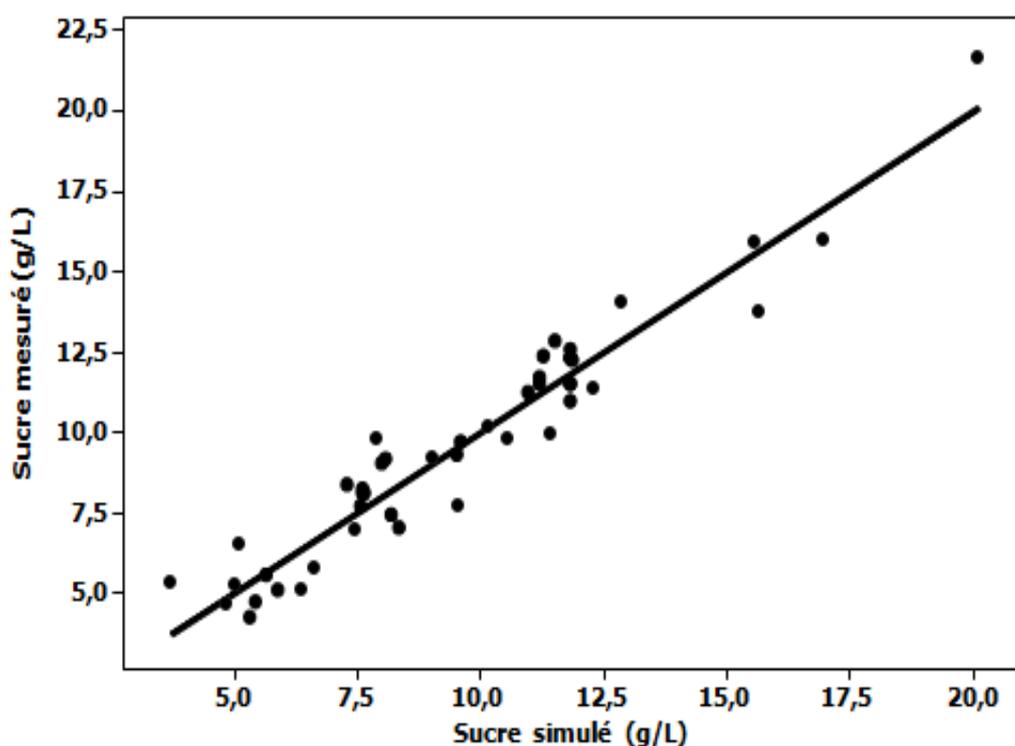


Figure 17 : Corrélation entre la concentration du sucre expérimental et du sucre prédit.

L'analyse de régression polynomiale réalisée par le logiciel Minitab 16 a permis de confirmer la fiabilité du modèle quadratique. En effet, la valeur de la probabilité P a été utilisée pour vérifier la signification de chaque coefficient, qui indique également les effets de l'interaction entre les variables. Plus la valeur de P est faible, plus l'effet du paramètre étudié est significatif.

L'expression mathématique caractérisant l'équation de régression est la suivante :

$$Y \text{ (Sucre réducteurs g/L)} = 11,83 - 1,36X_1 + 0,86X_2 + 1,85X_3 + 0,53X_4 - 0,70X_5 - 0,06X_1^2 + 0,74X_2^2 - 2,12X_3^2 - 2,74X_4^2 - 2,18X_5^2 - 5,37X_1X_2 + 2,71X_1X_3 - 0,31X_1X_4 + 3,9X_1X_5 + 3,8X_2X_3 + 1,11X_2X_4 + 0,74X_2X_5 + 0,27X_3X_4 - 0,49X_3X_5 + 0,56X_4X_5$$

Les coefficients de régression, avec les valeurs de la probabilité P correspondantes, pour le modèle de la production des sucres réducteurs sont présentés dans le **Tableau 19** à partir de ces derniers, on peut conclure que les coefficients linéaires X_1 (HCl), X_3 (Temps); les coefficients quadratiques X_3^2 (Temps * Temps), X_4^2 (Granulation* Granulation), X_5^2 (Substrat* Substrat); les coefficients d'interaction X_1X_2 (HCl*T°C), X_1X_3 (HCl* Temps), X_1X_5 (HCl* Substrat), X_2X_3 (T°C * Temps) sont très significatifs avec une valeur de P de 0 %. Les coefficients linéaires X_2 (T°C) et X_5 (Substrat) sont significatifs avec une valeur de $P < 5\%$.

Les résultats expérimentaux ont été modélisés par l'équation polynomiale du second degré pour expliquer la dépendance de la production de sucres des facteurs étudiés. L'équation du modèle a été vérifiée par l'analyse de la variance. Elle indique que l'hydrolyse acide peut être décrite par le modèle avec un coefficient de corrélation (R^2) de 92,76%. Les conditions optimales de l'hydrolyse estimées par l'équation du modèle sont les suivantes : HCl 1%, température 120 °C, temps 40 mn, granulation 350 μm et substrat 5%. Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions théoriques optimales ont été appliquées. La concentration de sucres réducteurs obtenue sous ces conditions est de 24 g/L. Cette concentration est proche de la quantité (22,94 g/L) prédite par le modèle. Ces résultats confirment la fiabilité du modèle postulé.

Tableau 19 : Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle Box- Behnken

Variable	Coefficient	Erreur standard	t Ratio	P
Constante	11,8301	0,5229	22,625	0,000
HCl	-1,3626	0,3202	-4,255	0,000**
T°C	0,8586	0,3202	2,681	0,013*
Temps	1,8551	0,3202	5,793	0,000**
Granulation	0,5272	0,3202	1,646	0,112
Substrat	-0,6955	0,3202	-2,172	0,040*
HCl*HCl	-0,0565	0,4336	-0,130	0,897
T°C*T°C	0,7363	0,4336	1,698	0,102
Temps*Temps	-2,1215	0,4336	-4,893	0,000**
Granulation*Granulation	-2,7437	0,4336	-6,328	0,000**
Substrat*substrat	-2,1793	0,4336	-5,026	0,000**
HCl*T°C	-5,3750	0,6404	-8,393	0,000**
HCl*Temps	2,7101	0,6404	4,232	0,000**
HCl*Granulation	-0,3086	0,6404	-0,482	0,634
HCl*Substrat	3,8889	0,6404	6,073	0,000**
T°C*Temps	3,7787	0,6404	5,901	0,000**
T°C*Granulation	1,1144	0,6404	1,740	0,094
T°C*Substrat	0,7378	0,6404	1,152	0,260
Temps*Granulation	0,2691	0,6404	0,420	0,678
Temps*Substrat	-0,4850	0,6404	-0,757	0,456
Granulation*Substrat	0,5555	0,6404	0,867	0,394

** Très significatif

* Significatif à $P < 5\%$

2.2.3. Hydrolyse enzymatique de COFI

L'hydrolyse enzymatique de la biomasse cellulosique des cladodes d'*OFI* par la cellulase constitue une méthode spécifique, réalisée dans des conditions relativement douces: 47 °C et à un pH de 4,5. Les effets de deux paramètres sur le rendement de la concentration de sucre ont été étudiés:

2.2.3.1. Effet du temps de l'hydrolyse enzymatique de COFI

Pour ce faire, l'hydrolyse enzymatique de COFI a été réalisée dans les conditions suivantes : une activité de la cellulase de 20 UI/g pour un substrat de 10% et à différents temps de traitements (5, 24 et 48 h). Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 18**. Le maximum de sucre (15,78 g/L) est récupéré après 24 h d'hydrolyse.

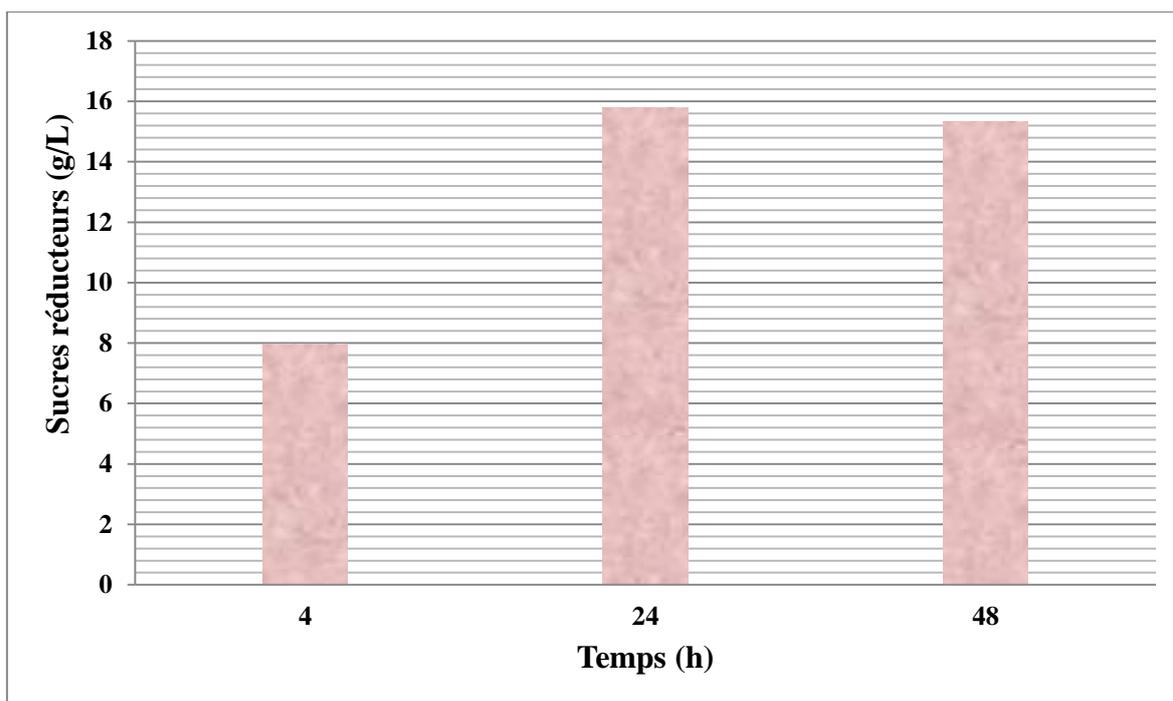


Figure 18 : Effet du temps de l'hydrolyse enzymatique sur la récupération des sucres réducteurs de COFI.

2.2.3.2. Effet de la concentration de cellulase sur l'hydrolyse enzymatique de COFI

Afin d'étudier l'effet de la concentration d'enzyme sur la production de sucres, trois concentrations ont été testées: 20, 30 et 40 UI/g pour un substrat de COFI de 10% et 24 h de temps d'hydrolyse. Les résultats obtenus sont montrés sur la **Figure 19**. Les sucres réducteurs récupérés sont proportionnellement liés à la concentration de cellulase. Plus la concentration de la cellulase augmente, plus la concentration de sucres obtenus est importante. Le maximum de sucre (29,6 g/L) est obtenu à une concentration de cellulase de 40 UI/g. Cette dernière est retenue pour la suite des expériences.

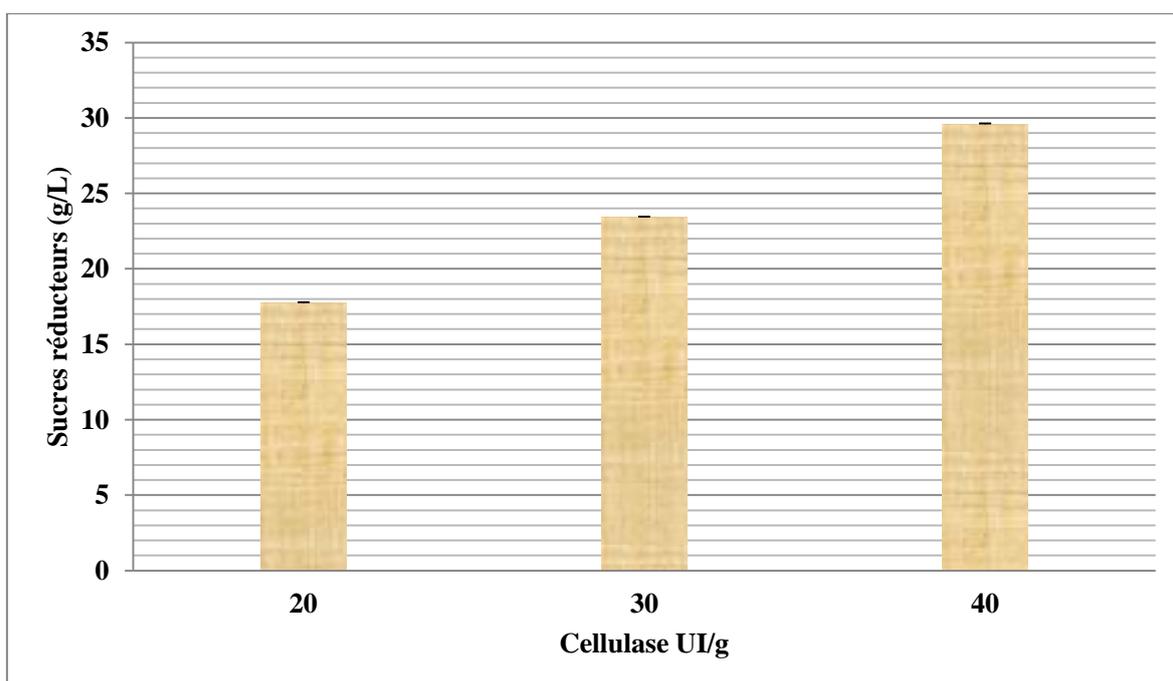


Figure 19 : Effet de la concentration de cellulase sur la récupération des sucres réducteurs de COFI.

2.2.3.3. Hydrolyse enzymatique de COFI₃₅₀

Généralement, une combinaison entre l'hydrolyse acide et l'hydrolyse enzymatique permet de meilleurs rendements que le procédé à un seul étage, à la fois en termes d'hydrolyse des hémicelluloses et de la cellulose. Une hydrolyse acide de COFI₃₅₀ a été réalisée avec les conditions optimales obtenues par le modèle box behnken, suivie d'une hydrolyse enzymatique (40 UI/g de cellulase à 47°C pendant 24 h) qui nous a permis de récupérer une concentration de sucres réducteurs de 33,96 g/L.

Le **Tableau 20** synthétise les résultats d'hydrolyse acide de la BLC de différentes études. L'hydrolyse des hémicelluloses dépend des conditions opératoires utilisées au cours du prétraitement. De fortes températures augmentent la cinétique de solubilisation des hémicelluloses et des temps de réaction plus faibles limitent la dégradation des sucres. Cela dépend aussi de la nature du substrat et de la concentration en acide utilisée. **Tamine et al. (2018)** ont travaillé sur la production d'acide lactique à partir de COFI. Avec une concentration d'H₂SO₄ de 6,8%, 10% de substrat, un traitement d'hydrolyse de 92 mn à 100 °C, la concentration en glucose récupérée est de 12 g/L. Par ailleurs, **Garde et al. (2002)** ont obtenu 2 g/L de glucose pour une hydrolyse de paille dans les même conditions mais à une concentration de H₂SO₄ de 4% et un temps d'hydrolyse de 60 mn. L'hydrolyse acide couplée à l'hydrolyse enzymatique augmente considérablement l'accessibilité de la fraction cellulosique de la BLC et a comme conséquence, une concentration importante de sucres. En effet, cette combinaison de traitement a permis d'obtenir une concentration plus importante. Près de 38 g/L de sucres ont été obtenus dans cette étude en utilisant comme substrat le COFI₃₅₀ (**Tableau 20**).

Tableau 20 : Comparaison entre différentes conditions d'hydrolyse de la BLC.

Substrat	Conditions optimales	Sucres réducteurs	Références
COFI	H ₂ SO ₄ : 1,5%, Substrat : 30%, 120°C pendant 50 min	7,4g/L glucose et 4g/L arabinose.	Kuloyo et al., 2014
Canne à sucres	H ₂ SO ₄ : 2%, Substrat : 2%, 122°C pendant 20,5 min	32,4 g/L	Amenaghawa et al., 2014
COFI	H ₂ SO ₄ : 6,8%, Substrat : 10%, 100 °C pendant 92 min	12g/L de glucose	Tamine et al., 2018
Paille	H ₂ SO ₄ : 4%, Substrat : 10%, 100°C pendant 2h	2g/L de glucose	Garde et al., 2002
COFI	H ₃ PO ₄ : 0,75%, Substrat : 9%, 121°C pendant 15 min	15,6 g/L	Cette étude
COFI₃₅₀	HCl : 1%, Substrat : 5%, 121°C pendant 40 min	27,95 g/L	Cette étude
COFI₃₅₀	HCl : 1%, Substrat : 5%, 121°C pendant 40 min (HA) suivi par une hydrolyse enzymatique (HE) 40UI/g 47°C pendant 24h	38,43	Cette étude
Raffles de maïs	Substrat : 10% HCl : 1%, 120°C pendant 40 min	60,8 g/L	Zu et al., 2014

3. Production de l'acide lactique sur hydrolysats de COFI

L'objectif de cette partie d'étude est d'explorer l'hydrolysats de COFI en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique.

3.1. Production d'acide lactique sur l'hydrolysats de COFI par H_3PO_4

3.1.1. Production d'acide lactique sur hydrolysats sans détoxification

Des fermentations en culture discontinue ont été réalisées afin d'observer le comportement de *Lb. Plantarum* sur l'hydrolysats acide de COFI. Les résultats obtenus nous montrent bien que l'hydrolysats acide des cladodes est un substrat potentiel pour la fermentation lactique (**Tableau 21**). Les cinétiques de croissance de consommation de sucre et de la production d'acide lactique sont montrées sur la **Figure 20**. Le maximum de croissance atteint est 4,5 de DO avec une concentration maximale d'acide lactique de 4,82 g/L, une productivité de 0,17 g/L.h et un rendement de 0,47g/g.

3.1.2. Production d'acide lactique sur hydrolysats détoxifié

La dégradation thermochimique de l'hémicellulose libère en majorité des sucres monomères tels que le xylose, le mannose, le galactose et le glucose, avec des inhibiteurs toxiques pour la fermentation (**De Oliveira et al., 2018**). Ces composés de dégradation solubles sont généralement divisés en trois groupes : les furanes, les acides carboxyliques et les phénols.

Les furanes tels que le furfural et le 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF) se forment après déshydratation du xylose et du glucose, respectivement (**Cubas-Cano et al., 2020**). Ces composés peuvent endommager la membrane et interférer avec les enzymes glycolytiques et la synthèse macromoléculaire provoquant des phases de latence prolongées. Pour éviter ces inhibiteurs une étape de détoxification est nécessaire pour améliorer les performances de la fermentation (**Tomás-Pejó et al., 2011**). Il s'agit d'un traitement de l'hydrolysats par le NaOH qui consiste à augmenter le pH afin de précipiter les composés toxiques tels que le furfural et l'HMF (**Neureiter et al., 2003**). Des fermentations ont été réalisées sur l'hydrolysats détoxifié.

Les cinétiques de croissance, de consommation et de production d'acide lactique sont illustrés dans la **Figure 20**. L'absence de la phase de latence signifie que la bactérie s'adapte rapidement au milieu de culture. Il est bien clair que la détoxification a un effet positif sur les fermentations, tous les paramètres cinétiques se sont améliorés. On note une amélioration de production d'acide lactique de 28,4%. Cette dernière est moins importante que celle (42,6%) trouvée par **Tamine et al. (2018)**. Cela revient à la nature d'acide utilisé par ces auteurs le H_2SO_4 qui est plus toxique que le H_3PO_4 . Selon **Hui et al. (2009)** l'acide phosphorique dilué avec le NaOH donne du phosphate de sodium qui est un nutriment pour les microorganismes (**Li et al., 2009**).

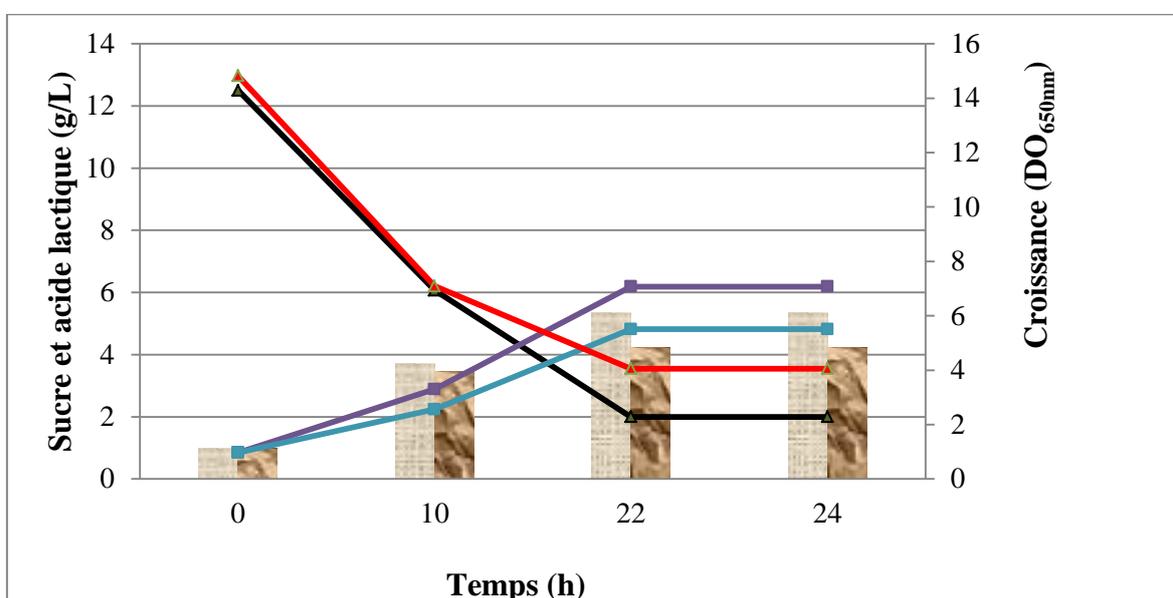


Figure 20 : Cinétiques de croissance, de consommation et de production d'acide lactique de *Lb. plantarum* sur HAH₃PO₄D et HAH₃PO₄ND : croissance de *Lb. plantarum* sur HAH₃PO₄D (■) : croissance de *Lb. plantarum* sur HAH₃PO₄ND (■) : consommation de sucres sur HAH₃PO₄D (▲) : consommation de sucres sur HAH₃PO₄ND (▲) : production de l'AL sur HAH₃PO₄D (■) : production de l'AL sur HAH₃PO₄ND (■).

Tableau 21 : Paramètres cinétiques de *Lb. plantarum* sur l'hydrolysate acide de COFI

Hydrolysats	μ_{\max}	AL (g/L)	Yp/s (g/g)	Productivité g/L.h
HAH₃PO₄D	0,35	6,19 ± 0,01	0,59	0,22
HAH₃PO₄ND	0,28	4,82 ± 0,02	0,47	0,17
HAH₃PO₄ND + sels	0,26	5,69±0,02	0,57	0,20
HAH₃PO₄ND + sels + EL (1,5 %)	0,25	7,28±0,08	0,60	0,27
COFI₃₅₀ HA	0,18	6,4±0,08	0,33	0,23
COFI₃₅₀ HE	0,25	9,17±0,1	0,46	0,34
PFOFI	0,3	23,66± 0,7	0,78	0,95

HAH₃PO₄ND : hydrolysate acide de *COFI* non détoxifié.

HAH₃PO₄D : hydrolysate acide de *COFI* détoxifié.

EL : extrait de levure.

HA : hydrolyse acide.

HE : hydrolyse acide suivie d'une hydrolyse enzymatique.

3.1.3. Production d'acide lactique sur l'hydrolysate HAH₃PO₄: effet des sels

Il est montré que les ions Mn²⁺ et Mg²⁺ interviennent dans la nutrition des lactobacilles. De ce fait, un enrichissement du milieu avec les sels a été réalisé. Cinq sels ont été retenus pour leur effet positif connu sur la croissance et la production d'acide lactique : MgSO₄, MnSO₄, CH₃COONa, K₂HPO₄, KH₂PO₄. Les résultats obtenus montrent que l'enrichissement améliore la production d'acide lactique. Une concentration d'acide lactique de 5,69 g/L a été obtenue, ce qui fait une amélioration de 18,04%.

3.1.4. Production d'acide lactique sur l'hydrolysate HAH₃PO₄: effet de l'extrait de levure

Les bactéries lactiques sont des microorganismes fastidieux et ont les conditions nutritives complexes dues à leur capacité limitée pour la biosynthèse des vitamines et des acides aminés. L'extrait de levure est la source d'azote la plus couramment employée et souvent la plus efficace pour la croissance car elle offre des acides aminés et des cofacteurs enzymatiques indispensables à la croissance cellulaire et au métabolisme bactérien. Dans une étude préliminaire l'effet de l'extrait de levure à différentes concentrations (0,5, 1, 1,5 et 2%) sur la production d'acide lactique a été testé.

Les résultats obtenus ont montré que les meilleures performances en termes de production d'acide lactique et de croissance sont obtenues avec l'hydrolysate acide HAH_3PO_4 supplémenté par 15 g/L d'extrait de levure. Le maximum d'acide lactique obtenu est de 7,28 g/L (**Tableau 21**). On note une amélioration de production d'acide lactique de 51% par rapport à l'utilisation de l'hydrolysate HAH_3PO_4 sans enrichissement. Les meilleures performances en termes de rendement (0,6 g/g) et de productivité (0,27 g/L.h) sont obtenues.

3.2. Production d'acide lactique sur hydrolysate acide de COFI₃₅₀

Des fermentations en culture discontinue ont été réalisées sur l'hydrolysate acide (HCl) de COFI₃₅₀. Les conditions précédentes d'hydrolyse optimale ont été appliquées. Le maximum d'acide lactique obtenu est de 6,4 g/L avec un rendement de 0,33 g/g inférieur à celui obtenu par **Neureiter et al. (2003)** (0,38 g/g) qui ont utilisé l'hydrolysate acide du bois comme source de carbone pour la production d'acide lactique. Il faut noter que les hydrolysats produits en milieu acide sont difficiles à fermenter, en raison de la présence de composés inhibiteurs de la production d'acide lactique.

3.3. Production d'acide lactique sur hydrolysate enzymatique de COFI₃₅₀

Parmi les différentes possibilités de conversion de la BLC en acide lactique, la bioconversion par hydrolyse enzymatique et fermentation de la lignocellulose en acide lactique, un procédé particulièrement attractif. L'hydrolyse de la cellulose par des enzymes est souvent la voie préconisée pour l'obtention des sucres. Les hémicelluloses sont très hydrophiles et se dégradent assez facilement par des traitements acides en produisant des sucres monomères (xylose, arabinose, glucose et autres sucres). Ainsi, en général, la solubilisation de l'hémicellulose sous forme de sucres monomères ou oligomère est obtenue lors du prétraitement à l'acide dilué, ce qui entraîne des rendements en glucose supérieurs à 90 % à partir de l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose prétraitée à l'acide dilué (**Xiu et al., 2011**).

Dans cette partie d'étude, on a utilisé un hydrolysate mixte pour la production d'acide lactique par *Lb. plantarum*. Pour ce faire, le COFI₃₅₀ a subi une hydrolyse acide suivant les conditions optimales obtenues par le modèle Box behnken suivie par une hydrolyse enzymatique par la cellulase. L'hydrolysate mixte obtenu est utilisé en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique.

Les résultats obtenus sont montrés dans le **Tableau 21**. Il s'avère que la combinaison entre l'hydrolyse acide et l'hydrolyse enzymatique permet de meilleures performances en termes de rendement et de productivité. Près de 9,17 g/L d'acide lactique obtenus avec un rendement et une productivité de 0,46 g/g et 0,34 g/L.h respectivement.

4. Production d'acide lactique à partir de PFOFI

Les PFOFI sont riches en sucres et peuvent être utilisées comme source de carbone pour la production d'acide lactique. Récemment, **Diboune et al. (2019)** ont obtenu des résultats prometteurs sur la valorisation des PFOFI par la production de levure de type *Saccharomyces cerevisiae*. Pour extraire le jus de PFOFI, un traitement à haute température (150 °C) a été appliqué au PFOFI et qui a permis d'affecter de manière significative la dépolymérisation de la BLC de PFOFI.

Afin d'examiner la faisabilité de production d'acide lactique par *Lb. plantarum* sur les PFOFI, plusieurs fermentations en culture ont été réalisées sur le jus extrait de PFOFI (**Diboune et al., 2019**).

Le comportement de *Lb. plantarum* sur le milieu à base de jus de PFOFI à différentes concentrations en sucres (2, 4, 6, 8%), a été évalué. Les résultats obtenus ont montré que les meilleures performances en termes, de rendement et de productivité sont obtenues avec le jus de PFOFI à une concentration de sucres de 6% (**Figure 21**). La concentration d'acide lactique et le rendement sont 23,66 g/L et 0,78 respectivement. Il ressort de ces résultats que le jus de PFOFI peut être considéré comme une source convenable pour la production d'acide lactique à partir de *Lb. plantarum*. Cette dernière a été utilisée dans plusieurs travaux concernant la production d'acide lactique.

Wang et al. (2005) ont évalué le profil de production d'acide lactique par *Lb. plantarum* **TD46** en utilisant des déchets de cuisine et ont obtenu un rendement en acide lactique de 0,39 g/g et une productivité moyenne de 0,60 g/L.h. **Sharma & Mishra (2014)** ont rapporté une concentration d'acide lactique de 3,2 g/L sur jus de légumes en utilisant *Lb. plantarum* NCDC 414. **Sharma et al. (2021)** ont utilisé la souche *Lb. plantarum* CRA52 pour la production d'acide lactique sur du perméat de lactosérum comme source de carbone et de l'hydrolysate de protéines de lactosérum comme source d'azote. Ils ont obtenu une concentration d'acide lactique de 17,26 g/L avec un rendement de 0,87 g/g et une productivité de 0,87 g/L.h.

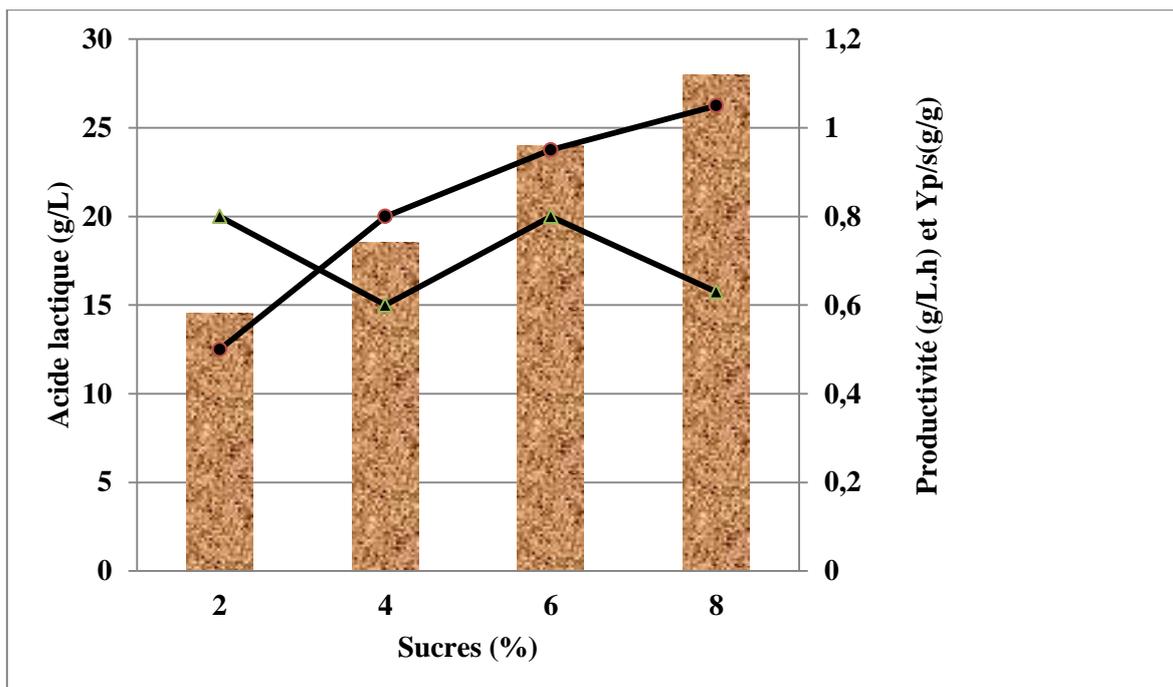


Figure 21: Effet de la concentration initiale en sucre de jus de PFOFI sur le rendement (●), la productivité (▲) et la production d'acide lactique (■) par *Lb. plantarum*.

5. Production d'acide lactique sur un mélange de PFOFI et COFI₃₅₀

L'objectif de cette partie d'étude est d'explorer le mélange d'hydrolysate acide de COFI₃₅₀ et le jus de PFOFI en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique. Plusieurs fermentations ont été réalisées en utilisant différents ratios PFOFI/COFI₃₅₀ (Jus de PFOFI /Jus de COFI₃₅₀). Les résultats obtenus sont montrés dans le **Tableau 22**, On constate que plus le ratio PFOFI/COFI₃₅₀ augmente plus les paramètres cinétiques de *Lb. plantarum* augmentent. Les meilleures performances en termes de production d'acide lactique, de productivité et de rendement sont obtenues avec un ratio PFOFI/ COFI₃₅₀ de 75/25. La concentration maximale de d'acide lactique obtenue est de 16,71 g/L ce qui représente trois fois la concentration obtenue avec l'hydrolysate acide de COFI₃₅₀ (6,4 g/L). Ceci est valable pour la productivité. Quant au rendement obtenu (0,66 g/g), il est le double de celui obtenu avec l'hydrolysate acide de COFI₃₅₀ (0,33 g/g).

Tableau 22 : Paramètres cinétique de de *Lb. plantarum* sur le mélange PFOFI/COFI₃₅₀

PFOFI/COFI₃₅₀	μ_{\max}	AL (g/L)	Productivité (g/L.h)	Yp/s (g/g)
PFOFI/ COFI₃₅₀ 25/75	0,20	7,27 ± 0,37	0,27	0,44
PFOFI/ COFI₃₅₀ 50/50	0,28	12,71 ± 0,95	0,49	0,63
PFOFI/ COFI₃₅₀ 75/25	0,36	16,71 ± 0,62	0,66	0,70

Conclusion

Le domaine de la valorisation de biodéchets, que ce soit à des fins énergétiques ou alimentaires, est en plein essor. Depuis quelques années, on connaît un regain d'intérêt pour le remplacement des dérivés pétrochimiques par des ressources renouvelables. A ceci, il faut ajouter un souci du respect de l'environnement de plus en plus présent dans les pays industrialisés et en voie de développement. La biomasse lignocellulosique représente une des ressources renouvelables les plus abondantes sur terre, et certainement une des moins coûteuses. Parmi ces dernières l'*Opuntia ficus-indica* (*OFI*) présente un grand potentiel biotechnologique, et sa valorisation soulève de grands enjeux économiques. Le but de ce travail était donc de proposer une méthode de valorisation de l'*OFI* en vue de lui apporter une plus haute valeur ajoutée qui consiste en sa bioconversion en acide lactique par *Lactobacillus plantarum*.

L'hydrolysat de BLC d'*OFI* est composé d'hexoses et de pentoses et son utilisation comme substrat de faible coût dans les industries est envisagée. Cependant, peu de microorganismes consomment efficacement les pentoses pour donner de l'acide lactique. Dans le but de fermenter ces pentoses tel que le xylose, un criblage a été réalisé et a permis de détecter une souche performante *Lactobacillus plantarum* capable de croître sur le xylose et de le fermenter en acide lactique.

Par la suite des traitements physicochimiques de la matière première d'*OFI* ont été réalisés. Pour ce faire, la poudre de cladodes d'*OFI* (COFI) a subi une hydrolyse afin de récupérer les sucres fermentescibles. L'hydrolyse est optimisée par la méthodologie de surface de réponse (MSR). Un modèle statistique Composite Centré (CCD) a été réalisé pour l'hydrolyse de COFI par l' H_3PO_4 . Des cultures en mode discontinu ont été réalisées sur l'hydrolysat acide enrichi en sels et en extrait de levure. Le maximum d'acide lactique obtenu est de 7,28 g/L. Un modèle box-behnken a été appliqué pour l'hydrolyse acide de COFI par l'HCl. Près de 6 g/L sont obtenus sur l'hydrolysat acide de COFI granulation 350 μ m (COFI₃₅₀). L'utilisation de l'hydrolysat issu de la combinaison de l'hydrolyse acide suivi d'une hydrolyse enzymatique de COFI₃₅₀ nous a permis d'améliorer la production de 43,28%. Enfin l'extrait de pelures de fruit d'*OFI* est très favorable à la croissance de *Lactobacillus plantarum* et à la production d'acide lactique. Les meilleures performances en termes d'acide lactique (23,66 g/L) de productivité (0,95 g/L.h) et de rendement (78%) sont obtenues.

En conclusion, ce travail a permis de mettre au point un procédé de valorisation de la matière lignocellulosique d'*OFI* pour la production d'acide lactique. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail permet d'envisager plusieurs perspectives d'investigations.

Les principales sont :

- Optimisation de la production d'acide lactique à partir de PFOFI;
- Enrichissement du milieu de culture par une source d'azote, de sels et des vitamines ;
- Tester des sources azotées moins onéreuses et leur effet sur la fermentation à partir des hydrolysats ;
- Utilisation de procédé de fermentation et saccharification simultanées pour un meilleur rendement.

Références bibliographiques

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., Hassan, S. E. D., Roushdy, M. M., Azab, M. S., & Gaber, M. A. (2019). Free-nutrient supply and thermo-alkaline conditions for direct lactic acid production from mixed lignocellulosic and food waste materials. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100-256.

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.

Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production—producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10), 49-74.

Abraham, A., Mathew, A. K., Park, H., Choi, O., Sindhu, R., Parameswaran, B., Pandey, A., Park, J.H., & Sang, B. I. (2020). Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 301, 122-725.

Ahmad, A., Banat, F., & Taher, H. (2020). A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges. *Environmental Technology & Innovation*, 101-138.

Al-Jawhari, I. F. H. (2020). Nanocellulose for Sustainable Future Applications. *Handbook of Nanomaterials and Nanocomposites for Energy and Environmental Applications*, 1-12.

Alexendri, M., Schneider, R., Mehlmann, K., & Venus, J. (2019). Recent advances in d-lactic acid production from renewable resources: case studies on agro-industrial waste streams. *Food technology and biotechnology*, 57(3), 293-304.

Alves, F. A. L., Andrade, A. B. D., Bruno, R. L. A., Santos, D. C. D., Magalhães, A. L. R., & Silva, D. S. S. (2017). Chemical and nutritional variability of cactus pear cladodes, Genera *Opuntia* and *Nopalea*. *American Journal of Food Technology*, 12(1), 25–34.

Amenaghawa, N. A., Ogbeide, S. E., & Okieimen, C. O. (2014). Application of statistical experimental design for the optimisation of dilute sulphuric acid hydrolysis of cassava Bagasse. *Acta Polytechnica Hungarica*, 11(9), 239-250.

- Anwar, M. M., & Sallam, E. M. (2016).** Utilization of prickly pear peels to improve quality of pan bread. *Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications*, 49(2), 151-163.
- AOAC. (2000).** *Official methods of analysis*, 17th ed. The Association of Official Analytical Chemists : Gaithersburg.
- Arba, M. (2009).** Le cactus opuntia une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc. **In : Actes du Symposium International AGDUMED-durabilité des systèmes de culture en zone méditerranéenne et gestion des ressources en eau et en sol.** Rabat, pp. 14-16.
- Ariffin, A. A., Soom, M. R., Boo, H. C., Loi, C. C., Chai, Y. H., & Abdulkarim, S. M. (2009).** Detection and determination of furfural in crude palm oil. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7(2), 136-138.
- Aruwa, C. E., Amoo, S. O., & Kudanga, T. (2018).** *Opuntia* (Cactaceae) plant compounds, biological activities and prospects—A comprehensive review. *Food Research International*, 112, 328-344.
- Asnam, A., Ali, A., & Omar, B. (2017).** Synthesis and application of a new biomaterial based on *Opuntia ficus indica* (cactus) in water treatment. *Algerian Journal of Engineering Research*, 1, 11-17.
- Astello-García, M. G., Cervantes, I., Nair, V., del Socorro Santos-Díaz, M., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F., Negre-Salvayreg, A., Rossignol, M., Cisneros-Zevallos, L., & de la Rosa, A. P. B. (2015).** Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia spp.* cultivars with different domestication gradient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 119-130.
- Ayadi, M. A., Abdelmaksoud, W., Ennouri, M., & Attia, H. (2009).** Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 40-47.
- Azizi, C., Hammi, H., Chaouch, M. A., Majdoub, H., & Mnif, A. (2019).** Use of Tunisian *Opuntia ficus-indica* cladodes as a low cost renewable admixture in cement mortar preparations. *Chemistry Africa*, 2(1), 135-142.
- Bakari, S., Daoud, A., Felhi, S., Smaoui, S., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2017).** Proximate analysis, mineral composition, phytochemical contents, antioxidant and antimicrobial activities and GC-MS investigation of various solvent extracts of cactus cladode. *Food Science and Technology*, 37, 286-293.
- Barba, F. J., Garcia, C., Fessard, A., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Aboudia, A., Ouadia, A., & Remize, F. (2020).** *Opuntia ficus indica* Edible Parts: A Food and Nutritional Security Perspective. *Food Reviews International*, 38(5), 930-952.
- Barbagallo, R. N., & Spagna, G. (1999).** Fatty acids determination from oil seeds of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. *Industrie Alimentari (Italy)*, 38, 815-817.

- Barbera, G. (1995).** History, economic and agro-ecological importance. In : Barbera, G., Inglese, P., & Pimienta-Barrios, P., *Agro-ecology cultivation and uses of cactus pear*, Vol. 132, *FAO plant production and protection paper*, pp. 1–11.
- Barka, N., Ouzaouit, K., Abdennouri, M., & El Makhfouk, M. (2013).** Dried prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes as a low-cost and eco-friendly biosorbent for dyes removal from aqueous solutions. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(1), 52-60.
- Baruah, J., Nath, B. K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D. C., & Kalita, E. (2018).** Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research*, 6, 141.
- Basak, B., Jeon, B. H., Kim, T. H., Lee, J. C., Chatterjee, P. K., & Lim, H. (2020).** Dark fermentative hydrogen production from pretreated lignocellulosic biomass: Effects of inhibitory by products and recent trends in mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 133, 110-338.
- Bensah, E. C., & Mensah, M. (2013).** Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: technologies and innovations. *International Journal of Chemical Engineering*, 2013, 21.
- Borchani, M., Yaich, H., Abbès, F., Blecker, C., Besbes, S., Attia, H., & Masmoudi, M. (2021).** Physicochemical, Functional and Antioxidant Properties of the Major Protein Fractions Extracted from Prickly Pear (*Opuntia ficus indica* L.) Seed Cake. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 1749-1760.
- Bouazizi, S., Montevecchi, G., Antonelli, A., & Hamdi, M. (2020).** Effects of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) peel flour as an innovative ingredient in biscuits formulation. *LWT- Food Science and Technology*, 124, 109-155.
- Boutakiout, A., Elothmani, D., Mahrouz, M., & Hanine, H. (2015).** Effect of season on proximate composition of cladode juice of two species of cactaceae. *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Reserch, New Delhi*, 3(1), 3.
- Bouzoubaâ, Z., Essoukrati, Y., Tahrouch, S., Hatimi, A., Gharby, S., & Harhar, H. (2016).** Phytochemical study of prickly pear from southern Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 155-161.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011).** Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research*, 2011.
- Brooijmans, R., Smit, B., Santos, F., Van Riel, J., de Vos, W. M., & Hugenholtz, J. (2009).** Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microbial cell factories*, 8(1), 1-11.

Brutsch, M. O., & Zimmermann, H. G. (1993). The prickly pear (*Opuntia ficus-indica* [Cactaceae]) in South Africa: Utilization of the naturalized weed, and of the cultivated plants. *Economic Botany*, 47(2), 154-162.

Calasso, M., Gobbetti, M. (2011). Lactic acid bacteria *Lactobacillus* spp.: Other species. **In:** Fuquay, J.W., *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed, Academic Press: San Diego, CA, USA, pp. 125–131.

Castellar, R., Obón, J. M., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2772-2776.

Cerezal, P., & Duarte, G. (2005). Some characteristics of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) harvested in the Andean altiplane of region 2 of Chile. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 7, 34-60.

Champagne, P., & Li, C. (2009). Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal wastewater treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars. *Bioresource technology*, 100(23), 5700-5706.

Chaouche, F. Z., & Abdul-Hussain, M. S. (2008). Contribution à l'étude de l'*Opuntia* et perspectives d'amélioration, dans le milieu steppique. *Agricultura*, 65(1-2).

Chiteva, R., & Wairagu, N. (2013). Chemical and nutritional content of *Opuntia ficus-indica* (L.). *African Journal of Biotechnology*, 12(21), 3309-3312.

Courtney P. D. (2000). *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris*. **In:** Robinson R. K., *Encyclopedia of food microbiology*, 1st ed. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 1166–1171.

Cubas-Cano, E., Venus, J., González-Fernández, C., & Tomás-Pejó, E. (2020). Assessment of different *Bacillus coagulans* strains for L-lactic acid production from defined media and gardening hydrolysates: Effect of lignocellulosic inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 323, 9-16.

Czyrski, A., & Jarzębski, H. (2020). Response surface methodology as a useful tool for evaluation of the recovery of the fluoroquinolones from plasma—The study on applicability of box-behnken design, central composite design and doehlert design. *Processes*, 8(4), 473.

Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., & Madani, K. (2014). *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 61, 31-40.

De Albuquerque, T. L., Júnior, J. E. M., de Queiroz, L. P., Ricardo, A. D. S., & Rocha, M. V. P. (2021). Polylactic acid production from biotechnological routes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 933-951.

De Farias, P. M., de Vasconcelos, L. B., da Silva Ferreira, M. E., Alves Filho, E. G., De Freitas, V. A., & Tapia-Blácido, D. R. (2020). Nopal cladode as a novel reinforcing and antioxidant agent for starch-based films: A comparison with lignin and propolis extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 614-626.

De Farias, P. M., de Vasconcelos, L. B., Ferreira, M. E., Pascall, M., & Tapia-Blácido, D. R. (2021). Nopal cladode (*Opuntia ficus-indica*) flour: Production, characterization, and evaluation for producing bioactive film. *Food Packaging and Shelf Life*, 29, 100-703.

De Oliveira, R. A., Rossell, C. E. V., Venus, J., Rabelo, S. C., & Maciel Filho, R. (2018). Detoxification of sugarcane-derived hemicellulosic hydrolysate using a lactic acid producing strain. *Journal of biotechnology*, 278, 56-63.

Demarigny, Y. (2014). *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris*. In: Batt, C.A., Tortorello, M.L., *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol. 2, Elsevier, London. pp. 442-446.

Diaz Gonzalez, D., & Morawicki, R. (2022). Lactic fermentation of grain sorghum: effect of variety and pretreatment on the production of lactic acid and biomass. *Journal of Food Science and Technology*, 59(3), 1221-1229.

Diboune, N., Nancib, A., Nancib, N., Aníbal, J., & Boudrant, J. (2019). Utilization of prickly pear waste for baker's yeast production. *Biotechnology and applied biochemistry*, 66(5), 744-754.

El-Beltagi, H. S., Mohamed, H. I., Elmelegy, A. A., Eldesoky, S. E., & Safwat, G. (2019). Phytochemical screening, antimicrobial, antioxidant, anticancer activities and nutritional values of cactus (*Opuntia ficus indica*) pulp and peel. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28, 1534-1551.

El-Kossori, R. L., Villaume, C., El Boustani, E., Sauvaire, Y., & Méjean, L. (1998). Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 52(3), 263-270.

El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., & Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879-14901.

El-Said, N. M., Nagib, A. I., Rahman, Z. A., & Deraz, S. F. (2011). Prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peels: chemical composition, nutritional value, and protective effects on liver and kidney functions and cholesterol in rats. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 5(1), 30-35.

Embadi, L., Nasernajad, B., Shokrgozar, S.T., Mehranian, M., Vahabzadeh, F., (2009). Optimization of withering time and fermentation conditions during the manufacture of black tea using a response surface methodology. *Chemistry and Chemical Engineering*, 16 (1), 61–68.

Ennouri, M., Fetoui, H., Bourret, E., Zeghal, N., & Attia, H. (2006). Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 1. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. *Bioresource Technology*, 97(12), 1382-1386.

Erliana, W. H., Widjaja, T., Altway, A., & Pudjiastuti, L. (2020). Synthesis of lactic acid from sugar palm trunk waste (*Arenga pinnata*): Preliminary hydrolysis and fermentation studies. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(5).

Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—A comprehensive review. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 367-392.

Fatma, S., Hameed, A., Noman, M., Ahmed, T., Shahid, M., Tariq, M., Sohail, I., & Tabassum, R. (2018). Lignocellulosic biomass: a sustainable bioenergy source for the future. *Protein and peptide letters*, 25(2), 148-163.

Fengel, D., & Wegener, G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure. *Reactions*, 613, 1960-1982.

Fernández-López, J. A., Castellar, R., Obón, J. M., & Almela, L. (2002). Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. *Chromatographia*, 56(9), 591-595.

Feugang MJ, Konarski P, Zou D, Stintzing FC, Zou C (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia spp.*) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2574- 2589.

Fukushima, K., Sogo, K., Miura, S., & Kimura, Y. (2004). Production of D-lactic acid by bacterial fermentation of rice starch. *Macromolecular Bioscience*, 4(11), 1021-1027.

Gaber, M. A., Abdel-Rahman, M. A., Hassan, S. E. D., & Azab, M. S. (2021). Efficient biorefinery process for lactic acid production from date wastes with alleviating substrate inhibition effect using thermo-alkaline repeated batch fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(3), 1053-1066.

Galati, E. M., Pergolizzi, S., Miceli, N., Monforte, M. T., & Tripodo, M. M. (2002). Study on the increment of the production of gastric mucus in rats treated with *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. cladodes. *Journal of ethnopharmacology*, 83(3), 229-233.

Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.

Garde, A., Jonsson, G., Schmidt, A. S., & Ahring, B. K. (2002). Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource technology*, 81(3), 217-223.

Grand View Research. (2021a). Lactic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By Raw Material (Sugarcane, Corn, Cassava), By Application (PLA, Food & Beverages, Personal Care, Pharmaceuticals), By Region, And Segment Forecasts, 2022 – 2030. Disponible sur : <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market> (consulté le : 29 Janvier 2022)

Grand View Research. (2021b). Lactic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By Raw Material (Sugarcane, Corn, Cassava), By Application (PLA, Food & Beverages), By Region, And Segment Forecasts, 2021 – 2028. Disponible sur : <https://www.marketresearch.com/Grand-View-Research-v4060/Lactic-Acid-Size-Share-Trends-14484166/> (consulté le : 29 Janvier 2022).

Griffith, M. P. (2004). The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany*, 91(11), 1915-1921.

Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L. W., A. D. L.Rodríguez., I. S. Fomsgaard., & A. P. B. de la Rosa. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia spp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 525-532.

Guo, W., Jia, W., Li, Y., & Chen, S. (2010). Performances of *Lactobacillus brevis* for producing lactic acid from hydrolysate of lignocellulosics. *Applied biochemistry and biotechnology*, 161(1), 124-136.

Habibi, Y., Heyraud, A., Mahrouz, M., & Vignon, M. R. (2004). Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research*, 339(6), 1119-1127.

Hamdi, M. (1997). Prickly pear cladodes and fruits as a potential raw material for the bioindustries. *Bioprocess Engineering*, 17(6), 387-391.

Hassan, F., El-Razek, A., & Hassan, A. A. (2011). Nutritional value and hypoglycemic effect of prickly cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit juice in alloxan-induced diabetic rats. *Australian Journal of basic and applied sciences*, 5(10), 356-377.

Hassan, S. E. D., Abdel-Rahman, M. A., Roushdy, M. M., Azab, M. S., & Gaber, M. A. (2019). Effective biorefinery approach for lactic acid production based on co-fermentation of mixed organic wastes by *Enterococcus durans* BP130. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101-203.

Hassan, S. S., Williams, G. A., & Jaiswal, A. K. (2018). Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 262, 310-318.

- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. E. (2018).** Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of chemicals. *FEMS microbiology letters*, 365(20), 213.
- Heer, D., & Sauer, U. (2008).** Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microbial biotechnology*, 1(6), 497-506.
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009).** Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 100(1), 10-18.
- Hooper, L. V., & Macpherson, A. J. (2010).** Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 159-169.
- Hui, L. X. D. S. F., & Wei, B. A. I. (2009).** Inhibition effect of red tetrazolium on cold rolled steel in H₃PO₄ solution. *Journal of Chinese Society for Corrosion and protection*, 29(6), 447-452.
- Issa, A. T., & Tahergorabi, R. (2019).** Milk bacteria and gastrointestinal tract: Microbial composition of milk. *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases*, 265-275.
- Iyer, P. V., Thomas, S., & Lee, Y. Y. (2000).** High-yield fermentation of pentoses into lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 86(4), 665-677.
- Jana, S. (2012).** Nutraceutical and functional properties of cactus pear (*Opuntia spp.*) and its utilization for food applications. *Journal of Engineering Research and Studies*, 3(2), 60-66.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2006).** Simultaneous saccharification and fermentation of cassava bagasse for L-(+)-lactic acid production using *Lactobacilli*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 134(3), 263-272.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2007).** Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(3), 524-534.
- 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.
- Khalid, K. (2011).** An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.

Kiran, E. U., Trzcinski, A. P., & Liu, Y. (2015). Enhancing the hydrolysis and methane production potential of mixed food waste by an effective enzymatic pretreatment. *Bioresource technology*, 183, 47-52.

Klotz, S., Kuenz, A., & Prüße, U. (2017). Nutritional requirements and the impact of yeast extract on the d-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus*. *Green Chemistry*, 19(19), 4633-4641.

Kosugi, A., Tanaka, R., Magara, K., Murata, Y., Arai, T., Sulaiman, O., Hashim, R., Aimi, O., Mohd, A., H., Khairul, A. Y. Mohd, Nor., Mohd, Y., Wan, A. I., & Mori, Y. (2010). Ethanol and lactic acid production using sap squeezed from old oil palm trunks felled for replanting. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(3), 322-325.

Kuloyo, O. O., Du Preez, J. C., del Prado García-Aparicio, M., Kilian, S. G., Steyn, L., & Görgens, J. (2014). *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(12), 3173-3183.

Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & engineering chemistry research*, 48(8), 3713-3729.

Kumar, R., Singh, S., & Singh, O. V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 35(5), 377-391.

Kumar, V., Yadav, S. K., Kumar, J., & Ahluwalia, V. (2020). A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment. *Bioresource technology*, 299, 122-633.

Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., & Dale, B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 124(1), 1081-1099.

Leardi, R. (2009). Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica chimica acta*, 652(1-2), 161-172.

LeBlanc, B. W., Eggleston, G., Sammataro, D., Cornett, C., Dufault, R., Deeby, T., & St. Cyr, E. (2009). Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7369-7376.

- Li, H., Kim, N. J., Jiang, M., Kang, J. W., & Chang, H. N. (2009).** Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid–acetone for bioethanol production. *Bioresource technology*, 100(13), 3245-3251.
- Litchfield, J.H. (2009).** Lactic acid, microbially produced. **In:** Schaechter, M. O., *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press, . Oxford. pp. 362–72.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. (2014).** Biodiversity of lactic acid bacteria. **In:** *Lactic acid bacteria*. Springer, Dordrecht. pp. 103-203
- López, A. D. (1995).** Use of the fruits and stems of the prickly pear cactus (*Opuntia spp.*) into human food. *Food Science and Technology International*, 1(2-3), 65-74.
- Lorenci Woiciechowski, A., Neto, C. J. D., de Souza Vandenberghe, L. P., de Carvalho Neto, D. P., Sydney, A. C. N., Letti, L. A. J., Karp, S.G., Zevallos Torres, L.A., & Soccol, C. R. (2020).** Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance–Conventional processing and recent advances. *Bioresource technology*, 304, 122-848.
- Loretta, B., Oliviero, M., Vittorio, M., Bojórquez-Quintal, E., Franca, P., Silvia, P., et Fabio, Z. (2019).** Quality by design approach to optimize cladodes soluble fiber processing extraction in *Opuntia ficus indica* (L.) Miller. *Journal of food science and technology*, 56(8), 3627-3634.
- Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. L., & Randall, Rose J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265– 275.
- Lüttge, U. (2004).** Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of botany*, 93(6), 629-652.
- Lüttge, U. (1993).** The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. *New Phytologist*, 125 (1), 59–71.
- Mäkelä, M. (2017).** Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review. *Energy Conversion and Management*, 151, 630-640.
- Malainine, M. E., Dufresne, A., Dupeyre, D., Mahrouz, M., Vuong, R., & Vignon, M. R. (2001).** Structure et morphologie des raquettes et des epines du figuier de barbarie. *Physical and Chemical News*, 4, 126-13.
- Malainine, M. E., Mahrouz, M., & Dufresne, A. (2005).** Thermoplastic nanocomposites based on cellulose microfibrils from *Opuntia ficus-indica* parenchyma cell. *Composites Science and Technology*, 65(10), 1520-1526.
- Manandhar, A., & Shah, A. (2020).** Techno-economic analysis of bio-based lactic acid production utilizing corn grain as feedstock. *Processes*, 8(2), 199.

- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Gonzalez, 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.
- Maurya, D. P., Singla, A., & Negi, S. (2015).** An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *Biotech*, 5(5), 597- 609.
- Medina, E. D., Rodríguez, E. R., & Romero, C. D. (2007).** Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food chemistry*, 103(1), 38-45.
- Méndez, L. P., Flores, F. T., Martín, J. D., Rodríguez, E. M. R., & Romero, C. D. (2015).** Physicochemical characterization of cactus pads from *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica*. *Food chemistry*, 188, 393-398.
- Miller, G. L. (1959).** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Mohamed-Yasseen, M. Y., Barringer, S. A., Splittstoesser, W. E., & Schnell, R. J. (1995).** Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. *Plant cell, tissue and organ culture*, 42(1), 117-119.
- Moldes, A. B., Torrado, A., Converti, A., & Dominguez, J. M. (2006).** Complete bioconversion of hemicellulosic sugars from agricultural residues into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 135(3), 219-227.
- Moon, S. K., Wee, Y. J., & Choi, G. W. (2012).** A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. *Journal of bioscience and bioengineering*, 114(2), 155-159.
- Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., & López-Gómez, J. P. (2020).** Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation*, 6(1), 23.
- Moreno-Álvarez, M. J., Hernández, R., Belén-Camacho, D. R., Medina-Martínez, C. A., Ojeda-Escalona, C. E., & García-Pantaleón, D. M. (2009).** Making of bakery products using composite flours: Wheat and cactus pear (*Opuntia boldinghii* Britton et Rose) stems (cladodes). *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 11, 78-87.
- Mounir, B., Asmaa, M., Abdeljalil, Z., & Abdellah, A. (2020).** Physico-chemical changes in cladodes of *Opuntia ficus-indica* as a function of the growth stage and harvesting areas. *Journal of Plant Physiology*, 251, 153-196.
- Mozzi, F., (2016).** Lactic Acid Bacteria, In: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 501–508.

Mueller-Harvey, I., & Baker, R. M. (2002). *Chemical Analysis in the Laboratory: A Basic Guide*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.

Nancib, A., Diboune, N., Nancib, N., & Boudrant, J. (2017). Statistical optimization of dilute acid hydrolysis of wood sawdust for lactic acid production. *Applied Biotechnology & Bioengineering*, 4(1), 502–509.

Nancib, A., Nancib, N., & Boudrant, J. (2009). Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8), 1423-1429.

Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., & Srivastava, A. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of Biotechnology*, 7(2), 167-178.

Navarrete-Bolaños, J. L., Fato-Aldeco, E., Gutiérrez-Moreno, K., Botello-Álvarez, J. E., Jiménez-Islas, H., & Rico-Martínez, R. (2013). A strategy to design efficient fermentation processes for traditional beverages production: prickly pear wine. *Journal of food science*, 78(10), 1560-1568.

Nebache, S., Chibani, A., Chadli, R., & Bouznad, A. (2009). Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. *African Journal of Biotechnology*, 8, 1623–1624.

Neureiter, M., Danner, H., Madzingaidzo, L., Miyafuji, H., Thomasser, C., Bvochora, J., Miyafuji, H., Thomasser, C., Bvochora, J., Bamusi, S., & Braun, R. (2003). Lignocellulose feedstocks for the production of lactic acid. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 18(1), 55-64.

Nobel, P.S. (2002). Cacti: biology and uses. In : *University of California Press*, Berkeley, California, USA.

Ojeda-Linares, C. I., Vallejo, M., Lappe-Oliveras, P., & Casas, A. (2020). Traditional management of microorganisms in fermented beverages from cactus fruits in Mexico: an ethnobiological approach. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 16(1), 1-12.

Okolie, J. A., Nanda, S., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2021). Chemistry and specialty industrial applications of lignocellulosic biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 12(5), 2145-2169.

Orla-Jensen, S. (1919). The lactic acid bacteria. *Host*, 3(2).

Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N. Q., & Hahn-Hägerdal, B. (1999). Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnology and bioengineering*, 63(1), 46-55.

Panasuriya, R. C., & Singhal, R. S. (2010). Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 164-172.

- Papagianni, M. (2012).** Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), 201-210.
- Patel, M., Ou, M., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (2004).** Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to L (+)-lactic acid by a thermotolerant acidophilic *Bacillus sp.* *Biotechnology letters*, 26(11), 865-868.
- Pensamiento-Niño, C. A., Campos-Montiel, R. G., Añorve-Morga, J., Ramírez-Moreno, E., Ascacio-Valdés, J. A., & Hernández-Fuentes, A. D. (2021).** Nutritional Characterization of the Functional and Antioxidant Activity of Cactus Flowers from Hidalgo, Mexico. *Applied Sciences*, 11(13), 59-65.
- Piga, A. (2004).** Cactus pear: a fruit of nutraceutical and functional importance. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 6, 9-22.
- Pimienta-Barrios, E. (1994).** Prickly pear (*Opuntia spp.*): a valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. *Journal of Arid Environments*, 28(1), 1-11.
- Pimienta-Barrios, E., Barbera, G., Inglese, P., (1993).** Cactus pear (*Opuntia spp.*, Cactaceae) International Network: an effort for productivity and environmental conservation for arid and semi-arid lands. *Cactus and Succulent Journal*, 65, 225–229.
- Ramadan, M. F., & Mörsel, J. T. (2003).** Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica L.*). *Food chemistry*, 82(3), 339-345.
- Retamal, N., Durán, J. M., & Fernández, J. (1987).** Ethanol production by fermentation of fruits and cladodes of prickly pear cactus [*Opuntia ficus-indica (L.) Miller*]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40(3), 213-218.
- Reyes-Agüero, J. A., Aguirre-Rivera, J. R., & Hernández, H. M. (2005).** Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica (L.) Mill.* (Cactaceae). *Agrociencia*, 39(4), 395-408.
- Rocchetti, G., Pellizzoni, M., Montesano, D., & Lucini, L. (2018).** Italian *Opuntia ficus-indica* cladodes as rich source of bioactive compounds with health-promoting properties. *Foods*, 7(2), 24.
- Romo-Buchelly, J., Rodríguez-Torres, M., & Orozco-Sánchez, F. (2019).** Biotechnological valorization of agro industrial and household wastes for lactic acid production. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 113-127.
- Russell, C. E., & Felker, P. (1987).** The prickly-pears (*Opuntia spp.*, Cactaceae): A source of human and animal food in semiarid regions. *Economic Botany*, 41(3), 433-445.

- Sadok, T., Aid, F., Doumandji, A., & Bellal, M. (2014).** Effet du jus de cladodes d'*Opuntia ficus indica* sur la fermentation du lait et la croissance des bactéries lactiques et probiotiques. *Nature & Technology*, (11), 17.
- Saeed A, H., & Salam A, I. (2013).** Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 4 (11).
- Saenz, C. (2000).** Processing technologies: an alternative for cactus pear (*Opuntia spp.*) fruits and cladodes. *Journal of Arid Environments*, 46(3), 209-225.
- Saenz, H. (2006).** Composés fonctionnels des figues de Barbarie (*Opuntia spp.*). *Sciences des aliments*, 26(3), 259-265.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., & Branduardi, P. (2008).** Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in biotechnology*, 26(2), 100-108.
- Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C. K., & Marx, H. (2017).** The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production. *Trends in biotechnology*, 35(8), 756-769.
- Sawaya, W. N., Khalil, J. K., & Al-Mohammad, M. M. (1983).** Nutritive value of prickly pear seeds, *Opuntia ficus-indica*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 33(1), 91-97.
- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D., & Fischer, W. (1985).** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and applied microbiology*, 6(2), 183-195.
- Selim, M. T., Salem, S. S., Fouda, A., El-Gamal, M. S., & Abdel-Rahman, M. A. (2021).** Use of Corn-Steep Water Effluent as a Promising Substrate for Lactic Acid Production by *Enterococcus faecium* Strain WH51-1. *Fermentation*, 7(3), 111.
- Shafiei, M., Kumar, R., Karimi, K. (2015).** Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: Karimi, K., *Lignocellulose-Based Bioproducts*. *Biofuel and Biorefinery Technologies*, vol 1. Springer international publishing, pp. 85.
- Sharma, A., Mukherjee, S., Tadi, S. R. R., Ramesh, A., & Sivaprakasam, S. (2021).** Kinetics of growth, plantaricin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic *Lactobacillus plantarum* CRA52. *LWT- Food Science and Technology*, 139, 110744.
- Sharma, V., & Mishra, H. N. (2014).** Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1123-1128.
- Silva, M. A., Albuquerque, T. G., Pereira, P., Ramalho, R., Vicente, F., Oliveira, M.B.P., & Costa, H. S. (2021).** *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.: A multi-benefit potential to be exploited. *Molecules*, 26(4), 951.

- Singhvi, M., Joshi, D., Adsul, M., Varma, A., & Gokhale, D. (2010).** D (-)Lactic acid production from cellobiose and cellulose by *Lactobacillus lactis* mutant RM2-2 4. *Green Chemistry*, 12(6), 1106-1109.
- Smerilli, M., Neureiter, M., Wurz, S., Haas, C., Frühauf, S., & Fuchs, W. (2015).** Direct fermentation of potato starch and potato residues to lactic acid by *Geobacillus stearothermophilus* under non-sterile conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(4), 648-657.
- Sreenath, H. K., Moldes, A. B., Koegel, R. G., & Straub, R. J. (2001).** Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(6), 518-523.
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Casimir C. A., Bunch, R., & Felker, P. (2005).** Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia spp.*) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 442-451.
- Sutton, B. G., Ting, I. P., & Sutton, R. (1981).** Carbohydrate metabolism of cactus in a desert environment. *Plant Physiology*, 68(3), 784-787.
- Tailliez, P. (2004).** Les lactobacilles: propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques*, 6(1), 35-41.
- Tamine, M., Nancib, A., Nancib, N., et Boudrant, J. (2018).** Prickly pear cactus as a raw material for lactic acid production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 14(1), 16-24.
- Tanaka, K., Komiyama, A., Sonomoto, K., Ishizaki, A., Hall, S., & Stanbury, P. (2002).** Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(1), 160-167.
- Taskila, S. & Ojamo, H. (2013).** The current status and future expectations in industrial production of lactic acid by lactic acid bacteria. In: Kongo, M., *Lactic Acid Bacteria, R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, Rijeka, Croatia, pp. 615–632.
- Taylor, A. C. C. K. (1996).** A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56, 49–58.
- Thomas, L., Parameswaran, B., & Pandey, A. (2016).** Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus sp.* for bioethanol production. *Renewable Energy*, 98, 9-15.

- Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2011).** Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. **In :** Pandey, A. Larroche, C. Ricke, S., Claude, G.C., Gnansounou, E., *Alternative Feedstocks and Conversion, Biofuels, Academic Processes*, pp. 149–176.
- Ventura-Aguilar, R. I., Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños, S., & Rivera-Cabrera, F. (2017).** Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): Anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(15), 5065-5073.
- Verardi A., De Bari I., Ricca E., Calabrò V. (2012).** Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. **In :** *Bioethanol*. London, United Kingdom, pp. 95-123.
- Vilà, M., Burriel, J. A., Pino, J., Chamizo, J., Llach, E., Porterias, M., & Vives, M. (2003).** Association between *Opuntia* species invasion and changes in land-cover in the Mediterranean region. *Global Change Biology*, 9(8), 1234-1239.
- Wang, X. M., Wang, Q. H., Ren, N. Q., & Wang, X. Q. (2005).** Lactic acid production from kitchen waste with a newly characterized strain of *Lactobacillus plantarum*. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 19(4), 383-389.
- Wee, Y. J., Yun, J. S., Park, D. H., & Ryu, H. W. (2004).** Biotechnological production of L (+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Biotechnology letters*, 26(1), 71-74.
- Xiu, S., Zhang, B., Shahbazi, A., 2011.** Biorefinery processes for biomass conversion to liquid fuel. **In:** Aurelio, M., Dos Santos Bernardes, D. S., *Biofuel's Engineering Process Technology*, pp. 167–190.
- Yáñez, R., Moldes, A. B., Alonso, J. L., & Parajó, J. C. (2003).** Production of D (–)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Biotechnology letters*, 25(14), 1161-1164.
- Zanellati, A., Spina, F., Bonaterra, M., Dinuccio, E., Varese, G. C., & Scarpeci, T. E. (2021).** Screening and evaluation of phenols and furans degrading fungi for the biological pretreatment of lignocellulosic biomass. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 161, 105-246.
- Zhang, Y., & Vadlani, P. V. (2013).** D-lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(12), 1897-1904.
- Zhang, Z., Li, Y., Zhang, J., Peng, N., Liang, Y., & Zhao, S. (2020).** High-titer lactic acid production by *Pediococcus acidilactici* PA204 from corn stover through fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Microorganisms*, 8(10), 1491.

Zheng, J., & Rehmann, L. (2014). Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *International journal of molecular sciences*, 15(10), 18967-18984.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., Toole, P. W.O., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858.

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in energy and combustion science*, 42, 35-53.

Zu, S., Li, W. Z., Zhang, M., Li, Z., Wang, Z., Jameel, H., & Chang, H. M. (2014). Pretreatment of corn stover for sugar production using dilute hydrochloric acid followed by lime. *Bioresource technology*, 152, 364-370.

Annexes

Annexe 1 : Milieu MRS Man, Rogosa et Sharpe, 1960 (1000ml d'eau distillée)

Composition	Quantité (g/L)
Peptone	10
Extrait de levure	5
Acétate de sodium	5
Extrait de Viande	8
Phosphate bipotassique	2
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de manganèse	0,1
Sulfate de manganèse	0,05
Glucose	20
Tween 80	1 ml

Milieu Elliker (Elliker, 1956)

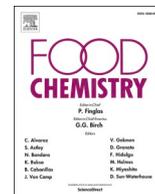
Composition	Quantité (g/L)
Tryptone	20
Extrait de levure	5
Acétate de sodium	1,5
Lactose	5
Sacchose	5
Glucose	5
Acétate de sodium	1,5
Acide ascorbique	0,5

Annexe 2 : Appareils utilisés dans les différentes sections de la méthodologie

Appareils	Fournisseur
Agitateur magnétique	<i>Spectronic 20 Genesys</i>
Appareil du café	<i>ENIAM</i>
Autoclave	<i>SELECTA</i>
Balance	<i>OHAUS</i>
Balance de précision	<i>Kern ALJ 220-4M</i>
Centrifugeuse	<i>Hettich EBA 12</i>
Centrifugeuse	<i>Sigma 3-16 PK</i>
Etuve	<i>Memmert UF55</i>
Four	<i>Nabertherm</i>
High-performance liquid chromatographie	<i>Hitachi L-2490</i>
Incubateur	<i>New Brunswick Scientific</i>
pH mètre	<i>PH M 210MeterLab</i>
spectrophotomètre	<i>Spectronic 20 Genesys</i>
spectrophotomètre à absorption atomique	<i>PerkinElmer AAnalyte</i>
Vortex	<i>Stuart, Biocote</i>

Produits chimiques utilisés dans les différentes sections de la méthodologie

Produit	Fournisseur
MRS	<i>Conda</i>
Glucose	<i>Sigma-Aldrich</i>
K ₂ HPO ₄	<i>Sigma-Aldrich</i>
Tween 80	<i>Sigma-Aldrich</i>
D(+)-Xylose	<i>Sigma-Aldrich</i>
Extrait de levure	<i>Sigma-Aldrich</i>
Sodium acetate trihydrate (CH ₃ COONa)	<i>Sigma-Aldrich</i>
MnSO ₄	<i>Prolabo</i>
MgSO ₄	<i>Merck</i>
Acide sulfurique 96 %	<i>Sigma-Aldrich</i>
Acide Chloridrique 32%	
Acide phosphorique 50%	
Extrait de levure	<i>Sigma-Aldrich</i>
Glycérol	<i>Prolabo</i>
KH ₂ PO ₄	<i>Sigma-Aldrich</i>
NaOH	<i>Sigma-Aldrich</i>
5 hydroxyméthyl -2- furaldehyde C ₆ H ₆ O ₃	<i>TCI</i>
P-toluidine C ₇ H ₉ N	<i>Sigma-Aldrich</i>
2-propanol	<i>Honeywell</i>
Acide barbiturique C ₄ H ₄ N ₂ O ₃	<i>Sigma-Aldrich</i>
Acide acétique	<i>Sigma-Aldrich</i>
Xylose	<i>Sigma-Aldrich</i>
Cellulase, <i>Trochoderma reesei</i> ATCC 26921	<i>I.U.B.:3.2.1.4 Worthing Biochemical Corporation</i>



Opuntia ficus indica waste as a cost effective carbon source for lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*

Besma Derabli^a, Aicha Nancib^{a,*}, Nabil Nancib^a, Jaime Aníbal^{b,c}, Sara Raposo^c, Brigida Rodrigues^c, Joseph Boudrant^d

^a Laboratory of Applied Microbiology, Ferhat Abbas University, Setif 1, Algeria

^b Department of Food Engineering, Institute of Engineering, Campus da Penha, 8005-139, Portugal

^c CIMAR – Centre for Marine and Environmental Research, FCT, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

^d Laboratory Reactions and Process Engineering, UMR CNRS 7224, University of Lorraine, ENSAIA, 2, avenue de la forêt de Haye, TSA 40602 54518 Vandoeuvre Cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Lactic acid
Fermentation
Opuntia ficus indica
Response surface methodology
Lactobacillus plantarum
Thermo-acid pretreatment
Enzymatic hydrolysis

ABSTRACT

Opuntia ficus indica (OFI) waste was evaluated as a fermentation feedstock for lactic acid production using *Lactobacillus plantarum*.

Dilute acid pretreatment of the OFI cladodes (OFIC) was performed for extracting maximum fermentable sugars by optimizing process parameters using statistical optimization method. The best results were obtained with HCl 1% (v/v), temperature 120 °C, residence time 40 min, granulation 350 μm and substrate loading 5% (w/v), the sugar concentration reached 24 g/L with low concentration of hydroxymethylfurfural. The feasibility of producing lactic acid from OFI fruit peel (OFIFP) as a source of carbon was also investigated. *Lactobacillus plantarum* was shown to have a capacity for lactic acid production from OFIC₃₅₀ (granulation 350 μm) hydrolysate and OFIFP extract without detoxification. The highest lactic acid yields of 0.46 and 0.78 g/g were obtained from enzymatic hydrolysate of pretreated OFIC₃₅₀ and OFIFP extract, respectively.

1. Introduction

The effective valuation of agricultural wastes for the production of high value-added products, such as lactic acid, has expanded rapidly using modern biotechnology tools and non-polluting bioprocess technologies. Lactic acid (LA), or 2-hydroxypropionic acid (CH₃CHOH-COOH), is considered as one of the main well-known organic acids with wide range of industrial applications (food, chemicals, cosmetic and pharmaceutical industries). The molecule has an asymmetric carbon and has two optical isomers: L (+) Lactic acid and D (-) Lactic acid.

Lactic acid is produced industrially either by chemical synthesis or by microbial fermentation. Approximately 90% of the total lactic acid produced worldwide is made by bacterial fermentation. It is one of the most widely used food acidulant and a common substrate for chemical synthesis.

It has been estimated that global demand for lactic acid will rise from 1220.0 kilotons in 2016 to 1960.1 kilotons by 2025 due, in large part, to increased demand for green products derived from lactic acid, such as polylactic acid (Alves de Oliveira, Komesu, Vaz Rossell & Maciel Filho,

2018). Nevertheless, a big difficulty in the fermentation process is the high cost of the raw materials used as sources of energy and carbon, mainly refined sugars, representing an important operational cost. The eco-friendly processing and fermentable capability of many of the agricultural and agro-industrial based raw materials, such as dates waste, makes them attractive candidates in fermentation biotechnology to produce lactic acid (Nancib, Nancib, Boubendir & Boudrant, 2015). By selecting the right microorganism, it is possible to obtain through fermentation of these sugars a wide range of metabolites that have useful applications as chemical intermediates, which can be converted to high-value products.

Nowadays, lignocellulosic materials from agricultural, agro-industrial, and forestry sources represent a potentially inexpensive and renewable carbohydrate feedstock for the large-scale fermentation of lactic acid due to their abundance, low price, high polysaccharide content, and renewability. Furthermore, the complex nature of lignocellulosic biomass consisting of different polysaccharides (mainly cellulose, hemicelluloses) and an aromatic polymer (lignin), constitute an obstacle for the fermentation. The cellulose, the most abundant lignocellulosic

* Corresponding author.

E-mail address: nancibaicha@yahoo.fr (A. Nancib).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131005>

Received 28 March 2021; Received in revised form 1 August 2021; Accepted 29 August 2021

Available online 1 September 2021

0308-8146/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

biomass polymer, consists of β -D-glucopyranose units linked via β -(1,4) glycosidic bonds, with cellobiose as the fundamental repeating unit. The cellulose chains made up of 500–1400 D-glucose units are arranged together to form microfibrils, which are packed together to form cellulose fibrils (Zoghalmi & Pães, 2019). The hemicellulose is a heterogeneous polysaccharide in biomass, it is composed of five carbon sugar polymers xylan and arabinan, and six carbon sugar polymers mainly mannan, galactan, rhamnan and glucan. Xylan is generally the largest portion of hemicellulose and the primary source of five carbon monosaccharide, xylose. The lignin is the second most abundant polymer in lignocellulosic biomass after cellulose. It is a very complex amorphous heteropolymer of phenylpropanoid building units (*p*-coumaryl, coniferyl, and sinapyl alcohol). Lignin is responsible for hydrophobicity and structural rigidity. It binds hemicelluloses to cellulose in the cell wall (Scelsi, Angelini & Pastore, 2021).

Since natural lactic acid bacteria (LAB) cannot directly hydrolyse and ferment polysaccharides present in lignocellulose, some form of pretreatment prior to enzymatic hydrolysis and fermentation are required. In the last few years, a significant attention has been paid to new carbon sources to produce different metabolites. *Opuntia ficus indica* (OFI), can be a suitable crop for these types of applications.

Opuntia ficus-indica (OFI) L. Mill. is commonly known as prickly pear, Indian fig *Opuntia*, barbary fig and belongs to the dicotyledonous angiosperm Cactaceae family. It is a drought-resistant plant commonly found worldwide in arid and semi-arid regions.

The semi arid regions of the central part of Mexico host the greatest diversity of this cactus in the world. This plant can also be found in all American hemispheres and grows worldwide, such as Africa, Australia and the Mediterranean basin (Silva et al., 2021). Because of the trend of Mediterranean area towards global desertification and decline of water resources, OFI has an interesting potential as fruit and vegetative crop (Filannino et al., 2016).

OFI produces edible tender stems (cladodes) and fruits with a high nutritional value in terms of minerals, protein, dietary fiber and phytochemicals. In general, fruits consist of a thick peel, with small prickles, and the pulp contains the seeds which account for approximately 10–15% of the edible pulp. (Cota-Sánchez, 2016).

The fruit of OFI is usually consumed fresh. On the other hand, according to reports, the discarded outer coating (peel) of this fruit constitutes nearly 45 to 50% of its total weight (Elkady, Bishr, Abdel-Aziz & Salama, 2020).

Due to the high annual productivity of biomass per hectare (10–40 tones dry weight), cladodes represent a cheap and suitable substrate for functional foods or dietary supplements.

With high concentration of sugar, OFI offers a potential substrate for fermentation processes (Kuloyo & al., 2014; Tamine, Nancib, Nancib & Boudrant, 2018; Diboune et al., 2019).

The present research aimed to investigate the use of OFI wastes as cheap raw substrates for lactic acid production using *Lactobacillus plantarum* without additional nutrients. Optimization of dilute acid hydrolysis of cladode powder was carried out using an experimental design strategy. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) procedure of cladodes pretreated with dilute acid was evaluated as feedstock to produce lactic acid.

The ability of this strain in using OFI fruit peels as carbon source for lactic acid production was further tested.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

Fruits of OFI were harvested in the month of September from a prickly pear cactus farm outside Constantine (Ouled Rahmoune, Algeria). The wastes from the recovered prickly pear fruits were weighed, before and after being peeled, to calculate the percentage of edible portion. The seeds were separated, washed with water and dried

at room temperature to calculate the percentage of seeds in the edible fraction.

2.1.1. OFI cladodes (OFIC)

The cladodes were washed with running tap water, and excess humidity was removed with absorbing paper. The cladodes were cut manually with a knife into small cubes and dried for 48 h at 60 °C in a ventilated oven. The dried samples were milled into a powdery form in a spice grinder for a few minutes, sieved through 450, 350 and 250 μ m sieves and stored at room temperature until further use.

2.1.2. OFI fruit peels (OFIFP)

Fruit peels were cut into small pieces and dried in a ventilated oven at 60 °C for 72 h. This was followed by grinding of the dried peels for a few minutes in a domestic coffee grinder. The grinded samples were sieved in sieve of 460 μ m and stored at room temperature until further use.

2.2. Hydrolysis of OFI cladodes (OFIC)

2.2.1. Optimization of the dilute acid hydrolysis of OFIC

Based on the preliminary one-factor-at-a-time experiments, variables such as hydrochloric acid concentration, temperature of reaction, hydrolysis time, granulation of cladode powder and substrate loading were identified to have strong effects on the hydrolysis treatment. Therefore, these factors were selected as the variables tested in the 46-run Box-Behnken design experiment. The hydrochloric acid concentration (X_1) range was 1–5% (v/v), the hydrolysis temperature (X_2) range was 60–120 °C, the hydrolysis time (X_3) range was 25–45 min, the granulation (X_4) range was 250–450 μ m and the substrate loading (X_5) range was 5–15% (w/v). After acid hydrolysis, the solid residue was separated by centrifugation at 3076g for 20 min and the pH of the resulting supernatant was adjusted to 6.

Once the optimized condition for OFIC acid hydrolysis was selected, quantification and identification of the total and reducing sugars present was carried out, by HPLC, as described in “Analytical Methods”. The sugars present in the sample without any pretreatment were also quantified.

2.2.2. Enzymatic hydrolysis of OFIC₃₅₀

Enzymatic hydrolysis of OFIC₃₅₀ was investigated using a dilute acid as a pretreatment. The dilute acid pretreated OFIC₃₅₀ slurry was used without separating the liquid fraction from the solid fraction. Following dilute acid pretreatment, the temperature of the slurry was decreased to 47 °C and the pH adjusted to 4.5 with NaOH. Enzymatic hydrolysis was performed by adding the cellulase (EC3.2.1.4, USA) at enzyme loading of 40 IU/g of the dry substrate for 24 h. Total and reducing sugars was quantified and identified by HPLC, as described in “Analytical Methods”.

2.3. Extraction of OFI fruit peels sugar

The substrate pretreatment protocols have been described in our previous study (Diboune et al., 2019). For extraction of the sugars from the peels, the samples were subjected to heat treatment with hot air at 150 °C with substrate loading 15% (w/v) in an Universal Oven UF55 (Memmert, Schwabach, Germany) with an incubation time of 1 h. The peel extract obtained was filtered and centrifuged at 3076g for 20 min in order to separate the debris, while the supernatant was used essentially as the carbon source in the fermentation medium. Total and reducing sugars was quantified and identified by HPLC, as described in “Analytical Methods”.

All determinations were done in triplicate and the mean value was reported.

2.4. Media and growth conditions

Lactobacillus plantarum was isolated from Algerian raw camel milk. The stock cultures were maintained in MRS growth medium with 20% (v/v) glycerol at -20°C .

The inoculum was prepared by transferring glycerol stock culture (1 mL) to an Erlenmeyer flask containing 100 mL of MRS medium. MRS growth medium composition (g/L): peptone (10.0), yeast extract (5.0), meat extract (10.0), glucose (20.0), sodium acetate (5.0), ammonium citrate (2.0), K_2HPO_4 (5.0), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2) and $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.05). Incubation temperature was 37°C for 10 h (time needed for the microorganism to reach the exponential growth phase) on a rotary shaker (New Brunswick, USA) at 150 rpm. Then, the culture containing the production medium was inoculated.

Different sources of carbon were tested for their influence on the growth of *Lactobacillus plantarum*: modified MRS (mMRS) containing xylose (20 g/L) instead of glucose; mMRS containing a mixture of glucose (10 g/L) and xylose (10 g/L) (Sigma); OFIC hydrolysate; and OFIFP extract.

Fermentations were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL cultivation medium, where 10% (v/v) inoculation was used. The pH of the fermentation medium was adjusted to 6 and fermentation was carried out at 37°C with an agitation of 150 rpm for 24 h.

The effect of initial sugar concentration of OFIFP extract (varying from 2 to 8% (w/v)) on lactic acid production was tested.

2.5. Analytical methods

Growth and monitoring of *Lactobacillus plantarum* culture were done by the measurement of absorbance using a spectrophotometer at 650 nm.

Titrateable acidity was measured according to the AOAC method 942.15 (AOAC, 2000). Acidity of samples was titrated using a 0.1 N NaOH solution (Sigma-Aldrich). Results were expressed as % citric acid = $[(C_b \cdot V_b \cdot \text{mEq citric acid})/W]$, where C_b was the concentration of NaOH; V_b , the volume of NaOH used for titration; W , the weight of sample; and mEq, the citric acid milliequivalents (0.064).

2.5.1. Lactic acid determination

Lactic acid was determined using a simple calorimetric assay according to Taylor (1996) by using H_2SO_4 (98%), CuSO_4 (4% w/v) and p-phenyl phenol (1.5% w/v in 95% ethanol) in the supernatant. This method is based on the oxidation of lactic acid to acetaldehyde in the presence of concentrated sulphuric acid, which subsequently forms a chromogenic complex with p-phenyl phenol in presence of copper sulphate. The absorbance of samples was measured at 570 nm. The concentration of lactic acid was determined from standard curve drawn using pure lactic acid.

2.5.2. Protein contents

The protein concentrations were determined using the Lowry method with bovine serum albumin as the standard (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). The Lowry method is based on the reactivity of the peptide nitrogen with the copper ions (Cu^{2+}) under alkaline conditions and the subsequent reduction of the Folin-Ciocalteu phosphomolybdic-phosphotungstic acid to heteropolymolybdenum blue by the copper-catalyzed oxidation of aromatic amino acids (tyrosine and tryptophan). The absorbance was measured at 750 nm.

2.5.3. Atomic absorption spectroscopy (AAS)

The Ca, Mg, K and Mn, contents were analyzed by Flame Atomic Absorption spectrometry (AAS) after wet acid digestion with HNO_3 and H_2O_2 . 1 g of homogenized dry sample was digested sequentially with H_2O_2 and concentrated HNO_3 (grade AAS) and the measurements were performed using a PerkinElmer® AAnalyst™ 800 Atomic Absorption

Spectrophotometer.

The atomic absorption spectroscopy methods for the determination of calcium, magnesium, potassium and manganese were already validated in the laboratory for other matrixes for routine analysis but the interference of endogenous compounds of this specific matrix was accessed with recovery tests and standard additions method (Table S1). The recoveries ranged from 92 to 105% with the standard addition's method. The linear range of the calibration curves and the average correlation coefficient (R^2) is also presented (Table S1). Overall, the intra- and inter-day precision was calculated with internal quality control standards running at the beginning and end of each analytical run. The Limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) are also presented in Table S1.

2.5.4. Determination of phosphorus

Total phosphorus was determined after preparation of the sample by the dry-ashing procedure 968.08 and analyzed according to the colorimetric ammonium-vanadomolybdate method at 420 nm (Mueller-Harvey & Baker, 2002).

2.5.5. Determinations of sugars, Furfural and HMF

Reducing sugars present in the OFI juice used in fermentation experiments were measured by the DNS method of Miller (1959). The qualitative and quantitative determination of sugars generated was conducted by high-performance liquid chromatography (HPLC). To test for the presence of fermentation inhibitors the standard inhibitors such as furfural and HMF were analysed by HPLC.

The samples were prepared for HPLC analysis. They were previously centrifuged at 13,400g for 10 min, filtered through a 0.2- μm membrane filter and stored at -20°C .

Analyses were performed using a high-performance liquid chromatography (Hitachi LaChrom Elite HPLC, Japan) equipped with a refractive index detector (Hitachi L-2490, Japan). An Aminex HPX-87H column with 9- μm particle size (Biorad, USA) was used with an isocratic elution of 5 mM H_2SO_4 at 50°C .

The runs were performed at a flow rate of 0.6 mL/min with an analysis duration time of 40 min. The injection volume was set at 20 μL . Quantification was performed against calibration using fructose, glucose, arabinose, galactose, xylose and maltose as external standards at concentrations of 0.2–5.0 g/L. Coefficients of determination (R^2) were >0.996 and results were expressed as g/L. Recovery trials performed under the same operating conditions were in all cases on the order of 94–99%. The quantification of furfural and HMF was performed with a calibration curve using these compounds as external standards at concentrations of 0.01 – 0.5 g/L. Coefficients of determination (R^2) were >0.994 and results were expressed as g/L. Recovery trials performed under the same operating conditions were in all cases on the order of 96%. A five point calibration curve was plotted for each component.

The moisture content of the raw OFI was estimated according to the AOAC method 934.01 (AOAC, 2000).

2.6. Kinetic parameters

The yield ($Y_{p/s}$) of LA-based on the consumed sugar is defined as the ratio of LA produced (g/L) to the amount of consumed sugar (g/L). LA productivity (δ) (g/L.h) was calculated as the ratio of LA concentration (g/L) to the fermentation time at which the maximum LA concentration was obtained.

The specific growth kinetic (μ), the productivity (δ) and lactic acid yield ($Y_{p/s}$) were described as follows:

$$\mu = \frac{dOD}{dt} \cdot \frac{1}{OD} \quad (1)$$

$$\delta = \frac{P - P_0}{d} \quad (2)$$

$$Y_{p/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

d : Fermentation time (h)

S : Residual sugar concentration (g/L)

*S*₀ : Initial sugar concentration (g/L)

P : Lactic acid concentration (g/L)

*P*₀ : Initial lactic acid concentration (g/L)

3. Results and discussion

3.1. Characterization of raw materials

OFI used in present work was characterized for the composition of constituents. The proximate composition of raw material is given in Table 1. For protein content analysis, the results obtained are in harmony with those of Diboune et al. (2019) and Kuloyo et al. (2014), and higher than those obtained by Tamine, Nancib, Nancib & Boudrant (2018).

Analysis of variance of total titratable acidity showed a significant difference between the OFIC and OFIFP. The obtained value of pH (4.8) of OFIC₃₅₀ was slightly higher than those of Rodríguez-García et al. (2007) who reported a pH values in a range between 4.07 and 4.35. Furthermore, the obtained acidity for OFIC₃₅₀ and OFIFP was low (1.8 and 0.42%, respectively) compared with this reported by El-Said, Nagib,

Table 1
Physical properties of the *OFI* and characteristics of raw materials.

a) Physical properties		Parameters		Values	
Whole fruit weight (g)				61.34 ± 12.96	
Pulp / fruit ratio (%)				50.7 ± 1.24	
Peel / fruit ratio (%)				44.36 ± 1.74	
Seeds /fruit ratio (%)				4.8 ± 0.83	
b) Characteristics of raw materials		<i>OFI</i>			
		OFIC ₃₅₀		OFIFP	
Moisture content ^a		89.12 ± 0.07		81.8 ± 0.47	
Total solids ^a		1.88		17.92	
pH		4.8 ± 0.01		5.03 ± 0.01	
Reducing sugars ^c		33.96 ± 1.32		60 ± 0.07	
Protein ^b		8.6 ± 1.08		7.6 ± 1.72	
Titratable acidity ^b		1.28 ± 0.01		0.42 ± 0.01	
Furfural		ND		ND	
HMF ^d (g/L)		0.054 ± 0.014		0.376 ± 0.007	
C) Composition of raw materials and obtained hydrolysates		Intreated OFIC ₃₅₀		Intreated OFIFP	
		AH	EH	OFIFP	Extract
Maltose (g/L)		3.26	16.57	19.27	2.70
Glucose (g/L)		4.20	7.43	14.69	17.03
Arabinose (g/L)		3.85	3.95	4.47	2.63
Reducing sugar ^e (g/L)		7.46	24	33.96	19.73
Total sugar ^e (g/L)		11.31 ± 0.47	27.95 ± 2.46	38.43 ± 1.71	22.36 ± 0.05
					41.21 ± 0.42

AH: Acid hydrolysate.

EH: Enzymatic hydrolysate.

Values represent means ± standard deviation calculated from three determinations.

ND: not detected.

^a % Fresh weight.

^b % Dry weight.

^c Sugar concentration (g/L) of *OFI* medium used in fermentation experiments at optimum conditions.

^d HMF concentration of *OFI* medium used in fermentation experiments.

^e Values are expressed as Mean ± Standard Deviation.

Rahman & Deraz (2011) which is 0.6% for peel, and those of Astello-García et al. (2015) who reported values in a range between 2.5 and 3.5% for cladodes.

The major organic acids present in prickly pear peel are citric acid and malic acid. However, cladodes show higher values of these acids, this is due to the CAM (Crassulacean Acid Metabolism) pathway metabolism of *OFI*. Indeed, the acidity and pH depend on the content of organic acids, which are synthesized. The latter are accumulated in the vacuole during night and suffer a reciprocal reserve carbohydrates accumulation during the daytime phase (Stintzing Schieber & Carle, 2003). Cantwell, Rodriguez-Felix & Robles (1992) shown that the titratable acidity is modified by the storage temperature. Indeed, in conditions of low temperature and darkness, there is a continuous accumulation of malic acid.

The different fractions were characterized in terms of composition in total and reducing sugars. The determinations were made in cladodes (OFIC₃₅₀) with a 350 μm sieves and fruit peels (OFIFP), before and after the pretreatment. The OFIC₃₅₀ presented a low sugar concentration of 11.32 ± 0.63 g/L, being glucose (4.20 g/L) the majority sugar. With the dilute acid pretreatment, the content of total sugars increases by 2.5 times, with maltose as the majority sugar (16.57 g/L).

The peels fruit (OFIFP) showed a glucose concentration of 17.03 g/L followed by maltose with 2.70 g/L and in a smaller amount arabinose (2.63 g/L). These concentrations increase more than twice when the sample was subjected to heat pretreatment, with the content of reducing sugars of 38.34 ± 0.55 g/L and total sugars of 41.21 ± 0.42 g/L.

The minerals content of *OFI* is summarized in Table 2. The results of this study showed that OFIC₃₅₀ and OFIFP contain useful elements which LAB require, such as Mg and K. Magnesium is the major divalent cation in all living cells. In bacterial cells, the intracellular Mg²⁺ content is equivalent to 20–40 mM. The essential requirement of Mg²⁺ for growth is generally explained by the fact that it acts as an activator of different metabolic reactions (Boyaval, 1989).

The mineral composition of OFIC reported varied appreciably from those by Bakari et al. (2017) and El-Mostafa et al. (2014), which reported the lowest values of Ca 44.2 and 5.64–17.95 mg/100 g DW respectively. In comparison, Alves et al. (2017) obtained a range of Ca between 2146 and 6275 mg/100 g DW. Jana (2012) reported the concentration of 5640 mg/100 g DW.

Furthermore, OFIC₃₅₀ sample was observed to have significantly higher values for the concentrations of Ca, Mn, K and P as compared to OFIC and OFIFP samples, however it contains a lower concentration of Mg.

These results showed also that OFIFP possessed high Ca, K and Mg contents, being 949.0, 2464.8 and 1817.9 mg/100 g DW, respectively, compared to the results of Nebbache, Chibani, Chadli & Bouznad (2009) who reported lower mineral contents (15.7, 98.0 and 15.2 mg/100 g DW, respectively) and El said, Nagib, Rahman & Deraz (2011) who reported a concentrations of 987.20 mg/100 g DW of Mg and 320.0 mg/100 g DW of K.

Table 2
Mineral contents of raw materials (OFIC, OFIC_{350μm} and OFIFP).

Minerals (mg/100 g DW)	Raw materials		
	OFIC	OFIC _{350μm}	OFIFP
Mg	1496.9 ± 19.3	1143.3 ± 1.0	1817.9 ± 15.0
Ca	1743.4 ± 253.8	2122.4 ± 238.2	949.1 ± 117.0
Mn	1.5 ± 0.1	2.1 ± 0.0	4.3 ± 0.0
K	1585.8 ± 86.6	3098.9 ± 65.2	2464.8 ± 1.3
P _{total}	48.7 ± 0.1	83.8 ± 0.1	54.8 ± 1.3

DW: Dry weight.

Values represent means ± standard deviation calculated from three determinations.

3.2. Optimization of dilute acid hydrolysis of OFIC using Box Behnken design (BBD)

Response surface Minitab 16 software (Minitab, State College, PA; www.minitab.com) was used to optimize the acid hydrolysis of OFIC₃₅₀. Table 3 shows the 46 experimental runs with different combinations of the five variables along with experimental responses. For an optimized procedure, the variables selected were prescribed into three levels (Table 3 and Table S2).

The results of BBD experiment showed that the best amount of reducing sugar was obtained in experimental run no 5, which was 21.63 g/L. The minimum sugar concentration of 4.18 g/L was gained in run 18. It was noted also that at low acid concentration (1%), an increase of the degree of fragmentation from 250 μm to 450 μm , causes an increase of sugar concentration released (comparison between experiments 22 and 46). Heterogeneous reaction systems, such as the dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass for the recovery of hemicelluloses, are typically dependent of particle size which is considered as one of the most important variables that affect process yield (Torrado et al., 2014). Ballesteros et al. (2000) reported that in the steam explosion, usually major recoveries were obtained when using particles with bigger sizes

(between 8 and 12 mm), in detriment of smaller particles, 2 to 5 mm. This is due to an increase on the available materials surface area for the contact with catalyst and the improvements of mass and heat transfer. Hendriks & Zeeman (2009) reported also that the pore size of the substrate relatively to the size of enzymes is the main limiting factor in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. Indeed, removal of hemicellulose increases the mean pore size of the substrate and therefore increases the probability of the cellulose to get hydrolyzed.

A polynomial regression is presented by following equation (Eq. 4):

$$Y \text{ (Sugar g/L)} = 11.83 - 1.36X_1 + 0.86X_2 + 1.85X_3 + 0.53X_4 - 0.70X_5 - 0.06X_1^2 + 0.74X_2^2 - 2.12X_3^2 - 2.74X_4^2 - 2.18X_5^2 - 5.37X_1X_2 + 2.71X_1X_3 - 0.31X_1X_4 + 3.9X_1X_5 + 3.8X_2X_3 + 1.11X_2X_4 + 0.74X_2X_5 + 0.27X_3X_4 - 0.49X_3X_5 + 0.56X_4X_5 \quad (4)$$

As shown in Table 4, a model *F-value* of 16.02 and a probability value of 0.000 imply significant model fit. From the regression analysis of the experimental data, the linear model terms (X_1 , X_2 , X_3 , X_5), interactive model term (X_1X_2 , X_1X_3 , X_1X_5 , X_2X_3) and square terms (X_3^2 , X_4^2 , X_5^2) for acid hydrolysis of OFIC had a significant effect on the sugar yield. The fitness of the model was examined by the determination coefficient ($R^2 = 0.9276$), which implies that 92.76% of variability in sugar yield (g/L)

Table 3
Box-Behnken experimental design for hydrolysis of OFIC.

Run	HCl (%)	T (°C)	Residence time (min)	Granulation (μm)	Substrate (%)	Sugar (g/L)	
						Experimental	Predicted
1	3	90	35	350	10	11.48	11.83
2	3	120	25	350	10	5.56	5.66
3	3	120	45	350	10	15.97	16.93
4	1	90	45	350	10	10.12	10.15
5	1	120	35	350	10	21.63	20.10
6	3	120	35	350	5	11.45	11.20
7	3	90	45	250	10	8.99	8.02
8	5	90	45	350	10	14.01	12.85
9	3	90	35	450	5	7.9	7.57
10	3	60	35	450	10	6.99	8.37
11	3	90	35	350	10	11.48	11.83
12	3	60	25	350	10	12.79	11.51
13	5	90	35	350	15	9.93	11.42
14	3	90	45	350	5	9.76	10.56
15	1	90	35	350	15	5.03	6.37
16	1	60	35	350	10	8.17	7.63
17	3	90	25	350	15	4.63	5.46
18	3	90	25	450	10	4.18	5.36
19	3	90	35	350	10	10.92	11.83
20	3	90	35	250	15	6.49	5.12
21	5	120	35	350	10	5.72	6.63
22	1	90	35	450	10	11.70	11.22
23	3	90	45	450	10	9.67	9.61
24	3	90	35	350	10	12.25	11.83
25	3	90	35	450	15	8.31	7.29
26	3	90	25	350	5	5.04	5.88
27	3	120	35	250	10	9.18	9.03
28	5	60	35	350	10	13.76	15.66
29	3	60	35	250	10	9.28	9.55
30	3	60	35	350	5	11.21	10.96
31	3	60	45	350	10	8.09	7.66
32	1	90	35	350	5	15.90	15.54
33	3	90	35	350	10	12.53	11.83
34	3	60	35	350	15	9.13	8.09
35	1	90	25	350	10	12.25	11.86
36	3	90	35	350	10	12.30	11.83
37	3	90	35	250	5	8.09	7.63
38	3	120	35	350	15	12.32	11.28
39	3	120	35	450	10	11.35	12.32
40	5	90	35	450	10	9.75	7.88
41	5	90	35	350	5	5.24	5.03
42	5	90	25	350	10	5.30	3.72
43	3	90	25	250	10	4.58	4.85
44	3	90	45	350	15	7.41	8.20
45	5	90	35	250	10	6.94	7.44
46	1	90	35	250	10	7.65	9.55

Table 4
ANOVA with estimated regression coefficients for sugar concentration model.

Source	Coefficient	DF ^a	Seq. SS ^b	Adj. SS ^c	Adj. MS ^d	F-value	P- value Prob > F
Model	11.8301	20	525.76	525.76	26.28	16.02	0.000
X_1	-1.3626	1	29.70	29.70	29.70	18.11	0.000**
X_2	0.8586	1	11.79	11.79	11.79	7.19	0.013*
X_3	1.8551	1	55.06	55.06	55.06	33.56	0.000**
X_4	0.5272	1	4.44	4.44	4.44	2.71	0.112
X_5	-0.6955	1	7.73	7.73	7.73	4.72	0.040*
X_1^2	-0.0565	1	8.26	0.03	0.03	0.02	0.897
X_2^2	0.7363	1	39.96	4.73	4.73	2.88	0.102
X_3^2	-2.1215	1	11.24	39.27	39.27	23.94	0.000**
X_4^2	-2.7437	1	43.55	65.69	65.69	40.05	0.000**
X_5^2	-2.1793	1	41.44	41.44	41.44	25.27	0.000**
$X_1.X_2$	-5.3750	1	115.56	115.56	115.56	70.44	0.000**
$X_1.X_3$	2.7101	1	29.37	29.37	29.37	17.91	0.000**
$X_1.X_4$	-0.3086	1	0.38	0.38	0.38	0.23	0.634
$X_1.X_5$	3.8889	1	60.49	60.49	60.49	36.88	0.000**
$X_2.X_3$	3.7787	1	57.11	57.11	57.11	34.82	0.000**
$X_2.X_4$	1.1144	1	4.96	4.96	4.96	3.03	0.094
$X_2.X_5$	0.7378	1	2.17	2.17	2.17	1.33	0.260
$X_3.X_4$	0.2691	1	0.29	0.29	0.29	0.18	0.678
$X_3.X_5$	-0.4850	1	0.94	0.94	0.94	0.57	0.456
$X_4.X_5$	0.5555	1	1.23	1.23	1.23	0.75	0.394

**P < 0.01: Significant at 1% level.

* P < 0.05: Significant at 5% level.

^a DF: degrees of freedom.

^b Seq. SS: sequential sum of squares.

^c Adj. SS: adjusted sum of squares.

^d Adj. MS: adjusted mean squares.

were explained by the independent variables.

The optimum global solution for the maximum sugar yield was observed to be 1% of dilute HCl concentration, 120 °C of temperature, 40 min of residence time, 350 µm of granulation and 5% (w/v) of substrate loading. From the experimental study, the sugars and HMF concentrations were obtained as 24 g/L and 0.054 g/L respectively, while furfural was not detected either in OFIC₃₅₀ acid hydrolysate or OFIFP extract.

This can be explained by the lower temperature of 120 °C at which pretreatment was performed and due to the use of dilute acid. In this context, Kuloyo et al. (2014) reported a treating process in which cladodes was treated with 1.5% (w/v) H₂SO₄ at 120 °C with a residence time of 50 min, and a production of 22.6 g/L sugar was obtained at last.

Studies have shown that the concentration of inhibitors increases with an increase in pretreatment temperature. It has been reported that xylose can be easily degraded to furfural at a temperature higher than 120 °C (Liu et al., 2012).

Laopaiboon, Thani, Leelavatcharamas & Laopaiboon (2010) previously reported that the sugarcane bagasse was hydrolyzed using 0.5% (v/v) of HCl at 100 °C for 5 h, and approximately 1.2 g/L of furfural was produced. Van der pol, Eggink & Weusthuis (2016) reported similar concentration of sugar (20.93 g/L) and 1.11 g/L of furfural from sugarcane bagasse using 0.72% (w/v) of H₂SO₄ at 170 °C for 15 mn. Dussán et al. (2014) reported a concentration of 22.74 g/L of glucose with a furfural concentration of 0.145 g/L and HMF concentration of 0.206 g/L from sugarcane bagasse using 2% (w/v) of H₂SO₄ at 155 °C with a short residence time of 10 min. In another study, sorghom biomass is pretreated with 0.2 M H₂SO₄ at 120 °C for 120 min, releasing approximately 13 g/L of sugars with a furfural concentration of 0.23 g/L (Deshavath et al., 2017).

It is clear that the production of these inhibitors increases when hydrolysis takes place at higher temperatures and higher acid concentrations. As reported, the components of the inhibitory compounds vary greatly with the pretreatment method and the raw material used.

So, diluted acid pretreatment appears as a more favorable method than concentrated acid pretreatment for industrial applications and has been extensively studied for pretreating wide range of lignocellulosic raw materials. Its main objective is to solubilize the hemicellulosic

fraction of the biomass making the cellulose more accessible to enzymes (Dahman, Dignan, Fiayaz & Chaudhry, 2019).

3.3. Enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated OFIC₃₅₀

After completion of the dilute acid pretreatment, the enzymatic hydrolysis of OFIC₃₅₀ samples using cellulase was performed. Enzymatic hydrolysis is intended to release monosaccharides from crystalline cellulose and from the remains of hemicellulose, so they can be fermented by *Lactobacillus plantarum* to lactic acid. On the other hand, hydrolysis of lignocellulosic biomass is more complicated than that of pure cellulose due to the presence of non-glucan components such as lignin and hemicellulose. The lignine content and type of lignine has a significant effect on the hydrolysis of various cellulosic substrates as lignin acts as both physical barrier, restring access of cellulases to cellulose. Indeed, it has been shown that the presence of lignin reduces amount of cellulase available to catalyze cellulose hydrolysis. Furthermore, it is important to note that cellulose have crystalline and resistant regions, but there are also amorphous regions that are formed when the density of cellulose decreases due to some mechanical damage. The strength of cellulose fibers is also influenced by the degree of polymerization as well as by the molecular arrangement. The molecules within the fibers are usually held in place by strong hydrogen bonds (Filson & Dawson, 2009; Yu, 2015).

However, efficient enzymatic hydrolysis requires some form of pretreatment to open the structure of lignocelluloses. The enzymatic hydrolysis of the OFIC₃₅₀ (EH OFIC₃₅₀) previously treated with dilute acid in the above-mentioned conditions gave a total sugar concentration of 38.43 ± 1.71 g/L of which 88.4% are reducing sugar, mostly maltose (56.74% w/w) and glucose (43.25%, w/w). OFIC₃₅₀ acid hydrolysate has mostly maltose, representing 69% of the reducing sugars, followed by glucose, with 30.95% (w/w). The efficiency of this step is crucial for the conversion of the biomass to the desired products because monosaccharides are the source of carbon for fermentative microorganisms.

In the case of the OFIFP extract, about 93% are reducing sugars, mostly maltose (50.78%, w/w) and glucose (49.21%, w/w). Both samples still have a low amount of arabinose, for OFIC₃₅₀ acid hydrolysate 14.13%, OFIC₃₅₀ enzymatic hydrolysate 11.63% and OFIFP extract 6.96% (Table 1).

3.4. Fermentation performance of *Lactobacillus plantarum* in glucose and xylose media

Fermentation performance of strain was assessed in the mMRS media with xylose as the sole carbon source, and with the mixture of glucose and xylose (Table 5). The results show that *Lactobacillus plantarum* is able to grow in the presence of xylose as the sole source of fermentable sugar with a maximal specific growth rate of 0.24 h^{-1} . Lactic acid yield and productivity were about 0.22 g/g and 0.13 g/L.h , respectively. The maximum concentration of lactic acid obtained was 4.18 g/L . This is probably explained by the pathway used by *Lactobacillus plantarum* for metabolizes the xylose. Extensive works has been done on the utilization of the lignocellulosic biomass for lactic acid production. On the other hand, few strains from LAB can ferment xylose which is the second abundant sugar in lignocelluloses and the main sugar of hemicellulose fraction. Furthermore, most xylose-fermenting LAB transform glucose homofermentatively to lactic acid and pentose heterofermentatively to equimolar amount of lactic and acetic acids via the phosphoketolase pathway (PK-pathway) (Abdel-Rahman et al., 2016).

It has been shown (Heath, Hurwitz, Horecker & Ginsburg, 1958) that the products were formed from pentose without mixing of the carbon atoms. Thus the methyl and carboxyl groups of acetate were shown to arise from C-1 and C-2, and the carboxyl, carbinol, and methyl groups of lactate to arise from C-3, C-4, and C-5 of the pentose, respectively (R1).

Mitsuhashi & Lampen (1953) reported that *Lactobacillus plantarum* grown on D-xylose contains a xylose isomerase (XI), which catalyzed the isomerization of the xylose to xylulose (R2). This latter is phosphorylated by the native enzyme xylulokinase (XK) to xylulose-5-phosphate (R3) and enters the main glycolysis via the pentose phosphate pathway (PPP).

The D-xylulokinase, has been also purified by Stumpf & Horecker (1956) from extracts of xylose-grown *Lactobacillus plantarum*.

In glucose and xylose mixture medium, *Lactobacillus plantarum* exhibited a maximum lactic acid concentration of 6.82 g/L after 24 h of fermentation. The growth is better in the mMRS medium with D-glucose as the fermentable carbohydrate with a maximum specific growth rate of 0.36 h^{-1} . Lactic acid yield and productivity were 0.43 g/g and 0.25 g/L.h , respectively.

Westby, Nuraidal, Owens & Gibbs (1993) confirmed that *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8026 grows on pentoses only in the presence of glucose or possibly other compounds present in yeast extract.

3.5. Lactic acid production from OFIC₃₅₀ hydrolysate

Dilute acid pretreatment is regarded suitable either for hydrolysis of lignocellulose or to enhance enzymatic digestibility. Industrial production of lignocellulosic lactic acid requires a microorganism utilizing both hexose and pentose and tolerating inhibitors such as furfural and HMF.

Table 5

Kinetic parameters in batch fermentation of carbon sources.

Carbon sources	Lactic acid ^a (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/L.h)	Specific growth rate ^a μ_{\max} (h^{-1})
Xylose (mMRS)	4.18 ± 0.3	0.22	0.13	0.24 ± 0.02
Xy + Glu (mMRS)	6.82 ± 0.4	0.43	0.25	0.36 ± 0.05
OFIC ₃₅₀ AH	6.4 ± 0.08	0.33	0.23	0.18 ± 0.01
OFIC ₃₅₀ EH	9.17 ± 0.1	0.46	0.34	0.25 ± 0.04
OFIFP extract	23.66 ± 0.7	0.78	0.95	0.3 ± 0.02

AH: Acid hydrolysate.

EH: Enzymatic hydrolysate (dilute acid pretreatment followed by enzymatic hydrolysis).

mMRS: Modified MRS.

^a Values are expressed as Mean \pm Standard Deviation.

The results show that it is possible to use both enzymatic and acid hydrolysate of OFIC₃₅₀ to produce lactic acid. The use of hydrolyzed cladode in this process can be an alternative to the viability of second-generation biotechnological products, since the utilization of derived sugars from hemicellulose, especially xylose, still represents a barrier in these processes. The OFIC₃₅₀ carbohydrates must first be saccharified by some type of hydrolysis. Of the two types of hydrolysis studied, the enzymatic hydrolysis seems more convenient when fermenting.

Indeed, dilute acid pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of OFIC₃₅₀ resulted in a high sugar yield and volumetric lactic acid productivity of 0.46 g/g and 0.34 g/L.h respectively, when compared to dilute acid pretreatment alone (Table 5).

Dilute acid pretreatment is the most common and efficient method for lignocellulosic feedstocks to dissolve the hemicellulose of biomass. Besides, it requires less acid, thus rendering less toxic waste (Dahman, Dignan, Fiayaz & Chaudhry, 2019).

After dilute acid pretreatment, cellulose accessibility to enzymes substantially increases primarily due to the solubilization of hemicellulose from lignocellulose. Therefore, generally >90% solubilization of hemicellulose in the form of monomeric or oligomeric sugars during dilute acid pretreatment and over 90% of glucose yield from the enzymatic hydrolysis of dilute acid-pretreated lignocellulose can be obtained (Xiu, Zhang & Shahbazi, 2011).

The maximum lactic acid concentration was found to be 6.4 g/L using acid hydrolysate. This low concentration was probably due to bacterial growth inhibition under condition of acid hydrolysis. Studies developed by Guo, Jia, Li & Chen (2010) shown that although it has been found that acid hydrolysis of sugarcane bagasse presents high yield of glucose in hydrolyzed solutions, there is also quite a high yield of xylose, which reduces the yield of lactic acid fermentation. It was reported by these authors that *Lactobacillus plantarum* (XS1T3-4) exhibited the ability to utilize various sugars present in dilute-acid hydrolysate of biomass. Studies of lactic acid production from wheat straw hemicellulose pretreated with sulfuric acid showed similar results using *Lactobacillus pentosus*, this strain produced between 6.6 and 6.7 g/L from enzymatic and acidic hydrolysate, respectively (Garde, Jonson, Schmidt & Ahring, 2002). Tamine, Nancib, Nancib & Boudrant (2018) reported a lactic acid concentration of 6.29 g/L , however, these results were obtained with substrate loading of 10% (cladode) and acid sulfuric concentration of 6.8%, and the strain used was *Lactococcus lactis*. Jonlerjunya et al. (2012) reported a production of 6.5 g/L of lactic acid after 24 h of fermentation, using *Lactobacillus plantarum*, and utilizing sugarcane bagasse hydrolysates as carbon source and yeast extract and peptone as nitrogen sources. Laopaiboom, Thani, Leelavatchramas & Laopaiboom (2010) obtained, with a detoxified hydrolysate supplemented with xylose and yeast extract, a maximum concentration of 10.85 g/L using *Lactococcus lactis*.

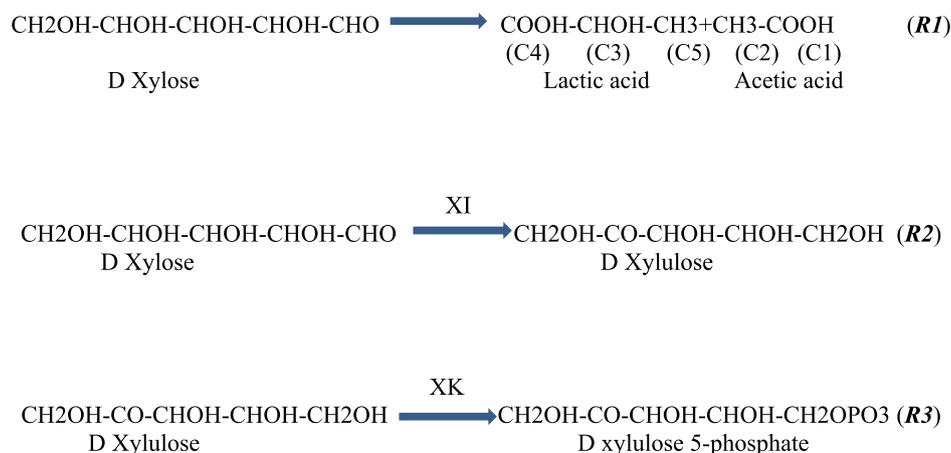
Therefore, this study indicates that OFIC₃₅₀ hydrolysate is a potential raw material for lactic acid production. Probably, better fermentation results could be reached by supplementing the hydrolyzate with nutrients, since lactic acid bacteria have complex nutrient requirements.

3.6. Lactic acid production from OFIFP extract

The OFI fruit peels (OFIFP) constitute an unexplored fermentable raw material that could potentially be used as a carbon source for the production of lactic acid.

Recently, heat treatment of OFIFP showed promising results, because of its high-efficiency biomass hydrolysis (Diboune et al., 2019). The potential of OFIFP extract as a fermentation substrate was determined after a heat temperature extraction. The capacity of *Lactobacillus plantarum* for lactic acid production was tested in a medium containing OFI fruit peels extract as the carbon source.

To investigate the influence of initial sugar concentration of OFIFP on cell growth and lactic acid production, *Lactobacillus plantarum* was cultivated with OFIFP extract at various sugar concentrations ranging



from 2 to 8% (w/v) (Fig. 1).

Fig. 1 shows the effect of initial sugar concentration of OFIFP extract on both lactic acid, yield ($Y_{p/s}$) and productivity. Both lactic acid concentration and productivity increased gradually with the increase of OFIFP sugar concentration. Maximum lactic acid concentration (27.97 g/L) and lactic acid productivity (1.1 g/L.h) were obtained at OFIFP sugar concentration of 8% (w/v). On the other hand the yield ($Y_{p/s}$) decreases with the increase in the concentration of sugar. The maximum lactic acid yield of approximately 0.78 g/g was obtained at OFIFP sugar concentration of 6% (w/v) with maximum productivity of 0.95 g/L.h.

Many studies are in progress to evaluate the vegetable and fruit by-products (such as carrot peel, potato peel, banana peel, apple peel, and orange peel) as a raw material for lactic acid production (Abedi & Hashemi, 2020), but no studies have been conducted on the utilization of OFI fruit peels. Several industrial by-products or wastes have been evaluated as substrates for lactic acid production using *Lactobacillus plantarum*. Wang, Wang, Ren & Wang (2005) evaluated the lactic acid production profile of *Lactobacillus plantarum* TD46 utilizing kitchen waste and obtained lactic acid yield of 0.39 g/g and 0.60 g/L.h of average productivity. Sharma & Mishra (2014) reported 3.2 g/L lactic acid concentration from vegetable juice using *Lactobacillus plantarum* NCDC 414. Sharma et al. (2021) used *Lactobacillus plantarum* CRA52 strain. During their experiments performed in flasks with whey permeate as carbon source and whey protein hydrolysate as nitrogen source, they reached a concentration of 17.26 g/L of lactic acid with a yield of 0.87 g/g and a productivity of 0.87 g/L.h.

A few authors performed assays in a fermenter to reach higher performances. Using the immobilized *Lactobacillus plantarum* 23 cells, Chen

et al. (2020), obtained with microalgal *Chlorella vulgaris* ESP-31 hydrolysate, a maximum concentration of lactic acid of 42.34 g/L with yield of 0.93 g/g and productivity of 7.56 g/L.h. Nagarajan et al. (2020) who worked on lactic acid production from different renewable feedstock using immobilized *Lactobacillus plantarum* 23, reported 42.4 g/L lactic acid production from sugarcane bagasse hydrolysate with a productivity of 7.0 g/L.h and yield of 0.98 g/g. From cheese whey as a substrate, the maximum lactic acid concentration, yield and productivity obtained were 24.5 g/L, 0.63 g/g and 3.56 g/L.h, respectively. A maximum lactic acid concentration of 40.3 g/L has been obtained from microalgal *Chlorella vulgaris* ESP-32 hydrolysate with maximum productivity of 6.72 g/L.h and yield of 0.97 g/g. Hwang, Kim, Chang & Lee (2012) showed a yield of 0.66 g/g obtained by *Lactobacillus plantarum* when using the hydrolysate of *Enteromorpha prolifera* (Chlorophyta) as a feedstock for lactic acid fermentation. A higher final lactic acid concentration (97.7 g/L) has been obtained by Okano et al. (2017) from brown rice using *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 strain. The yield and productivity obtained were 0.75 g/g and 0.68 g/L.h respectively.

This study shows that the production of lactic acid from OFI fruit peels is economically feasible. The outcome of this research demonstrates that this process might represent a valid alternative to minimize the heavy waste burden of OFI fruit peels derived from the prickly pear industry in Algeria.

Indeed, the interest of developing the exploitation of the prickly pear and enhancing the uses of this fruit in Algeria have been noted by national and international experts in the agricultural sector. Algeria which has nearly 100,000 ha of prickly pear cultivation, has in fact set up programs for the production and processing of Opuntia for a better valuation of this species with the objective of accessing the international market. In this way, the area of Souk Ahras which is located in the eastern part of northern Algeria, is the first area that initiated the development of prickly pear uses. To date, one integrated agricultural pole for the Opuntia cultivation has been established in this region.

The installation based in the municipality of Sidi-Fredj covers 5,000 m² and this area dedicated to the cultivation of Opuntia extends over 18,000 ha of which on average one hectare provides 20 tons of OFI fruit. The main functions unit are the packaging of cactus pear and the production of essential oils, pharmaceuticals, juice, jam and livestock feed (Inglese, Mondragon, Nefzaoui & Saenz 2017).

Taking into account as an example this production unit allows us to give an estimate of the amount of lactic acid that could be produced from waste such as OFI fruit peels. According to the results obtained in this study 100 kg of OFI fruit peels, produce 1.5 kg of lactic acid. So for a production capacity of 20 tones/ha, the Sidi Fredj unit would be capable of reaching nearly 2,600 tones of lactic acid from 180,000 tons of OFI fruit peels.

However, it should be noted that this estimate is very preliminary

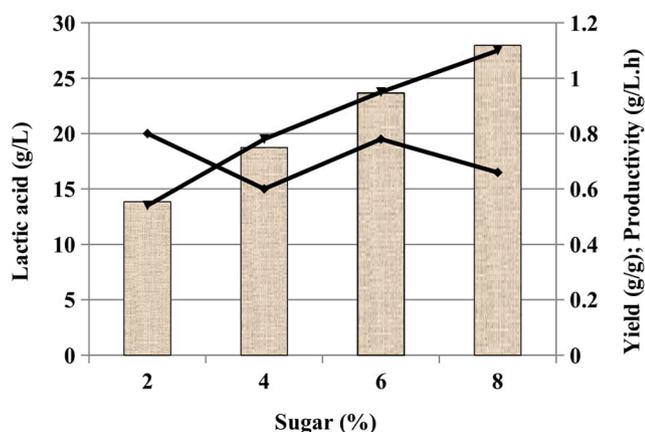


Fig. 1. Effect of initial sugar concentration of OFIFP juice on yield (■), productivity (▲) and lactic acid (■) in the *Lactobacillus plantarum* fermentation.

and approximate, so does not provide a real analysis of the potential production of lactic acid from *OFI* fruit peels. We add also that the present experiments have been carried out only in Erlenmeyer flasks and would deserve to be performed also in fermenter (bioreactor) furthermore. Moreover, the conditions for lactic acid production in the present work have not yet been optimized.

The value of *OFI* fruit peels lies in their content in elements such as sugars, amino acids and minerals. This makes them a potential candidate to be utilized as raw material for the production of lactic acid or other interesting bioproducts. Furthermore, the importance of the present process lies in the fact that no chemical hydrolysis was carried out for the release of fermentable sugars.

The study really suggests that the peels of *OFI* fruit should not be wasted, but rather utilized or recycled for the production of interesting metabolites such as lactic acid. This unused product, actually considered as a waste can really serve as a cheap, natural, safe and environment friendly raw materials.

4. Conclusions

Many studies were carried out to screen inexpensive substrates to produce several metabolites by fermentation in a viable and sustainable way. In fact, the use of agricultural residues as substrates could not only reduce fermentation costs but also minimize environmental pollution. *Opuntia ficus indica* (*OFI*) is one of the commercially feasible lignocellulosic biomasses and has a great potential of being sustainable feedstock for a range of products. The result of the study implies that OFIC₃₅₀ (*OFI* Cladode granulation 350 µm) hydrolysate can be used effectively as sole carbon source to produce lactic acid. Moreover, the fermentation of *OFI* fruit peel (*OFI*FP) revealed high values of lactic acid yield (0.78 g/g) and productivity (0.95 g/L.h).

Due to their low acidity and their high levels of soluble sugars, the *OFI* fruit peels could be considered as excellent carbon source to produce lactic acid. Not with standing, this fermentation medium formulation is cheap and simple and could be an ideal substrate for large scale biorefinery operations.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

The authors would like to thank Professor Hocine. Daba (Ferhat Abbas University, Setif 1, Algeria) for providing the strain used in the experiments.

Jaime Anfibal and Sara Raposo would like to acknowledge the financial support of the Portuguese Foundation of Science and Technology (FCT) to CIMA through UIDP/00350/2020.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131005>.

References

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Zendo, T., Sakai, K., & Sonomoto, K. (2016). Highly efficient L-lactic acid production from xylose in cell recycle continuous fermentation using *Enterococcus mundtii*. *QU 25. RSC Advances*, 21(6), 17659–17668. <https://doi.org/10.1039/C5RA27579B>.
- Abedi, E., & Hashemi, S.M.B. (2020). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6, (10), 1–32. [10.1016/j.heliyon.2020.e04974](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974).
- Alves de Oliveira, R., Komesu, A., Vaz Rossell, C. E., & Maciel Filho, R. (2018). Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design-from economic to

- production aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 219–239. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.003>.
- Alves, F. A. L., Andrade, A. B. D., Bruno, R. L. A., Santos, D. C. D., Magalhães, A. L. R., & Silva, D. S. S. (2017). Chemical and nutritional variability of cactus pear cladodes, *Genera Opuntia* and *Nopalea*. *American Journal of Food Technology*, 12(1), 25–34. <https://doi.org/10.3923/ajft.2017.25.34>.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis* (17th ed.). Gaithersburg: The Association of Official Analytical Chemists. <https://www.worldcat.org/title/official-methods-of-analysis-of-aoac-international/oclc/44761301>.
- Astello-García, M. G., Cervantes, I., Nair, V., Santos-Díaz, M. D. S., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F., ... Barba de la Rosa, A. P. (2015). Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.04.016>.
- Bakari, S., Daoud, A., Felhi, S., Smaoui, S., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2017). Proximate analysis, mineral composition, phytochemical contents, antioxidant and antimicrobial activities and GC-MS investigation of various solvent extracts of cactus cladode. *Food Science and Technology*, 37(2), 286–293. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.20116>.
- Ballesteros, I., Oliva, J. M., Navarro, A. A., González, A., Carrasco, J., & Ballesteros, M. (2000). Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86(1-9), 97–110.
- Boyaval, P. (1989). Lactic acid bacteria and metal ions. *Lait*, 69(2), 87–113. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00929154/document>.
- Cantwell, A. A., Rodríguez-Félix, F., & Robles, C. (1992). Postharvest physiology of prickly pear cactus stems. *Scientia Horticulturae*, 50, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(05\)80003-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(05)80003-2).
- Chen, P. T., Hong, Z. S., Cheng, C. L., Ng, I. S., Lo, Y. C., Nagarajan, D., & Chang, J. S. (2020). Exploring fermentation strategies for enhanced lactic acid production with polyvinyl alcohol-immobilized *Lactobacillus plantarum* 23 using microalgae as feedstock. *Bioresource Technology*, 308, 123266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123266>.
- Cota-Sánchez, J. H. (2016). Nutritional composition of the prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit. In M. S. J. Simmonds, & V. R. Preedy (Eds.), *Nutritional composition of fruit cultivars* (pp. 691–712). Cambridge: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00028-3>.
- Dahman, Y., Dignan, C., Fiayaz, A., & Chaudhry, A. (2019). An introduction to biofuels, foods, livestock, and the environment. In *Biomass, biopolymer-based materials, and bioenergy* (pp. 241–276). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00013-8>.
- Deshavath, N. N., Mohan, M., Veeranki, V. D., Goud, V. V., Pinnamaneni, S. R., & Benarjee, T. (2017). Dilute-acid pretreatment of sorghum biomass to maximize the hemicellulose hydrolysis with minimized levels of fermentative inhibitors for bioethanol production. *3. Biotech*, 7, 139. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0752-3>.
- Diboune, N., Nancib, A., Nancib, N., Anfibal, J., & Boudrant, J. (2019). Utilization of prickly pear waste for baker's yeast production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(5), 744–754. <https://doi.org/10.1002/bab.v66.510.1002/bab.1753>.
- Dussán, K. J., Silva, D. D. V., Moraes, E. J. C., Priscila, V., Arruda, P. V., & Felipe, M. G. A. (2014). Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose from sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 433–439. <https://doi.org/10.33031/CET1438073>.
- Elkady, W. M., Bishr, M. M., Abdel-Aziz, M. M., & Salama, O. M. (2020). Identification and isolation of anti-pneumonia bioactive compounds from *Opuntia ficus-indica* fruit waste peels. *Food & Function*, 11, 5275–5283. <https://doi.org/10.1039/D0FO00817F>.
- El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbij, M., ... Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879–14901. <https://doi.org/10.3390/molecules190914879>.
- El-Said, N. M., Nagib, A. I., Rahman, Z. A., & Deraz, S. F. (2011). Prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peels: Chemical composition, nutritional value and protective effects on liver and kidney functions and cholesterol in rats. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 5, 30–35. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2011/FPSB_5\(S11\)/FPSB_5\(S11\)30-35o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2011/FPSB_5(S11)/FPSB_5(S11)30-35o.pdf).
- Filannino, P., Cavoski, I., Thlien, N., Vincentini, O., De Angelis, M., Silano, M., Gobetti, M., & Di Cagno, R. (2016). Lactic acid fermentation of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica* L.) Generates flavonoid derivatives with antioxidant and anti-inflammatory properties. *PLoS One*, 11(3), e0152575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152575>.
- Filson, P., & Dawsonandoh, B. (2009). Sono-chemical preparation of cellulose nanocrystals from lignocellulose derived materials. *Bioresource Technology*, 100(7), 2259–2264. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.062>.
- Garde, A., Jonsson, G., Schmidt, A. S., & Ahring, B. K. (2002). Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology*, 81(3), 217–223. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00135-3).
- Guo, W., Jia, W., Li, Y., & Chen, S. (2010). Performances of *Lactobacillus brevis* for producing lactic acid from hydrolysate of lignocelluloses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1-8), 124–136. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8857-8>.
- Heath, E. C., Hurwitz, J., Horecker, B. I., & Ginsburg, A. (1958). Pentose Fermentation by *Lactobacillus Plantarum*. I. The cleavage of xylulose 5-phosphate by phosphoketolase. *Journal of Biological Chemistry*, 231(2), 1009–1029. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70463-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70463-8).

- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>.
- Hwang, H. J., Kim, S. M., Chang, J. H., & Lee, S. B. (2012). Lactic acid production from seaweed hydrolysate of *Enteromorpha prolifera* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 24, 935–940. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9714-z>.
- Inglese, P., Mondragon, C., Nefzaoui, A., & Saenz, C. (2017). *Crop ecology, cultivation and uses of cactus pear*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (p. 244). FAO. <http://www.fao.org/3/i7012e/i7012e.pdf>.
- Jana, S. (2012). Nutraceutical and functional properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) and its utilization for food applications. *Journal of Engineering Research and Studies*, 3, 60–66. <https://steviaguajarat.com/image/2019/03/Nutraceutical-and-functional-properties-of-prickly-Pear-pdf.pdf>.
- Kuloyo, O. O., du Preez, J. C., García-Aparicio Mdel, P., Kilian, S. G., Steyn, L., & Görgens, J. (2014). *Opuntia ficus indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 3173–3183. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11274-014-1745-6.pdf>.
- Laopaiboon, P., Thani, A., Leelavatcharamas, V., & Laopaiboon, L. (2010). Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource Technology*, 101(3), 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.091>.
- Liu, X., Ai, N., Zhang, H., Lu, M., Ji, D., Yu, F., & Ji, J. (2012). Quantification of glucose, xylose, arabinose, furfural, and HMF in corn cob hydrolysate by HPLC-PDA-ELSD. *Carbohydrate Research*, 353, 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.03.029>.
- Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. L., & Randall, Rose J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Mitsushashi, S., & Lampen, J. O. (1953). Conversion of D-xylose to D-xylulose in Extracts of *Lactobacillus Pentosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 204(2), 1011–1018. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)66103-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)66103-4).
- Mueller-Harvey, I., & Baker, R. M. (2002). *Chemical Analysis in the Laboratory: A Basic Guide*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. <https://www.globalspec.com/reference/55348/203279/chemical-analysis-in-the-laboratory-a-basic-guide>.
- Nagarajan, D., Nandini, A., Dong, C. D., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2020). Lactic acid production from renewable feedstocks using poly-vinyl alcohol immobilized *Lactobacillus plantarum* 23. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(39), 17156–17164. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c01422>.
- Nancib, A., Nancib, N., Boubendir, A., & Boudrant, J. (2015). The use of date waste for lactic acid production by a fed-batch culture using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 893–902. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320131067>.
- Nebbache, S., Chibani, A., Chadli, R., & Bouznad, A. (2009). Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. *African Journal of Biotechnology*, 8, 1623–1624. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/60345>.
- Okano, K., Kihara, S., Hama, M., Noda, H., Tanaka, T., & Kondo, A. (2017). Production of optically pure D-lactic acid from brown rice using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 1869–1875. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7976-8>.
- Rodríguez-García, M. E., de Lira, C., Hernández-Becerra, E., Cornejo-Villegas, M. A., Palacios-Fonseca, A. J., Rojas-Molina, I., ... Muñoz-Torres, C. (2007). Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(3), 107–112. <https://doi.org/10.1007/s11130-007-0049-5>.
- Scelsi, E., Angelini, A., & Pastore, C. (2021). Deep eutectic solvents for the valorisation of lignocellulosic biomasses towards fine chemicals. *Biomass*, 1, 29–59. <https://doi.org/10.3390/biomass1010003>.
- Sharma, V., & Mishra, H. N. (2014). Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1123–1128. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.039>.
- Sharma, A., Mukherjee, S., Reddy Tadi, S. R., Ramesh, A., & Sivaprakasam, S. (2021). Kinetics of growth, plantarin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic *Lactobacillus plantarum* CRA52. *LWT - Food Science and Technology*, 139, 110744. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110744>.
- Silva, M. A., Albuquerque, T. G., Pereira, P., Ramalho, R., Vicente, F., Oliveira, M. B. P. P., & Costa, H. S. (2021). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.: A multi-benefit potential to be exploited. *Molecules*, 26, 951. <https://doi.org/10.3390/molecules26040951>.
- Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2003). Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *European Food Research and Technology*, 216(4), 303–311. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0657-0>.
- Stumpf, P. K., & Horecker, B. L. (1956). The role of xylulose 5-phosphate in xylose metabolism of *Lactobacillus Pentosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 218, 753–768. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65840-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65840-5).
- Tamine, M., Nancib, A., Nancib, N., & Boudrant, J. (2018). Prickly pear cactus as a raw material for lactic acid production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 14, 16–24. <https://doi.org/10.21161/mjm.107217>.
- Taylor, A. C. K. (1996). A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56, 49–58. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02787869>.
- Torrado, I., Bandeira, F., Shatalov, A., Carvalheiro, F., & Duarte, L. C. (2014). The impact of particle size on the dilute acid hydrolysis of giant reed biomass. *Electronic Journal of Energy & Environment*, 2, 1–9. <https://doi.org/10.7770/EJEE-V0N0-ART598>.
- Van der Pol, E. C., Eggink, G., & Weusthuis, R. A. (2016). Production of L(+)-lactic acid from acid pretreated sugarcane bagasse using *Bacillus coagulans* DSM2314 in simultaneous saccharification and fermentation strategy. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 248. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0646-3>.
- Wang, X. M., Wang, Q. H., Ren, N. Q., & Wang, X. Q. (2005). Lactic acid production from kitchen waste with a newly characterized strain of *Lactobacillus plantarum*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 19, 383–389. <http://silverstripe.fkit.hr/cabec/assets/Uploads/Cabec-2005-4-9.pdf>.
- Westby, A., Nuraidal, L., Owens, J. D., & Gibbs, P. A. (1993). Inability of *Lactobacillus plantarum* and other lactic acid bacteria to grow on D-ribose as sole source of fermentable carbohydrate. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 168–175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02763.x>.
- Xiu, S., Zhang, B., & Shahbazi, A. (2011). Biorefinery processes for biomass conversion to liquid fuel. In M. A. D. S. Bernardes (Ed.), *Biofuel's engineering process technology*. In Tech, 10.5772/16417.
- Yu, C. (2015). Natural textile fibres: Vegetable fibres. Chapter 2. *Textiles and fashion*, 29–56. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-931-4.00002-7>.
- Zoghalmi, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*, 7, 874. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>.

Résumé

Ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte de valorisation de la biomasse lignocellulosique d'*Opuntia ficus indica* (OFI) et principalement de son utilisation dans la production d'acide lactique. La biomasse lignocellulosique de l'OFI est composée d'hexoses et de pentoses et son utilisation comme substrat bon marché représente une voie prometteuse de valorisation par la production de divers métabolites à haute valeur ajoutée. Cependant, peu de bactéries consomment efficacement les pentoses. Dans le but de fermenter ces derniers, des souches lactiques ont été testées pour leur capacité à fermenter le xylose. Une bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* isolée à partir de lait de chamelle a été retenue pour sa meilleure performance.

La source potentielle de sucres de la biomasse lignocellulosique des cladodes d'OFI est sous forme de cellulose et d'hémicelluloses exploitables pour la production d'acide lactique. Cette bioconversion fait intervenir trois étapes clés : une étape de prétraitement de la matière première, une étape d'hydrolyse enzymatique ou chimique, enfin, une étape de fermentation.

Afin d'optimiser l'hydrolyse acide de cladodes d'OFI (COFI) et récupérer le maximum de sucres fermentescibles, des méthodes statistiques de surfaces de réponse ont été appliquées. Un modèle statistique Composite Centré (CCD) a été réalisé pour l'hydrolyse de COFI par l' H_3PO_4 . La concentration de sucres obtenue est de 15,6 g/L. La production d'acide lactique à partir de l'hydrolysate acide enrichi en sels et en extrait de levure a permis d'obtenir 7,28 g/L d'acide lactique avec une productivité de 0,27 g/L.h et un rendement de 60%. Un modèle box behnken a été appliqué pour l'hydrolyse acide de COFI par l'HCl. Près de 28 g/L de sucres sont obtenus.

Un procédé conventionnel, d'hydrolyse enzymatique de COFI et de COFI₃₅₀ a été conduit également dans des conditions optimales par la cellulase. Plusieurs fermentations par *Lactobacillus plantarum* ont été réalisées : à partir de (i) l'hydrolysate acide de COFI₃₅₀, (ii) l'hydrolysate enzymatique de COFI₃₅₀ (hydrolyse acide suivie d'une hydrolyse enzymatique), les quantités d'acide lactique obtenues sont respectivement 6,4 et 9,17 g/L.

Enfin l'extrait de pelures de fruit d'OFI est très favorable à la croissance de *Lactobacillus plantarum* et à la production d'acide lactique. Près de 24 g/L d'acide lactique ont été obtenus avec une productivité de 0,95 g/L.h et un rendement de 78%.

Mots clés : *Opuntia ficus indica*, biomasse lignocellulosique, acide lactique, *Lactobacillus plantarum*, plans pour surfaces de réponse.

Abstract

This thesis is part of the context for the valuing of the lignocellulosic biomass of *Opuntia ficus indica* (OFI) and mainly of its use in the production of lactic acid. The lignocellulosic biomass of OFI is composed of hexoses and pentoses and their use as a cheap substrate represents a promising way of valorization through the production of various high value-added metabolites.

However, few bacteria efficiently consume pentoses ; In order to ferment these last ones ; lactic strains were tested for their ability to ferment xylose. A lactic bacterium *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk was selected for its better performance.

The potential source of sugars in the lignocellulosic biomass of OFI cladodes is in the form of cellulose and hemicelluloses that can be used for the production of lactic acid. This bioconversion involves three key steps: a raw material pre-treatment step, an enzymatic or chemical hydrolysis step, and finally, a fermentation step.

In order to optimize the acid hydrolysis of cladodes of OFI (COFI) and recover the maximum of fermentable sugars, statistical response surface methods were applied. A Centered Composite (CCD) statistical model was carried out for the hydrolysis of COFI by H_3PO_4 . The concentration of sugars obtained is 15,6 g/L. The production of lactic acid from the acid hydrolyzate enriched with salts and yeast extract made it possible to obtain 7,28 g/L of lactic acid with a productivity of 0,27 g/L.h and a yield of 60%. A behnken box model was applied for the acid hydrolysis of COFI by HCl. Nearly 28 g/L of sugars are obtained.

A conventional process, of enzymatic hydrolysis of COFI and of COFI₃₅₀ was also carried out under optimal conditions by cellulase. Several fermentations by *Lactobacillus plantarum* were carried out: from (i) the acid hydrolyzate of COFI₃₅₀, (ii) the enzymatic hydrolyzate of COFI₃₅₀ (acid hydrolysis followed by enzymatic hydrolysis), the quantities of lactic acid obtained are 6,4 and 9,17 g/L respectively.

Finally, OFI fruit peel extract is very favorable to the growth of *Lactobacillus plantarum* and the production of lactic acid. Nearly 24 g/L of lactic acid were obtained with a productivity of 0,95 g/L.h and a yield of 78%.

Keywords: *Opuntia ficus indica*, lignocellulosic biomass, lactic acid, *Lactobacillus plantarum*, Response surface methodology.

المخلص

يعد هذا العمل المطروح جزءاً من سياق تتمين الكتلة الحيوية lignocellulosique من التين الشوكي (OFI) وبشكل أساسي لاستخدامها في إنتاج حمض اللاكتيك. تتكون الكتلة الحيوية lignocellulosique للتين الشوكي من ستة وخمسة سكريات واستخدامها كركيزة رخيصة يمثل طريقة واعدة للتأمين من خلال إنتاج نواتج مختلفة ذات قيمة مضافة عالية. ومع ذلك، فإن القليل من البكتيريا تستهلك بكفاءة الخمس السكريات. ولهذا، تم اختبار سلالات اللاكتيك لقدرتها على تخمير السليلوز. ومن بينهم تم اختيار بكتيريا (*Lactobacillus plantarum*) المعزولة من حليب الإبل لأدائها الأفضل.

المصدر المحتمل للسكريات في الكتلة الحيوية lignocellulosique لنبات التين الشوكي : السليلوز والهيميسليلوز الذي يمكن استغلاله لإنتاج حمض اللاكتيك. يتضمن هذا التحويل الحيوي ثلاث خطوات رئيسية: خطوة المعالجة المسبقة للمواد الخام، وخطوة التحلل المائي الأنزيمي أو الكيميائي، وأخيراً، خطوة التخمير.

من أجل تحسين التحلل المائي الحمضي لنبات التين الشوكي واستعادة الحد الأقصى من السكريات القابلة للتخمير بواسطة تطبيق طرق سطح الاستجابة الإحصائية. تم تنفيذ نموذج إحصائي مركب مركزي (CCD) للتحلل المائي الحمضي لنبات التين الشوكي بواسطة حمض الفوسفوريك (H_3PO_4). تركيز السكريات المتحصل عليها هو 15.6 جم / لتر. إنتاج حمض اللاكتيك من التحلل الحمضي المخصص بالأملاح وخالصة الخميرة الحصول على 7.28 جم / لتر من حمض اللاكتيك بإنتاجية 0.27 جم / لتر / ساعة وعائد 60%. تم تطبيق نموذج box-behnken لتحلل المائي الحمضي لـ COFI بواسطة HCl. يتم الحصول على ما يقرب من 28 جم / لتر من السكريات.

تم إجراء عملية تقليدية للتحلل المائي الأنزيمي لـ COFI و COFI₃₅₀ أيضاً في ظل الظروف المثلى بواسطة السليلوز. تم إجراء العديد من عمليات التخمير بواسطة *Lactobacillus plantarum*: من (1) التحلل الحمضي لـ COFI₃₅₀، (2) التحلل الأنزيمي لـ COFI₃₅₀ التحلل المائي الحمضي متبوعاً بالتحلل المائي الأنزيمي، كميات حمض اللاكتيك التي تم الحصول عليها هي 6.4 و 9.17 جم / لتر على التوالي.

أخيراً، يعد مستخلص قشر فاكهة التين الشوكي مناسباً جداً لنمو *Lactobacillus plantarum* وإنتاج حمض اللاكتيك. تم الحصول على ما يقرب من 24 جم / لتر من حمض اللاكتيك بإنتاجية 0.95 جم / لتر في الساعة وعائد 78%.

الكلمات المفتاحية : *Opuntia ficus indica*، الكتلة الحيوية lignocellulosic، حمض اللاكتيك، *Lactobacillus plantarum*، خطط لأسطح الاستجابة.