

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



Domaine : **SCIENCE DE LA MATIERE**

Filière : **CHIMIE**

Spécialité : **CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT**

Mémoire de Master

Thème

**CULTURE DE CHLORELLA-VULAGRIS SUR DES EFFLUENTS
LIQUIDES LAITIERS DE L'INDUSTRIE FROMAGERE POUR LA
PRODUCTION DU BIODIESEL**

Présenté par : **BELKACEMI Lila**

GHOBRINI Zakaria

Soutenu publiquement, le 15/07/2021 devant le Jury composé de :

<i>Nom</i>	<i>Prénom</i>	<i>Grade</i>	<i>Affiliation</i>	<i>Qualité</i>
<i>M^{me} CHEIKH.</i>	<i>Assira</i>	<i>MCB</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Président</i>
<i>M^{me} ALI.</i>	<i>Oumsaad</i>	<i>MCB</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Examinateur</i>
<i>M^{me} MAZARI.</i>	<i>Tassadit</i>	<i>Professeur</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M. GHOBRINI.</i>	<i>Djillali</i>	<i>Maitre de Recherche</i>	<i>URAER</i>	<i>Promoteur</i>

Session 2020 / 2021

Nous tenons à remercier notre promoteur M.D.Ghobrini, Maître de Recherche à l'Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables à Ghardaïa, de nous avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir partagé avec nous sa passion pour ce projet. On vous remercie pour vos précieux conseils, votre soutien et le savoir que vous nous avez transmis, pour ce beau voyage dans l'univers des microalgues.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas cette ampleur sans l'aide et l'encadrement de Mme T. MAZARI, Professeur au Département de Chimie, Faculté des Sciences, UMMTO. On la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, ses précieux conseils, ses remarques pertinentes, son dévouement et sa disponibilité tout au long de la préparation de ce mémoire malgré ses charges académiques et administratives.

Nous tenons aussi à remercier les membres du jury pour leur précieux temps accordé à lire et évaluer notre travail et pour l'honneur qu'ils nous font de partager avec nous ce grand jour !



SOMMAIRE

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

Introduction Générale.....	01
Chapitre 01 Aperçu bibliographiques	
Volet 01 :Les biocarburants,urgence et nécessité	
CONTEXTE ET ENJEUX DE L'ETUDE.....	04
I.GENERALITES SUR LES BIOCARBURANTS.....	04
I.1 Definition	05
I.2 Impact des biocarburants sur l'environnement	05
I.3 Generalites des biocarburants et procedes de transformations	06
I.3.1 Biocarburants 1 ^{er} generation	06
I.3.2 Biocarburants 2 éme generation.....	07
I.3.3 Biocarburants3 éme generation.....	08
II BIODIESEL 3 éme GENERATION	09
II.1 Reaction de transterefication	09
II.2 Composition du biodiesel	10
II.3Caracteristique du biodiesel.....	10
II.4 Avantage et Inconvenient du biodiesel	11
Volet 02 : Les Micro-Algue	
I GENERALITES SUR LES MINCROALGUES.....	13
I.1 Varietes des micro-algues	13
I.2 Classification des micro-algue	13
I.2.1 Les micro-algues	14
I.2.2 Les macro-algues	14
I.3 Mode de culture des micro-algues	15
I.3.1 Culture en betch	15
II.PRESENTATION CHLORELLA VULGARIS	16
II.1 Condition de culture de c.vulgaris	17
II.2 Mode de culture de c.vulgaris.....	17
III APPLACATION ET MARCHE DES MICRO-ALGUES	17

III.1 Traitement des eaux usées.....	18
III.2 Capture de CO ₂	19
III.3 Application en biogenergie	19
Volet 03 Lactosérum	
I GENERALITE SUR LACTOSERUM	21
I.1 Definition	21
I.2 Voies de production de lactosérum.....	21
I.3 Defirents type de lactosérum.....	21
I.3.1 Lactosérum doux.....	21
I.3.2 Lactosérum acide	21
I.4 Composition chimique de lactosérum.....	22
I.4.1 Lactose	22
I.4.2 Proteine	22
I.4.3 Minéraux	22
I.4.4 Vitamine.....	22
II LACTOSERUM ET POLLUTION DE L'ENVIRONNEMENT	23
III. VALORISATION DU LACTOSERUM	23
IV. LACTOSERUM MILIEU DE CULTURE POUR LES MICRO ALGUE	24

Chapitre 02 Procedure experimental

Presentation de la ville de METLLILI

I PRELEVEMENT.....	27
II OBSERVATION ET CARACTERISATION (SUIVI)	28
II.1 Analyse physicochimique.....	28
II.2 Analyse bioloquoque	29
III ISOLEMENTPURIFICATION ET IDENTIFICATION DES SOUCHES MICROALGALES.....	30
III.1 Preparationdu milieu de culture gélosé pour la culture en boite pétri.....	31
III.1.1 Procedure experimentale	32
III.1.2 Etape d'inoculation	33
IV CULTURE HETEROTROPHIE DE LA SOUCHE INDIGENE C.VULGARIS ISOLEE LOCALEMENT.....	33
IV.1 Condition de travail.....	34
IV.2 Pre-culture	34

IV.3 Préparation du lactosérum pour la culture algale.....	34
IV.4 La culture de la souche indigène c.vulgaris isolée localement	35
IV.5 Suivi de la croissance hétérotrophe de la souche sauvage c.vulgaris par gravimétrie....	35
IV.6 Détermination de la productivité volumétrique maximale de la biomasse	35
IV.7 Analyse du taux de glucose.....	37
IV.8 Mesure du pH.....	38
V RECOLTE ,EXTRACTION ET TRANSESTERIFICATION.....	38
V.1 Récolte.....	38
V.2 Extraction	38
V.3 Transesterification	39
VI.TECHNIQUE DE CARACTERISATION DU BIODIESEL.....	40
VI.1 Analyse physicochimique	40
VI.2 Analyses statistiques	40
<i>Chapitre 03 RESULTATS ET DISCUSSION</i>	
I REPARTITION ET ISOLEMENT DES SOUCHES	42
I.1 Analyse physicochimique des échantillons d'eaux.....	42
I.2 Répartition et prolifération des micro-algues.....	42
I.3 Identification des micro-algues	44
II DETERMINATION DE TAUX DU GLUCOSE	45
III DEVELOPEMENT DE LA SOUCHE INDIGENE C.VULGARIS SUR DES DEUX TYPES DE MILIEUX DE CULTURE BG11 MODIFIER ET LACTOSERUM.....	46
III.1 Etude de la culture de la souche indigène c.vulgaris	46
III.2 Variation de la teneur en sucre pendant la croissance hétérotrophe.....	48
III.3 Productivité de la biomasse de c.vulgaris dans différents milieux en condition hétérotrophe	50
III.4 Evolution de PH en culture hétérotrophe	51
IV EXTRACTION DES LIPIDES.....	51
V TRANSESTERIFICATION DES LIPIDES EXTRAITES ET PROPRIETES DU BIODIESEL PRODUIT	53
V.1 Résultats de la transesterification	53
V.2 Propriétés du biodiesel produit.....	54
CONCLUSION	55
<i>GLOSSAIRE</i>	
<i>LISTE DES REFERENCES</i>	



Liste Des Figures

CHAPITRE 01

Figure I.1 : Exploitation des biocarburants	06
Figure I.2 : Biocarburants de 1 ^{er} generation	06
Figure I.3 : Biocarburants 2 ^{ème} génération	08
Figure I.4 : Représentation chimique de la réaction de transestérification.....	09
Figure I.5 : Classification des micro algues.....	13
Figure I.6 : Composition biochimique des micro algues	14
Figure I.7 : Courbe de croissance théorique de microalgues	15
Figure I.8 : Image microscopique de <i>Chlorella vulgaris</i>	16
Figure I.9: Culture et application des micro algues.....	18
Figure I.10 : Utilisation de micro algues pour le traitement des eaux usées	18
Figure I.11: Différents procédés de valorisation de lactosérum	24

CHAPITRE 02

Figure II.1 : Récolte des échantillons d'eau contenant les micro-algues	27
Figure II.2 : Observation des espèces micro-algales dans les échantillons prélevés.....	28
Figure II.3 Multi-paramètre de type HANNA équipé de sondes	29
Figure II.4 : Manipulation au niveau de la hotte à flux laminaire verticale	30
Figure II.5 : Isolement de la souche de <i>Chlorella. Vulgaris</i> sur le milieu BG 11	31
Figure II.6 : Ajustement du pH.....	32
Figure II.7 : Autoclave SANO clav	32
Figure II.8: Milieu de culture coulé sur des boites de Pétri sous la hotte.....	33
Figure II.9 : Procédure d'isolement des souches micro-algales	33
Figure II.10: Préculture hétérotrophe de la souche indigène <i>C. vulgaris</i>	34
Figure II.11 : Combinaisons des milieux utilisées lors des essais.....	35
Figure II.12: Matériels utilisés lors de l'analyse gravimétrique.....	36
Figure II. 13 : Photographie de l'HPLC modèle Agilent série 1100.....	37

CHAPITRE 03

Figure III.1 : Observation au microscope optique de microalgues présentes dans les eaux de prélèvements (G x 40).....	43
Figure III.2 : Apparition de colonies de couleur verte au niveau des boites de Pétri.....	43
Figure III.3 : Purification de la souche sauvage de <i>C. vulgaris</i> par des repiquages en strie.....	44

Figure III.4 : Observation microscopique de <i>Chlorella vulgaris</i> GM2 localement isolée (Gx40)	45
Figure III.5 : Courbe d'étalonnage pour la détermination de taux du glucose (g/L)	46
Figure III.6 : Culture de la souche de <i>C. vulgaris</i> GM2 sur un agitateur orbital	46
Figure III.7 : Evolution de la biomasse (g/L) dans les différents milieux étudiés en fonction du temps (h).....	47
Figure III.8 : Evolution de la consommation de glucose par <i>C. vulgaris</i> GM2 durant la croissance hétérotrophe	49
Figure III.9 : Productivité en biomasse chez <i>C. vulgaris</i> (GM2) au niveau des trois milieux utilisés	50
Figure III.10 : Variation du pH des trois milieux de culture au cours de l'expérience	51
Figure III.11 : Proportion moyenne de lipides extraite à partir des différentes cultures de la souche indigènes <i>C. vulgaris</i> GM2	52



LISTE DES ABREVIATIONS

BSA : Albumine sérique.
BG11 : Blue Green
C. vulgaris : Chlorella vulgaris .
Ca : Calcium.
cm : Centimètre
CPG-SM :Chromatographie en phase gazeuse couplée spectrométrie de masse .
DBO : Demande biochimique en Oxygène
DCO : Demande chimique en Oxygène.
DME : Diméthyl éther
EMHV : Esters méthyliques d’huiles végétales
ETBE : Ethyl tertio butyl éther
GMP : Glycomacropeptide
GM2 :GHARDAIA METLILI 2
g/L : Gramme par litre
HPLC : High Performance Liquid Chromatography.
IC : Indice de cétane.
IgG : Immunoglobulines.
Kg : Kilogramme.
LF : Lactoferrine.
LS : Lactosérum.
MAG : Monoacylglycérol.
MBM : Modified basic medium (milieu basique modifié)
Mg : Magnésium.
min : Minute .
MSWW : Modified Salinite Waste water selenite (eaux uses modifier saline)
mm : Millimètre.
MTBE : Méthyl tertio butyl éther .
mol : Mole (unité de quantité de matière).
N : Azote.
PC : Pouvoir calorifique.
Pe : Point éclair.
PE : Point d’écoulement.

pH : Potentiel hydrogène.
psu : Practical salinity unit (unité de salinité)
PT : Point de trouble.
s : Seconde.
SWW : Salinite Waste water (eaux usées)
tpm : Tours par minute.
URAER : Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables.
UV : Ultraviolet.
VC : Viscosité cinématique.
WW : Waste water (eaux usées)
°C : Degré Celsius.
°D : Dornic (unité de mesure d'acidité du lait) .
µm : Micromètre.
α-LA : l'α-lactalbumine.
β-LG : β-macroglobuline
% : Pourcentage



Liste Des Tableaux

CHAPITRE 01

Tableau I.1: Taux de lipides dans quelques huiles	10
Tableau I.2 : Principaux EMHV contenus dans le biodiesel.....	10
Tableau I.3 : Comparaison des propriétés des différents biocarburants avec celles du diesel.....	11
Tableau I.4 : Avantages et inconvénients du biodiesel issu des micro-algues.....	11
Tableau I.5 : Composition chimique des micro-algues.....	14
Tableau I.6 : Caractéristiques physico-chimiques des lactosérums doux et acide.....	22

CHAPITRE 02

Tableau II.1 : La composition chimique du milieu BG11	30
Tableau II.2 : Préparation des solutions mères à partir des sels du BG11	31
Tableau II.3 : Préparation des solutions mères microéléments I et II.....	32
Tableau II.4 : La composition et les combinaisons utilisées lors des essais.....	35

CHAPITRE 03

Tableau III.1: Caractéristiques physicochimiques des eaux de prélèvement récoltées au niveau de la région de Metlili	42
Tableau III.2 : Résultats de la courbe d'étalonnage	45
Tableau III.3 : Teneurs en lipides obtenues à partir des différentes cultures de la souche indigène <i>C.vulgaris</i> GM2 extraits pour les différents milieux	52
Tableau III.4 : Propriétés du biodiesel obtenu	54



Introduction générale

La consommation mondiale du pétrole, dont sont dérivés l'essence et le diesel, est en augmentation depuis plusieurs dizaines d'années. Cela est principalement dû à l'expansion démographique et l'émergence économique de plusieurs pays. Aujourd'hui, l'augmentation du prix de pétrole et l'épuisement des ressources à moyen terme, s'ajoute à cela l'aggravation des émissions de gaz à effet de serre poussent la communauté internationale à chercher des technologies alternatives capables de réduire la dépendance en ces combustibles fossiles et plus important jouer un rôle dans la protection de l'environnement.

Au cours des dernières décennies, l'intérêt pour les micro-algues s'est accru en raison de leur capacité à produire des biocarburants dites de 3^{ème} génération comme le biodiesel qui sont directement incorporés dans les carburants. Actuellement le marché mondial des micro-algues devrait atteindre 1,1 milliard de dollars US dans quelques années. En effet, les micro-algues peuvent accumuler des niveaux importants de lipides (70 %) et de protéines sous certaines conditions de culture.

Par ailleurs, l'une des autres applications des micro-algues est la bio-remédiation des eaux usées, en fait leurs capacités à se développer dans un environnement difficile en utilisant n'importe quelle source de nutriments présents pour la production de biomasse en font un parfait agent de bio-remédiation.

Néanmoins, pour la plupart des produits (hors produits de grande valeur ajoutée) le problème le plus fréquent de la culture industrielle des micro-algues reste les coûts de production et de récolte trop onéreux pour assurer la rentabilité des procédés. C'est pourquoi de nombreux chercheurs tentent de trouver d'autres solutions qui seraient moins coûteuses pour augmenter la productivité des micro-algues, comme changer de procédé ou de trouver de nouveaux supports de culture dans un processus de développement durable.

De nos jours, les industries laitières sont très implantées dans le monde entier et font de gros profits. Toutefois, elles produisent beaucoup de déchets qui ne sont généralement pas recyclés, notamment les eaux usées de la fabrication du fromage à savoir le lactosérum (WW) En moyenne, 9 L de lactosérum sont obtenus lors de la production d'un kilogramme de fromage. Ces effluents ont des concentrations en sel importantes qui les rendent inutilisables pour toute application alimentaire sans un traitement au préalable.

A cet égard, une solution d'ordre économique et écologique est actuellement en phase d'étude. Cette solution consiste en le recyclage du lactosérum (SWW) pour en faire un milieu de culture où des micro-algues d'intérêt peuvent se développer. Ainsi, si une meilleure productivité qu'avec le milieu de culture habituel est obtenue sur ces effluents laitiers, les

industries auront une solution parfaite pour augmenter leur profit de manière durable. De plus, la composition en sels de ces effluents est adaptée à la production de micro-algues.

L'une des micro-algues les plus intéressantes sur un plan économique est *Chlorella vulgaris* qui est considérée comme une espèce référence. En effet, cette micro-algue d'eau douce présente des propriétés qui la rende attractive pour des applications industrielles comme:

- Une croissance rapide ;
- Un potentiel lipidique élevé (jusqu' à 40 %) ;
- Une capacité à se développer dans des eaux résiduaires.

Le présent travail porte sur la capacité d'une souche verte indigène de *C. vulgaris* isolée dans une oasis à Metlili (wilaya de Ghardaïa) à croître dans des effluents laitiers (SWW) mais aussi pour son potentiel à produire du biodiesel en conditions hétérotrophe. Ainsi, notre objectif sera de montré l'intérêt des microalgues comme alternative aux carburants fossiles, de démontré l'impact significatif du lactosérum sur la productivité et de prouver que ce dernier à une bonne influence sur la croissance et la production de lipide à faible coût dans les mêmes conditions que le milieu artificiel.

Ainsi, ce mémoire, sera décliné en trois chapitres et est organisé comme suit :

- Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Il traite de la situation actuelle des énergies fossiles et leurs impacts sur l'environnement, de l'intérêt de la biomasse, des biocarburants et les différentes caractéristiques et normes du biodiesel (1^{er} volet). De même qu'il dresse un état de l'art non exhaustif concernant les micro-algues ainsi qu'une brève présentation de la *Chlorella vulgaris* (2^{ème} volet). Au final, une présentation du milieu de culture, le lactosérum, a fait l'objet du 3^{ème} volet bibliographique.

- Chapitre 2 : Procédures expérimentales

Ce chapitre est relatif à la description des moyens matériels mais aussi des méthodes expérimentales ayant servis à la mise en pratique de cette étude.

- Chapitre 3 : Résultats et discussion

Ce chapitre sera consacré à la présentation des résultats expérimentaux obtenus et de leur discussion.

Nous terminons notre travail par une conclusion générale qui reprend l'essentiel des résultats retenues principalement sur l'importance des micro-algues dans la valorisation du lactosérum mais aussi sur l'importance de ces effluents dans la production d'huiles végétales à

faible coût pour le marché du biodiesel. Par ailleurs, des perspectives de recherche seront proposées pour une meilleure continuité de ces travaux.

CHAPITRE 01

Aperçu bibliographiques

VOLET1

LES BIOCARBURANTS ,urgence et nécessité

TABLE DES MATIERES

CONTEXTE ET ENJEUX DE L'ETUDE.....	04
I.GENERALITES SUR LES BIOCARBURANTS.....	04
I.1 Definition	05
I.2 Impact des biocarburants sur l'environnement	05
I.3 Generalites des biocarburants et procedes de transformations	06
I.3.1 Biocarburants 1 ^{er} generation	06
I.3.2 Biocarburants 2 ^e me generation.....	07
I.3.3 Biocarburants3 ^e me generation.....	08
II BIODIESEL 3 ^e me GENERATION	09
II.1 Reaction de transesterification	09
II.2 Composition du biodiesel	10
II.3Caracteristique du biodiesel.....	10
II.4 Avantage et Inconvenient du biodiesel	11

Chapitre 1 : Aperçu bibliographiques

Volet 1 : Les biocarburants, urgence et nécessité



L'épuisement des réserves pétrolières et l'augmentation de la concentration du gaz à effet de serre CO₂ sont les deux principaux problèmes connus liés à l'utilisation des carburants fossiles. De plus, la hausse de la demande mondiale en énergie se poursuivra dans les années à venir. Ainsi, les énergies fossiles devraient représenter encore 75% de l'énergie produite, ce qui provoquerait progressivement des modifications du climat à la surface de la planète tels que l'apparition des typhons, des sécheresses, des inondations, des tempêtes, etc. De ces faits, les biocarburants apparaissent comme un des moyens permettant à la fois une diminution de la dépendance au pétrole et une réduction de l'impact néfaste des moteurs automobiles sur l'environnement. Ces derniers font l'objet de ce premier volet théorique.

Rudolf Diesel né à Paris en 1858, est l'inventeur du premier moteur diesel en 1912. Il a déclaré que « le moteur diesel peut être alimenté avec des huiles végétales et sera en mesure de contribuer fortement au développement de l'agriculture des pays qui l'utiliseront » et a prédit que « l'utilisation d'huiles végétales comme combustible liquide pour moteurs peut sembler insignifiante aujourd'hui », mais que « ces huiles deviendront bientôt aussi importantes que le pétrole et le goudron de charbon



CŒNTEXTE ET ENJEUX DE L'ETUDE

Actuellement, le secteur des transports routiers est principalement basé sur l'utilisation du moteur thermique et des carburants fossiles. Simultanément aux polémiques à propos des réserves naturelles de pétrole brut, résultant en un cours instable du prix du baril, se posent les problèmes de pollution troposphérique et de l'effet de serre additionnel. Par conséquent de nombreux débats sont menés quant aux solutions alternatives possibles relatives aux différentes technologies de moyens de transport futures (électrique, hybride,) mais aussi sur le potentiel de différents carburants de substitution [1].

Dans ce contexte, l'ensemble des partenaires socioéconomiques et environnementales ont donc incité un effort important pour le développement de nouvelles filières de production de carburant non issue du pétrole, potentiellement renouvelables, de type bio ou agro-carburants, considérées comme solutions porteuses d'avenir. Elles permettent non seulement une indépendance au pétrole et aux autres combustibles fossiles mais aussi de protéger l'environnement en limitant notre empreinte carbone [2]. C'est le principe même du développement durable (satisfaire ses besoins sans nuire à ceux des générations futures).

I.GENERALITES SUR LES BIOCARBURANTS

On a souvent lié la naissance des biocarburants aux crises énergétiques telles que les chocs pétroliers ou les pénuries de carburants fossiles alors que, leurs premières utilisations remontent à la fin du 19e siècle. En effet, les chocs pétroliers (1973 et 1979) ainsi que la lutte contre les gaz à effet de serre ont provoqué juste la renaissance de l'intérêt pour les biocarburants [3].

I.1 Définition

Un biocarburant est un carburant liquide issu de la transformation des matières végétales telles que la betterave, le blé, le maïs, le colza, le tournesol, la pomme de terre [4].

Il existe deux grandes filières de production de biocarburants : la filière de l'éthanol et la filière des esters.

Selon la directive européenne N° 2003/30/CE du 8 mai 2003 il existe dix produits considérés comme biocarburants :

1-le bioéthanol ; 2-le biodiesel ; 3-le biogaz ; 4- le biométhanol ; 5-le biodiméthyléther (DME) ; 6-le bioéthyltertiobutyléther (ETBE) ; 7-le biométhyltertiobutyléther (MTBE) ; 8- les biocarburants synthétiques (issus de la biomasse) ; 9- le biohydrogène et 10- l'huile végétale pure. Toutefois, d'autres études [5] ont mis l'accent sur le potentiel prometteur d'autres dérivés de la biomasse comme biocarburants supplémentaires tels que :

- les bioalcools plus lourds que l'éthanol : le propanol, le butanol, le pentanol, l'hexanol ;
- le diméthyl carbonate ;
- d'autres éthers acycliques : diméthoxy méthane, méthyl-ter-amyl-éther ;
- les éthers cycliques de la famille du furane : le 2,5-diméthylfurane, le 2-méthylfurane ; de la famille du tétrahydrofurane : le 2-méthyltétrahydrofurane, le 2,5-diméthyltétrahydrofurane ; ou de la famille du tétrahydropyrane [2,6-8].

I.2 Impact des biocarburants sur l'environnement

Les biocarburants sont considérés comme de l'énergie renouvelable et peuvent être produits à partir de la biomasse alimentaire ou non-alimentaire. Ainsi, leur utilisation comme source énergétique ne devrait pas conduire à une augmentation de la concentration totale de CO₂ dans l'atmosphère car la biomasse utilise le carbone contenu dans le CO₂ pour sa croissance grâce au processus de la photosynthèse (Figure I.1). Cela conduit à un bilan en CO₂ nul lors de l'utilisation des biocarburants, à condition que les processus intermédiaires (la culture, le transport, la transformation, etc.) utilisent également des sources d'énergie renouvelables.

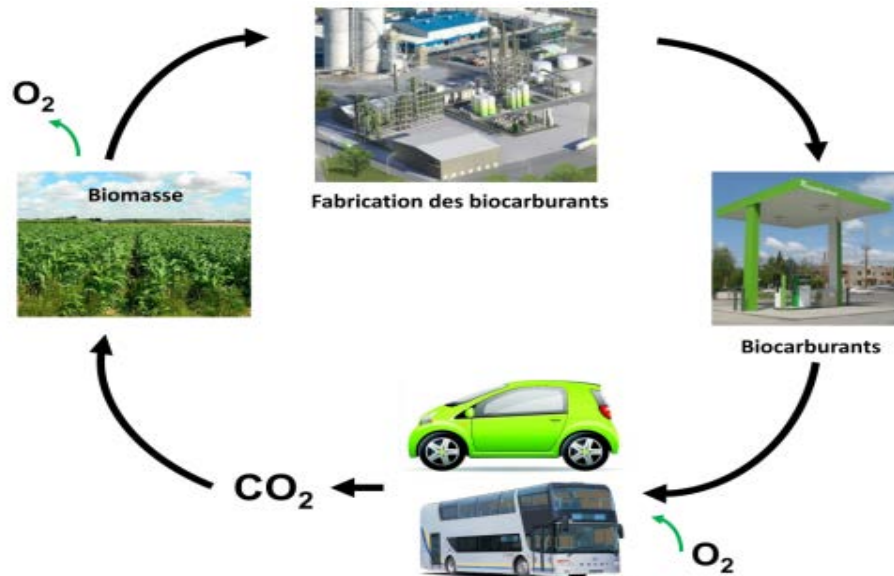


Figure I.1 : Exploitation des biocarburants : bilan $CO_2=0$ [9]

I.3 Générations de biocarburants et procédés de transformations

On distingue trois générations de biocarburants selon l'origine de la biomasse utilisée et les procédés de transformations associés.

I.3.1. Biocarburants 1^{ère} génération

Ils sont produits via deux processus (Figure 1.2) :

- Par fermentation de matières végétales comestibles telles que l'amidon (maïs, blé, pommes de terre...), les sucres (canne à sucre, betterave ...) pour fabriquer des alcools à savoir le bioéthanol utilisé dans les moteurs à essences [10].
- Par transestérification des lipides des huiles végétales ou des graisses animales pour produire des esters méthyliques ou éthyliques d'acides gras tel que le biodiesel [11].

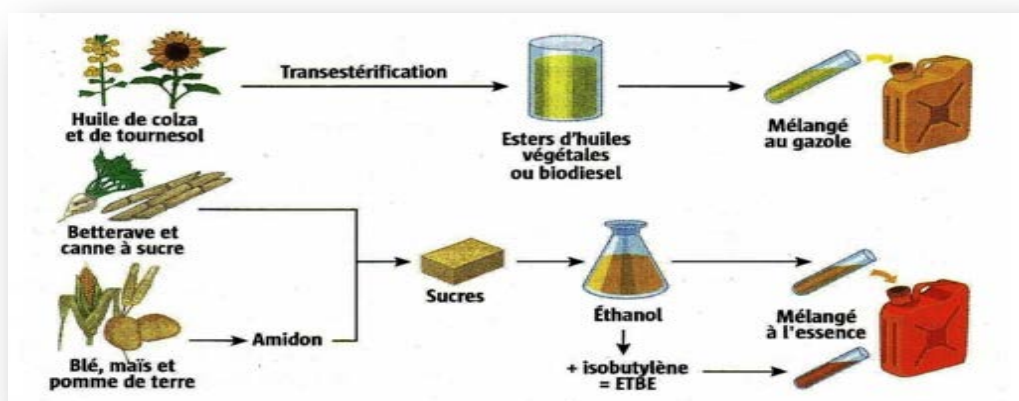


Figure I.2 : Biocarburants de 1^{er} generation

Limites d'utilisation

Malgré que les huiles végétales, l'éthanol et les esters d'huiles végétales sont disponibles sur le marché et les techniques de leur production ont atteint un niveau de maturité technologique important, le fait d'être issu de matières premières élémentaires pour les chaînes alimentaires animales ou humaines peut être une fatalité. Ainsi, inévitablement les deux secteurs, l'industrie alimentaire et la production des biocombustibles, se rivaliseront et entreront en compétition (concurrence) mais l'usage alimentaire demeurera toujours prioritaire.

A partir de cette réalité, la recherche et le développement d'une autre famille de biocarburants s'impose.

1.3.2 Biocarburants 2ème génération

Des technologies (procédés ou méthodes) ont été mises au point pour exploiter les matières cellulosiques telles que le bois, les feuilles et les tiges des plantes ou celles issues de déchets. On qualifie cette biomasse de ligno-cellulosique car elle provient de composants ligneux ou à base de carbone qui ne sont pas directement utilisés dans la production alimentaire. Ces caractéristiques présentent un avantage de disponibilité supérieure et de non concurrence alimentaire par rapport à la première génération de biocarburants [12]. Ces procédés conduisent à la production des biocarburants de deuxième génération, tel que le bioéthanol, le biodiesel, le bio hydrogène ou le biogaz, (figure I.3).

Ils sont produits via deux processus :

- Thermochimique (gazéification) pour produire du gaz de synthèse pour produire le méthanol, l'éthanol, le DME et des hydrocarbures [13].
- Biochimique pour produire de l'éthanol ou des éthers cycliques.

Il est à noter que ces technologies de production de biocarburant sont encore au stade soit de la recherche, soit du pilote industriel (semi pilote). Toutefois, dans un article paru le 07/12/2020 dans la revue Industrie Technologie, les responsables du projet BioTfuel à Dunkerque, ont annoncé le début de l'industrialisation des biocarburants 2^{ème} génération issus par voie thermochimique pour la fin de l'année 2021.

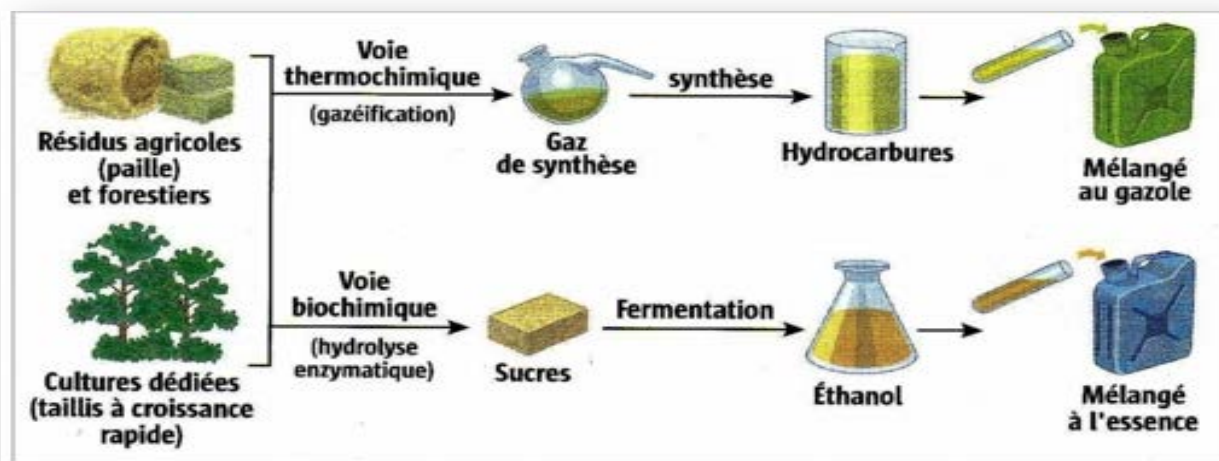


Figure I.3 : Biocarburants 2^{ème} génération (©DR, d'après source IFP)

Limites d'utilisation

Malgré la non comestibilité des matières cellulosiques, elles restent coûteuses, occupant des zones de plantation des terrains agricoles pouvant être consacrées à des matières alimentaires. Ainsi, une 2^{ème} alternative s'impose de nouveau à savoir l'utilisation de micro algues, biocarburants 3^{ème} génération. C'est dans cette optique que s'inscrit l'objectif principal de ce travail.

1.3.3 Biocarburants 3^{ème} génération

Ce troisième type de biocarburants dit de 3^{ème} génération est né à partir de la culture des micro- algues. De même que ceux de la première et deuxième génération, ils sont également produits via deux procédés :

- Transestérification des acides gras contenus dans les micro-algues ou hydrogénation pour produire du biodiesel [14] ;
- Fermentation des sucres contenus dans les micro-algues pour fabriquer de l'éthanol.

Cette troisième génération, semble être plus efficace et moins exigeante en ressources, et pourrait donc être une très bonne alternative aux deux premières générations. Ces avantages résident dans le fait que la culture des micro-algues ne mobilise pas de surfaces agricoles ou forestières comme le cas des 1^{ères} et 2^{èmes} générations. De plus, elle présente une productivité propre (sans pesticides ni additifs) et élevée. Enfin, ces microorganismes ne requièrent que de la lumière et du CO₂ pour pousser, voire de l'azote ou d'autres additifs peu coûteux. La production d'algo-carburants peut ainsi absorber une

partie des rejets industriels carbonés et être couplée au recyclage des eaux usées Elle est aussi continue tout au long de l'année indépendamment des saisons [15-16].

Il est important de souligner que génération de biocarburants en est encore au stade de la recherche mais s'avère très prometteuse.

Dans ce qui suit, nous nous intéresseront aux algo-carburants (biodiesel 3^{ème} génération) comme source d'énergie. Quant à la description des micro-algues (généralités), elles feront l'objet du volet deux de cette étude bibliographique.

II. BIODIESEL de 3^{ème} GENERATION

Le biodiesel est le deuxième biocarburant utilisé dans le monde après l'éthanol, employé dans les moteurs Diesel en remplacement ou en complément du gazole. Son avenir est prometteur, essentiellement en Europe, en raison de la diésélisation importante du parc automobile : environ les 2/3 des nouvelles voitures sont équipés d'une motorisation Diesel [9]

II.1 Réaction de Transestérification

Le biodiesel est formé par une réaction transestérification d'huiles végétales (triglycérides) en esters méthyliques d'huiles végétales(EMHV), en présence d'un alcool, généralement le méthanol ou l'éthanol, figure.1.4. Cette réaction peut être effectuée par catalyse homogène (soude, HCl, ...) mais aussi par catalyse hétérogène, avec des catalyseurs totalement insolubles, répondant ainsi aux nouveaux concepts de « chimie verte ». En effet, la pureté des produits obtenus et les rendements élevés impliquent l'absence de rejets polluants [thèse sur les gazols).

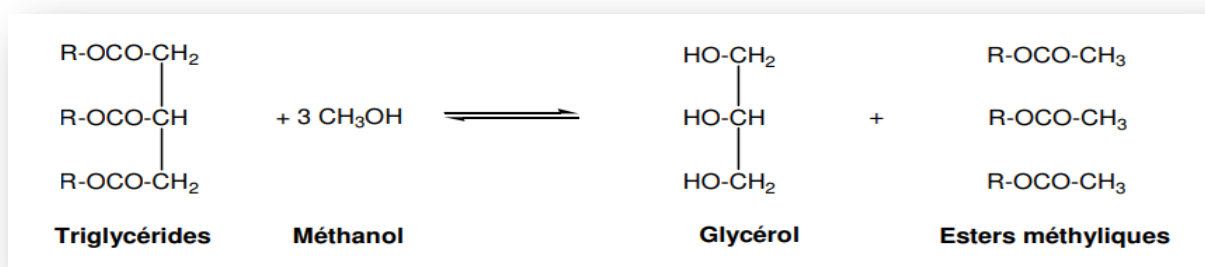


Figure 1.4 : Représentation chimique de la réaction de transestérification

Il est à noter que les micro-algues accumulent des quantités d'huiles (lipides) supérieures comparativement aux meilleures plantes terrestres jusqu'à 70 % de leur poids sec pour

certaines espèces (Tableau I.1). Ce qui fait des micro-algues de très bons candidats pour les réactions de transestérification.

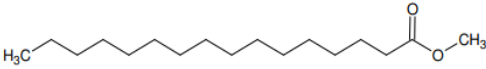
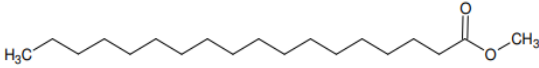
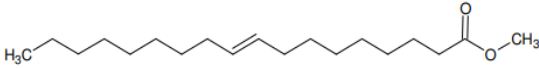
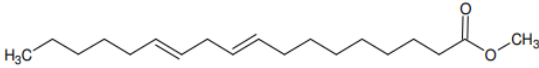
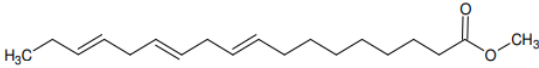
Tableau I.1: Taux de lipides dans quelques huiles [18]

Huile	Colza	Huile de palme	Microalgue
Productivité en lipides (T.ha ⁻¹ .an ¹)	0,5-0,6	4-7	40-60

II.2 Composition du biodiesel

Le biodiesel est composé d'un mélange d'esters méthyliques d'huiles végétales (EMHV), saturés et insaturés, contenus à des proportions variables suivant la matière première utilisée pour la synthèse du carburant. Le tableau 1 présente les proportions des EMHV contenus dans des carburants biodiesel issus de différentes sources végétales [19].

Tableau I.2 : Principaux EMHV contenus dans le biodiesel

Nom de l'EMHV	Formule développée	Désignation technique
Palmitate de méthyle (C ₁₇ H ₃₄ O ₂)		C16:0
Stéarate de méthyle (C ₁₉ H ₃₈ O ₂)		C18:0
Oléate de méthyle (C ₁₉ H ₃₆ O ₂)		C18:1
Linoléate de méthyle (C ₁₉ H ₃₄ O ₂)		C18:2
Linoléate de méthyle (C ₁₉ H ₃₂ O ₂)		C18:3

II.3 Caractéristiques du biodiesel

Les propriétés physicochimiques du biodiesel présentant le plus grand intérêt sont : le pouvoir calorifique (PC), le point éclair (Pe) flash point), le point de trouble (PT); cloud point), le point d'écoulement (PE; pour point), la viscosité cinématique (VC), l'indice de cétane (IC), l'indice d'acide, la teneur en cendres sulfatées, les résidus de carbone, les teneurs en eau ainsi qu'en sédiments, le glycérol libre et le glycérol total, la température limite de filtrabilité, la corrosion à la lame de cuivre, la stabilité à l'oxydation et la masse volumique..

Le tableau I.3 est un tableau de comparatif des propriétés des différents biocarburants [20].

Tableau I.3 : Comparaison des propriétés des différents biocarburants avec celles du diesel

	PC(Mj/Kg)	IC	VC(mm ³ /s)	Pe(°C)	PE(°C)	PT(°C)	Soufre(%masse)	Lubrlicité(25°C)
Diesel	40-45	40-55	1,9-3,8	60-80	-53 à-15	-20 à 0	0,01-0,04	0,238-0,509
Biodiesel2 ^{ème}	40-42	45-70	2,8-5,7	96-190	-5 à+10	-5 à +10	0,00-0,0024	0,114
Biodiesel3 ^{ème}	41	39-54	3,8-5,2	115-204			0,0069	

II.4 Avantages et inconvénients du biodiesel

Dans le tableau I.4 sont regroupés les principaux avantages et inconvénients liés à l'utilisation du biodiesel [21-22].

Tableau I.4 : Avantages et inconvénients du biodiesel issu des micro-algues

Avantages	Inconvénients
Energie verte et renouvelable	Coût de la culture, de la récolte et de traitement de la biomasse algale
Microorganismes biodégradable	Rendement encore très faible pour être rentable à l'échelle industrielle
Productivité surfacique élevée	Recours aux conditions de carence pour induire l'accumulation de produits riches en énergie
Composition de la biomasse flexible	Pas d'amélioration génétique (adaptation aux systèmes de culture)
Peu de compétition avec la production alimentaire	
Peu de compétition avec les ressources en eau	
Recyclage de déchets urbains (N,P,S,...) ou industriels (CO ₂) (consommation du CO ₂ dans la photosynthèse).	

VOLETO2

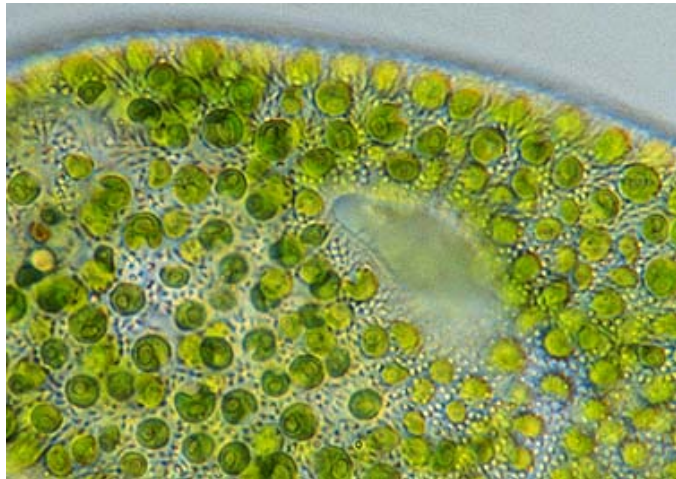
MICRO-Algue

TABLE DES MATIERES

I GENERALITES SUR LES MINCROALGUES	13
I.1 Varietes des micro-algues	13
I.2 Classification des micro-algue	13
I.2.1 Les micro-algues	14
I.2.2 Les macro-algues	14
I.3 Mode de culture des micro-algues	15
I.3.1 Culture en betch	15
II.PRESENTATION CHLORELLA VULGARIS	16
II.1 Condition de culture de c.vulgaris	17
II.2 Mode de culture de c.vulgaris.....	17
III APPLACATION ET MARCHE DES MICRO-ALGUES	17
III.1 Traitement des eaux usées.....	18
III.2 Capture de CO ₂	19
III.3 Application en biogennergie	19

Chapitre 1 : Aperçu bibliographiques

Volet 2 : Les Micro algues



Ce second volet théorique n'est autre qu'une présentation non exhaustive des micro algues, généralités, composition, culture, mode de culture, quelques applications en particulier dans le domaine environnemental et une bref présentation de la Chlorella vulgaris, variété étudiée dans la suite de ce travail.

I. GENERALITES SUR LES MICRO-ALGUES

Les micro-algues encore nommés phytoplancton, sont des microorganismes aquatique, photosynthétiques, unicellulaires, de l'ordre du micromètres (3 μ m - 12 μ m). De forme ellipsoïde ou ronde, elles se trouvent dans tous les habitats aquatiques, marins ou d'eaux douces.

Ces micro-organismes sont à l'origine de l'équilibre de la composition atmosphérique entre la fixation de dioxyde de carbone et le rejet d'oxygène, contribuant ainsi à la continuité de la vie animale et végétale [23]. En effet, en plus de leur résistance aux condition climatique extrême, grâce à la photosynthèse, elles sont capables de recycler le dioxyde de carbone en oxygène et de convertir l'énergie solaire en une matière première constituant la base de la chaîne alimentaire des autres êtres vivants.

I.1 Variétés des micro-algues

Les micro-algues sont très diversifiées et environ 30000 espèce ont déjà été analysées, ce nombre représente moins de 10 % du totale existant qui est lui entre 200000 à 1 millions [24].

Ces dernières peuvent être soit autotrophe c'est à dire qu'elles synthétisent de la matière organique grâce à la photosynthèse. Soit hétérotrophe c'est à dire qu'elles usent de matière organique pour se nourrir. Certaines micro-algues se nourrissent de CO₂ et d'éléments inorganique, comme l'ammonium ou les minéraux pour synthétiser de la matière organique elles sont dites alors micoyrophes [25].

I.2 Classifications des algues

Les algues sont classées selon leur taille (micro et macroalgues), selon leurs pigments, les caractéristiques de leurs parois et leurs compositions. La classification moderne des algues accorde une importance prépondérante aux critères biochimiques (nature des pigments, des matières de réserve et des parois cellulaires) et cytologiques (organisation cellulaire, présence d'organites particuliers), figure I.5 [26]. En revanche, la classification traditionnelle est juste basée sur la pigmentation : verte, marron, et rouge [27].

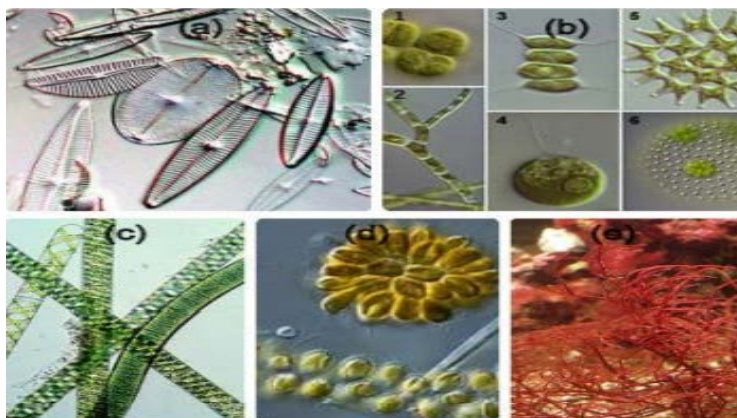


Figure I.5 : Classification des micro-algues

1.2.1 Les macro-algues

Ce sont des organismes visibles dont l'existence est nécessaire aux écosystèmes en termes de fonction, productivité et composition utilisés dans des procédés de transformation pour produire de l'énergie : par combustion, par pyrolyse et par digestion anaérobie [28].

1.2.2 Les micro-algues

Considérées comme des algues unicellulaires, elles se développent notamment en suspension dans des solutions aqueuses . Leur capacité d'adaptation leur permet de coloniser tous types de milieux, eaux salées, douces, saumâtres, usées, des surfaces rigides (trunks d'arbre), des murs [29].

Les microalgues peuvent engendrer des quantités importantes de lipides, de sucres et de protéines grâce à la photosynthèse. Le tableau I.5 recense la composition chimique de certaines espèces de micro algues et la figure I.6 la composition biochimique

Tableau I.5 : Composition chimique des micro-algues [30]

Micro-algue	Protéines (%)	Polysaccharides (%)	Lipides (%)
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

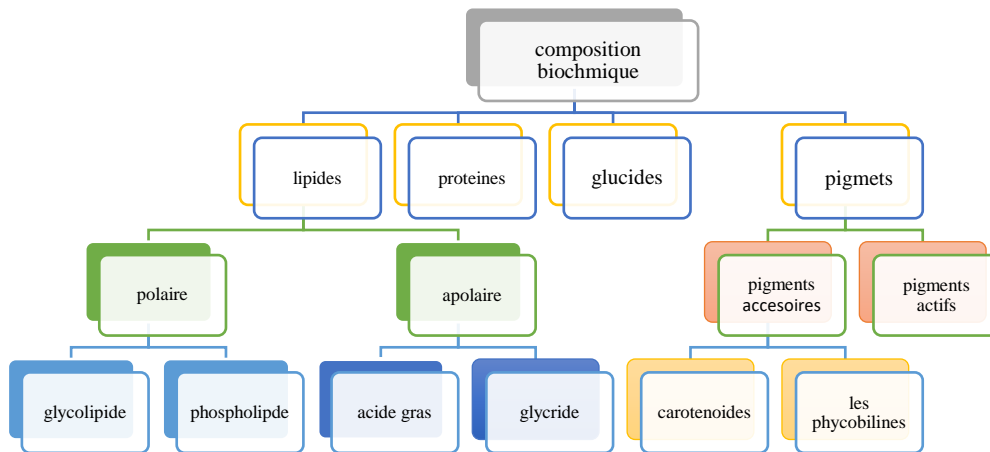


Figure I.6 : Composition biochimique des micro algues

I.3.Mode de culture des micro algues

Il existe deux modes de cultivation des micro algues : mode continu et mode batch.

I.3.1 Culture en batch

Un inoculum de microalgues est ajouté à un volume de milieu. Durant toute la culture, les éléments essentiels ajoutés vont être consommés par les algues et leurs concentrations vont diminuer dans le milieu. Quand la concentration de biomasse désirée est atteinte, la culture est arrêtée et la biomasse est récoltée.

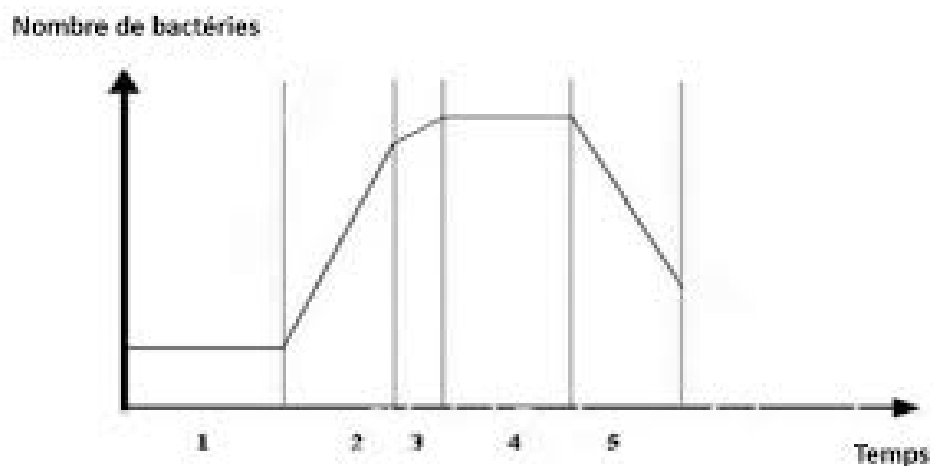


Figure I.7 : Courbe de croissance théorique de microalgues [31]

- **Phase de latence (1) :** au cours de cette phase qui dure de quelques heures à plusieurs dizaines d'heures, le taux de croissance est très faible.

- **Phase d'accélération (2)** : les cellules commencent à se multiplier jusqu'à atteindre leur taux de croissance maximal, à ce stade les facteurs de croissance n'étant pas limitant .
- **Phase de croissance exponentielle (3)**: la croissance est exponentielle et est maintenue constante jusqu'à ce que la composition du milieu ne soit plus optimale.
- **Phase stationnaire (4)** : un des éléments du milieu (lumière, azote, phosphore, carbone,...) devient limitant, et en conséquence la vitesse de croissance diminue, les quantités de cellules qui se divisent et qui meurent sont égales, ce qui produit un plateau de croissance. Les lipides et les glucides peuvent continuer à s'accumuler dans cette phase.
- **Phase de décroissance (5)** : la plupart des cellules ont épuisé leurs réserves intracellulaires de composants et elles n'ont plus suffisamment d'énergie à leur disposition pour poursuivre la maintenance cellulaire et meurent.

Ces différentes phases ne sont toutefois pas toujours aussi distinctes ; quelque fois certaines peuvent se raccourcir ou se prolonger les rendant plus difficilement reconnaissables [31].

I.3.2 Culture en continu

Le mode continu quant à lui correspond à un mode où la récolte se fait en continu sans arrêt, le principe repose sur l'application d'un flux entrant, contenant les éléments nutritifs, à un système de culture de volume constant contenant les micro-algues. Par conséquent, le flux d'entrée impose au système un flux sortant de même débit correspondant à la production en biomasse algale [32]. Le but de la culture en continu est de maintenir la concentration cellulaire stable. Plusieurs recherches ont montré que différentes espèces cultivées dans des systèmes continus ou semi-continus montrent une productivité plus importante que lorsqu'elles sont cultivées en batch [33].

Avant de passer aux applications des micro algues il est important de présenter la variété étudiée dans le cadre de ce travail ainsi que son mode de culture.

II. PRÉSENTATION DE CHLORELLA VULGARIS

C'est une micro algue verte d'eau douce de la classe des chlorophycées. Découverte par le hollandais M.W. Beijerinck en 1890. *C. vulgaris*, de taille variant de 3 à 5 µm, elle se trouve sous deux formes ronde ou ellipsoïdale [34]. Son mode de reproduction est de nature asexuée, ainsi, la cellule-mère se divise en quatre spores qui s'échappent et germent pour

donner un organisme identique à celui qui les a produites [33].



Figure I.8 : Image microscopique de *Chlorella vulgaris* [35]

II.1 Conditions de culture de *Chlorella vulgaris*

Les conditions optimales pour la culture de la *Chlorella vulgaris* sont : température=25°C, intensité lumineuse= 20,4-2400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH=6,5, salinité variable et l'agitation par injection d'air avec ou sans enrichissement en CO_2 . De plus, la concentration des/en nutriments et la source de carbone inorganique ou organique sont aussi des paramètres à prendre en considération.

II.2 Modes de culture de *Chlorella vulgaris*

Ces microorganismes peuvent croître sous divers modes de culture :

Autotrophe : un mode basé sur la photosynthèse, ainsi, les micro algues consomment le CO_2 pour la synthèse de la matière organique via la photosynthèse.

Hétérotrophe : ce mode est spécifique aux organismes qui peuvent fonctionner sans lumière en utilisant, pour se développer, l'énergie chimique et le carbone issus d'autres matières organiques. La production est effectuée en mode fermé dans des bioréacteurs semblables à des fermenteurs. Avec des niveaux élevés de productivité, ce mode est très prometteur pour la production de biocarburants [36]. Toutefois, cette approche, relativement coûteuse, dépend de nutriments agroalimentaires, ce qui en limite l'application à la production de substances à hautes valeurs ajoutées comme certains suppléments alimentaires ou produits pharmaceutiques spécifiques [37].

Mixotrophe : c'est un mode de culture combinant l'autotrophie et l'hétérotrophie. Il permet d'obtenir une grande quantité de biomasse ainsi qu'un taux de croissance élevé en même temps que la production de métabolites photosynthétiques [38].

III. APPLICATION ET MARCHÉ DES MICRO-ALGUES

En industrie l'utilisation des micro-algues peut être divisée en trois parties : la production de biomasse à but alimentaire, la production de molécules spécifiques dites à haute valeur ajoutée (composés biochimique) et les applications environnementales, figure I.9.

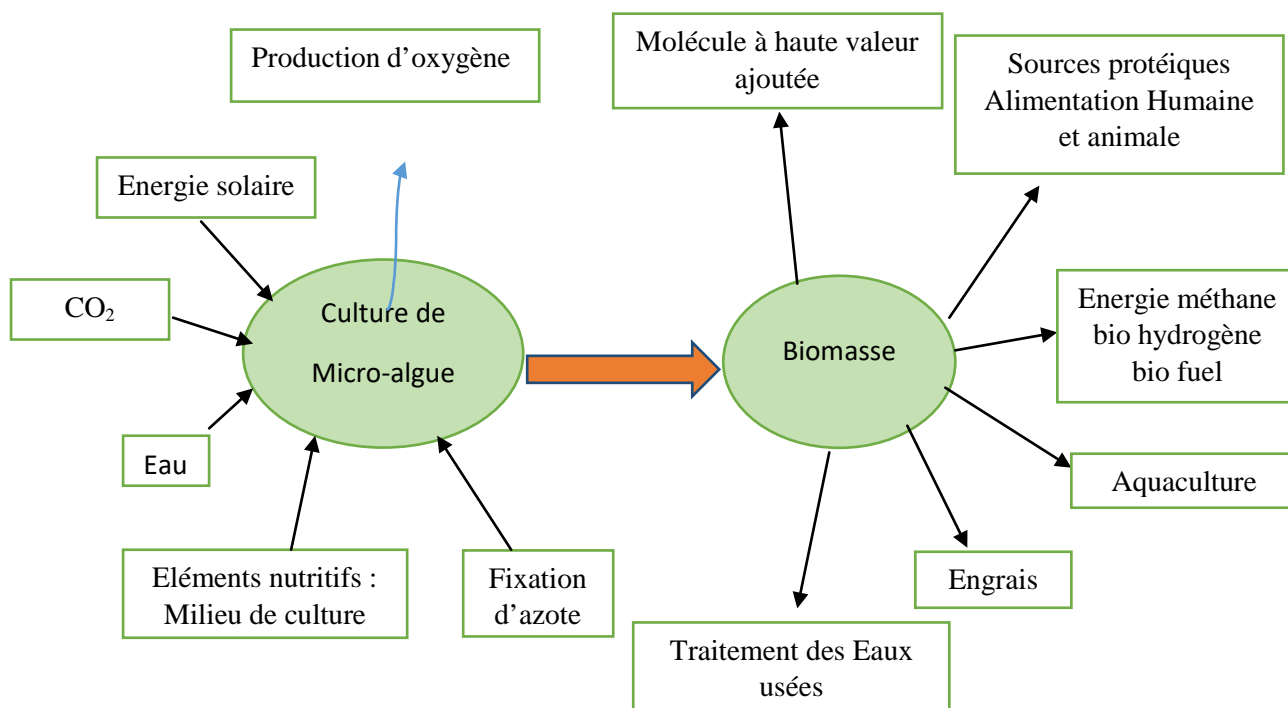


Figure I.9: Culture et application des micro algues

Comme le panel des secteurs d'utilisation des micro algues est vaste, nous nous limiterons juste au domaine environnemental à savoir : dépolluer les eaux usées, capturer et valoriser le CO₂ et produire de l'énergie propre.

III.1 Traitement des eaux usées

Les micro-algues peuvent agir de deux façons soit directement, en se servant de leur capacité à fixer certains métaux lourds ainsi que d'autres composés organiques toxiques, soit indirectement, pour fournir de l'oxygène dissous aux bactéries qui se chargeront de dépolluer l'eau contaminée [39-40], (figure I.10).



Figure I.10 : Utilisation de micro algues pour le traitement des eaux usées

Il est à noter que la culture des micro algues en eaux usées combine l'avantage de traiter ces dernières en produisant au même temps de la biomasse algale qui peut être exploitée pour produire d'autres molécules intéressantes ou de l'énergie comme ça été le cas dans la suite de ce travail (voir chapitre 2).

III.2 Capture de CO₂

Un des principaux avantages de la culture des micro-algues réside sur la capacité de la photosynthèse à absorber le CO₂, qui est ensuite converti en biomasse, lipides, ou bioproduits précieux. Le CO₂ émis par les centrales thermiques, les industries de la sidérurgie, cimenterie, pétrochimie ou tout autre secteur peut donc être utilisé pour la culture industrielle des micro-algues. Cela permet d'obtenir à la fois la réduction des émissions de gaz à effet de serre, la production de combustibles au bilan carbone neutre et des bioproduits valorisables. Un démonstrateur a été réalisé en Israël par Sémiotique où les fumées sortant de la centrale électrique au charbon d'Ashkelon sont directement injectées dans la culture [41].

III.3 Applications en bioénergie

Les micro-algues peuvent être une source d'énergie non négligeable. Comme toute biomasse, celles-ci peuvent produire du biogaz par méthanisation. Certaines micro-algues sont riches en sucre et peuvent produire alors du bioéthanol. D'autres riches en lipides permettront la production de biodiesel. Parmi ces différents scénarios, la production de biogaz et de biodiesel semblerait être les plus pertinentes sans déforestation ni compétition avec les

cultures alimentaires [42]. Des détails supplémentaires sur cette application sont citées dans le volet1 de ce chapitre.

VOLET 03

LACTOSERUM

TABLE DES MATIERES

I GENERALITE SUR LACTOSERUM	21
I.1 Definition	21
I.2 Voies de production de lactosérum.....	21
I.3 Defirents type de lactosérum.....	21
I.3.1 Lactosérum doux.....	21
I.3.2 Lactosérum acide	21
I.4 Composition chimique de lactosérum.....	22
I.4.1 Lactose	22
I.4.2 Proteine	22
I.4.3 Minéraux	22
I.4.4 Vitamine.....	22
II LACTOSERUM ET POLLUTION DE L'ENVIRONNEMENT	23
III. VALORISATION DU LACTOSERUM	23
IV. LACTOSERUM MILIEU DE CULTURE POUR LES MICRO ALGUE	24

Chapitre 1 : Aperçu bibliographiques

Volet 3 : Le lactosérum



*Ce dernier volet théorique est une introduction au lactosérum, milieu de culture, utilisé dans la partie expérimentale pour cultiver la *Chlorella vulgaris*. On y trouve ainsi quelques informations, jugées utiles pour la suite de ce travail à savoir : la composition chimique et les propriétés du lactosérum, son impact sur l'environnement et enfin quelques voies de valorisation.*

I. GENERALITES SUR LE LACTOSERUM

I.1 Définition

Le lactosérum ou sérum, encore appelé petit lait, est un sous-produit laitier, liquide de couleur jaune verdâtre due à la riboflavine (vitamine B2), obtenu produit en quantités faramineuses pendant la production du fromage, de la caséine ou de produits similaires. Il contient toutes les substances solubles du lait : eau, lactose, protéines et minéraux solubles avec très peu ou quelques traces de matière grasse [43]. Il a longtemps été considéré comme un déchet encombrant car à la fois très polluant et produit en grandes quantités. Ainsi, il représente entre 85 à 90 % du volume initial du lait utilisé et contient environ 50 à 55 % de ses constituants initiaux.

I.2 Voies de production du lactosérum

En industrie fromagère, le lactosérum est produit comme suit :

D'abord, le fromage frais ou affiné, est obtenu par coagulation du lait, grâce à l'action de la caille ou la chymosine (coagulation enzymatique) ou d'autres agents coagulants comme les levains ou les ferments lactiques. Après son égouttage, le lactosérum est généré.

En industrie des caséines (caséinerie), le lactosérum est produit comme suit :

D'abord, la caséine est préparée à partir du lait écrémé coagulé par voie acide en utilisant soit des bactéries lactiques, de l'acide lactique ou bien des acides minéraux (H_2SO_4/HCl). Après égouttage, la phase liquide obtenue est du lactosérum, semblable dans sa composition à celle de la fromagerie.

I.3 Différents type de lactosérum

Ainsi, selon le procédé de coagulation du lait, deux types de lactosérum peuvent être distingués à savoir : lactosérum doux et lactosérum acide.

II.3.1 Lactosérum doux

Comme son nom l'indique le lactosérum doux est issu de la fabrication du fromage à pâte cuite, à pâte pressé et de la caséine, après le traitement du lait par voie enzymatique, généralement par la présure, avec un pH variant entre 5,7 et 6,5 avec une acidité varie entre 15 et 22°D (Dornic) [44].

II.3.2 Lactosérum acide

C'est la phase aqueuse résultant de la fabrication des fromages à pâtes molles ou fraîches ou de caséines, pour lesquels le caillage à lieu sans emprésurage c'est-à-dire par acidification (coagulation lactique) d'où leur nom. Le pH du lactosérum acide varie entre 4 et 5,5 avec une acidité supérieure à 22°D [45].

I.3 Composition chimique et biochimique du lactosérum

Le lactosérum est un substrat constitué majoritairement d'eau avec un contenu organique et minéral très diversifié. Cette composition est fonction de la source du lait utilisée qui elle-même dépend de la race de l'animal et de son alimentation. De plus, la composition est liée aux procédés d'obtention et aux traitements utilisés.

I.3.1 Lactose

Le lactose représente 70 à 80% de matière sèche du lactosérum. Il est ainsi considéré comme la source de carbone et d'énergie pour les microorganismes dans un milieu de culture au cours de la fermentation [46].

I.3.2 Protéine

Les protéines de lactosérum, représentent 0,6 à 0,7 % de sa matière sèche, ont une très grande valeur nutritionnelle en raison de leur richesse en acides aminés essentiels tels que la lysine, tryptophane et la méthionine. On trouve particulièrement la β -macroglobuline (β -LG), l' α -lactalbumine (α -LA), le glycomacropeptide (GMP), les immunoglobulines (IgG), l'albumine sérique (BSA) et la lactoferrine (LF) [47].

I.3.3. Minéraux

Le lactosérum de part ses constituants minéraux et particulièrement le Ca et le P (7 à 12 % de la matière sèche) et au regard de ses teneurs très appréciables qui varient selon le type doux ou acide, constitue une source de très grande importance dans la couverture des besoins quotidiens de l'organisme

I.3.4. Vitamines

Les vitamines sont en majorité hydrosolubles appartenant au groupe B, la riboflavine (B2), la thiamine (B1), la Pyridoxine (B6), la niacine(B3), l'acide pantothénique (B5), l'acide folique ou folate (B9), la cobalamine ou cyanocobalamine (B12) ainsi que la vitamine C [48]. Le tableau I.6 résume les caractéristiques physico-chimiques en terme de composition des lactosérums doux et acide [49].

Tableau I.6 : Caractéristiques physico-chimiques des lactosérums doux et acide [50]

Caractéristiques physico-chimiques	Lactosérum doux (g/l)	Lactosérum acide (g/l)
pH	> 6,0	< 5,0
Matière sèche	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
Lactose	46,0 -52,0	44,0 - 46,0
Protéines	6,0 -10,0	6,0 - 8,0
Matière grasse	0,3 – 2,5	0,3 – 2,5
Calcium	0,4 - 0,6	1,0 - 1,6
Phosphate	1,0 -3,0	2,0 - 4,5
Lactate	2,0	6,4
Chlorure	1,1	1,1

II. LACTOSERUM ET POLLUTION DE L'ENVIRONNEMENT

Le lactosérum déversé ou rejeté dans les cours d'eaux conduit à la diminution de l'oxygène disponible dans l'eau avec des demandes biologique et chimique en oxygène (DBO et DCO) élevées (40–48000 mg /l et 89–95000 mg/l respectivement) et entraîne une augmentation du processus d'eutrophisation dont la conséquence est une dégradation de l'environnement conduisant à un effet substantiel sur les organismes vivants ainsi que sur l'agriculture (mort de plusieurs espèces aquatiques, plantes et poissons) [51].

L'impact négatif de cet effluent a incité les autorités réglementaires en matière de protection de l'environnement à agir rapidement pour contrecarrer cette dégradation via des lois très strictes en matière de pollution soit par l'interdiction de l'élimination du lactosérum non traité ou par la reconsidération de la gestion des volumes de lactosérum issus de la fabrication du fromage et de la caséine via une valorisation réfléchie.

A l'exemple de l'Algérie la production du fromage a augmenté de 110 T en 1962 à 1540 T en 2013. D'où une production annuelle de lactosérum qui dépasse le 13860 de tonnes [52]. Ainsi, vue sa composition et les énormes quantités produites, la valorisation paraît évidente.

III. VALORISATION DU LACTOSERUM

Environ 50% de la production mondiale du lactosérum est traitée et transformée en divers produits alimentaires, dont environ 45% sont utilisés directement sous forme liquide, 30% sous forme de poudre, 15% en tant que lactose et ses dérivés, et le reste pour la fabrication des concentrés de protéines du lactosérum [53]. En effet, trois options différentes d'utilisation de lactosérum peuvent être envisagées (Figure I.11).

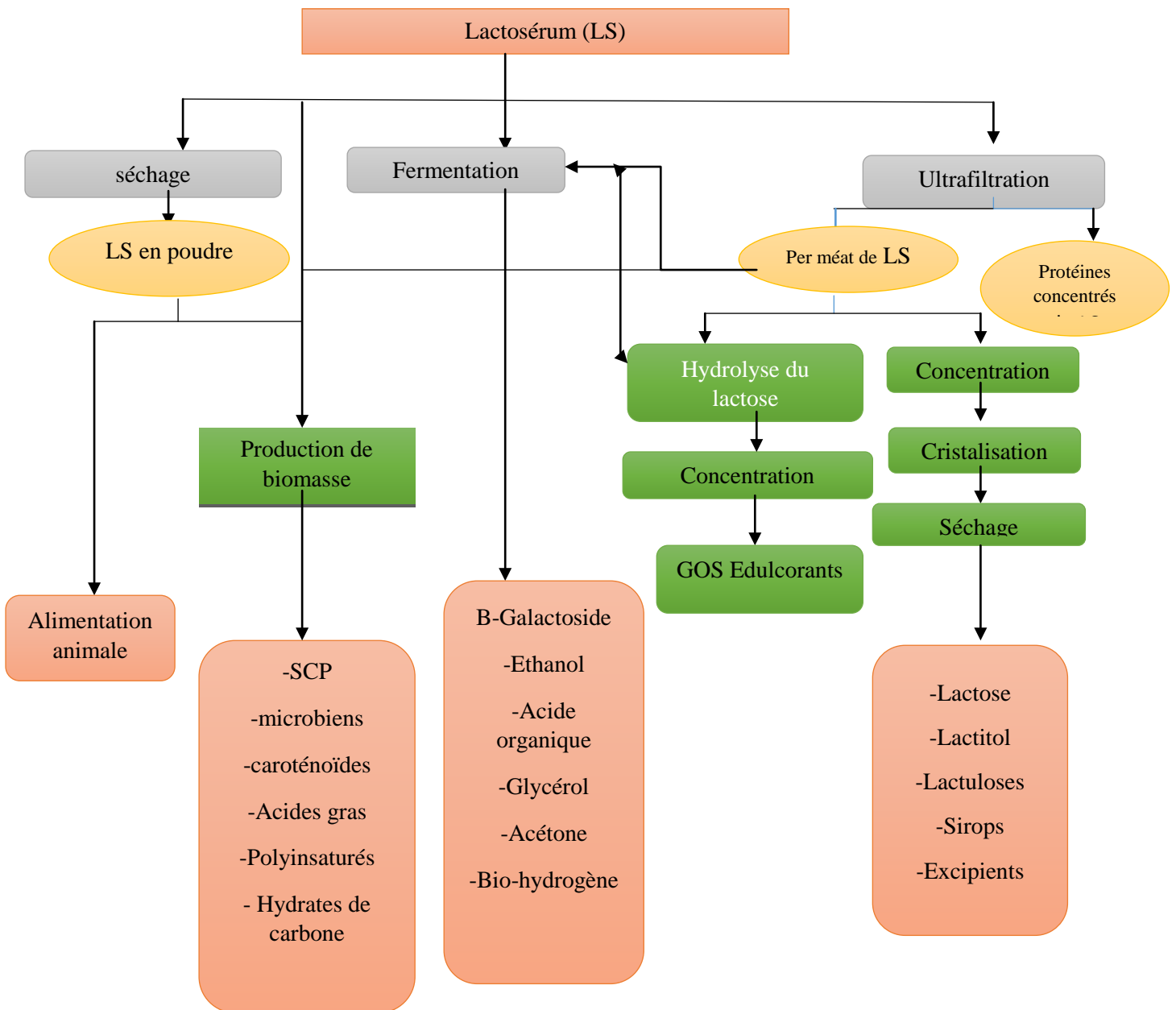


Figure I.11 : Différents procédés de valorisation du lactosérum [54]

*Dans le cadre de ce travail, le lactosérum est utilisé (valorisé) comme un milieu de culture pour la *Chlorella vulgaris*, une micro-algue, utilisée dans la production du biodiesel.*

IV. LACTOSERUM MILIEU DE CULTURE POUR LES MICRO ALGUE

La présence de lactosérum dans le milieu de culture a déjà permis de stimuler la croissance des micro algues *Anacystis nidulans*, *Nannochloris sp.*, *Dunaliella tertiolecta* et *Euglena gracilis* [55] et de la levure *Saccharomyces cerevisiae* [56]. Cette stimulation pourrait être attribuable à la présence du lactose et/ou aux autres constituantes du lactosérum. De plus, il a récemment été démontré que l'ajout d'une poudre de lactosérum brut, riche en phosphore

et calcium, au milieu de culture pouvait stimuler la croissance de *Chlorella vulgaris*. Aussi, l'hydrolyse préalable du lactose a également permis de stimuler significativement les rendements de biomasse et le taux de croissance de culture de cette espèce grâce à l'utilisation du glucose et du galactose comme source pour la DCO en conditions mésotrophes [57].

CHAPITRE 02

Procédures expérimentales

TABLE DES MATIERES

Présentation de la ville de METLLILI

I PRELEVEMENT.....	27
II OBSERVATION ET CARACTERISATION (SUIVI)	28
II.1 Analyse physicochimique.....	28
II.2 Analyse biologique	29
III ISOLEMENTPURIFICATION ET IDENTIFICATION DES SOUCHES MICROALGALES.....	30
III.1 Préparationdu milieu de culture gélosé pour la culture en boîte pétri.....	31
III.1.1 Procédure expérimentale	32
III.1.2 Etape d'inoculation	33
IV CULTURE HETEROTROPHIE DE LA SOUCHE INDIGENE C.VULGARIS ISOLEE LOCALEMENT	33
IV.1 Condition de travail.....	34
IV.2 Pre-culture	34
IV.3 Préparation du lactosérum pour la culture algale.....	34
IV.4 La culture de la souche indigène c.vulgaris isolée localment	35
IV.5 Suivi de la croissance hétérotrophe de la souche sauvage c.vulgaris par gravimétrie....	35
IV.6 Détermination de la productivité volumétrique maximale de la biomasse	35
IV.7 Analyse du taux de glucose.....	37
IV.8 Mesure du pH.....	38
V RECOLTE ,EXTRACTION ET TRANSESTERIFICATION.....	38
V.1 Récolte.....	38
V.2 Extraction	38
V.3 Transesterification	39
VI.TECHNIQUE DE CARACTERISATION DU BIODIESEL.....	40
VI.1 Analyse physicochimique	40
VI.2 Analyses statistiques	40

Chapitre 2 : Procédures expérimentales

Ce second chapitre est dédié à la partie expérimentale de ce travail. Il consiste en une présentation détaillée et illustrée de toutes les étapes des différentes manipulations selon cet enchaînement :

- *Prélèvement de la souche micro algale*
- *Caractérisation physico chimique et biologique*
- *Purification, identification et isolement de la Chlorella Vulgaris*
- *Préculture*
- *Culture dans deux milieux (Lactoserum et BG11)*
- *Suivi de la culture (biomasse, taux de glucose, pH)*
- *Recoltre*
- *Extraction*
- *Transesterification*
- *Analyse du biodiesel produit.*

*Les expérimentations ont été réalisées au niveau du laboratoire de Biotechnologie des micro-algues à l'Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables, UAREAR – Ghardaïa, Algérie. Les expériences ont porté sur la culture d'une souche indigène de *Chlorella vulgaris* isolée localement, au niveau des effluents laitiers pour la production de biodiesel.*

Présentation de la zone de Metlili

Avant de passer à l'étape de prélèvement, il est important de signaler que la *Chlorella vulgaris* a été prélevé dans la localité de Metlili ou Metlili Chaamba, une commune de la wilaya de Ghardaïa dont le climat se caractérise par des étés aux chaleurs torrides et des hivers doux. Un tel climat est très favorable au développement de la souche *Chlorella vulgaris*, découverte dans cette zone pour la première fois en 2017 [58].

Ci-dessous quelques les variations climatologiques de cette zone :

- Des précipitations très faibles et irrégulières variant entre 13 et 68 mm sur une durée moyenne de quinze (15) jours par an.
- La période chaude qui commence du mois de mai au mois de septembre est caractérisée par des températures moyennes en mois de Juillet de 36,3°C, le maximum absolu de cette période atteint 47°C.
- Pour la période hivernale, la température moyenne est enregistrée au mois de Janvier et elle ne dépasse pas 9,2 °C, le minimum absolu sur cette période a atteint -1°C.
- Des vents de sable très fréquents surtout pendant le printemps (avril, mai et juin). Pour ce qui est du Sirocco, on note une moyenne annuelle de 11 jours/an pendant la période allant du mois de mai à septembre [59].

I. PRELEVEMENT

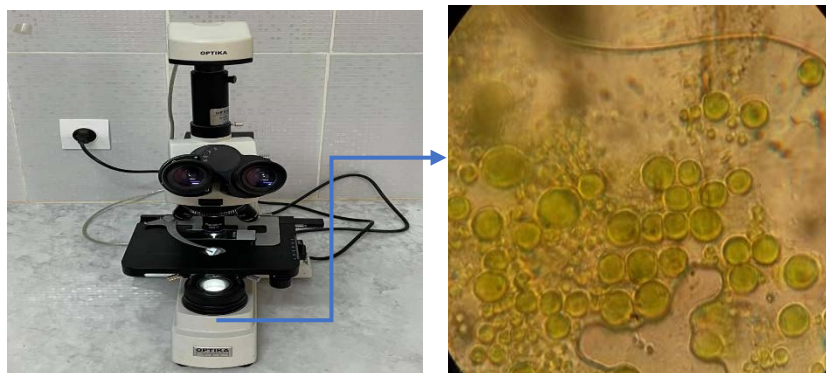
Le prélèvement a été effectué au niveau d'un bassin de forage d'eau douce situé dans la localité de Metlili comme cité précédemment, figure. II.1.



Figure II.1 : Récolte des échantillons d'eau contenant les micro-algues

L'opération a été accomplie, par M. D.GHOBRINI, le 11 mars 2021 à 11h du matin où la température moyenne était de 24 °C. Les prélèvements ont été effectués à une profondeur entre 0 à 10 cm. Les échantillons ainsi prélevés ont été conservés à une température ambiante pour servir d'inoculum pour les isolements prévus.

II.



OBSERVATION ET CARACTERISATION (SUIVI)

Avant d'entamer les analyses, des observations microscopiques ont été effectuées sur une goutte d'eau de l'échantillon prélevé pour s'assurer de la présence des microalgues dans ce dernier. Le dispositif utilisé est un microscope optique (Gx40 et Gx100) type Optica WF10X/22 sur lequel est intégrée une caméra digitale M-699. La lecture directe sur ordinateur est rendue possible grâce au logiciel Optica Vision Pro. En outre, une identification plus poussée a permis de mettre en évidence la présence de l'espèce algale objet de notre étude (figure II.2).

Figure II.2 :
espèces micro-
échantillons prélevés

Après avoir
de souche
niveaux des eaux de
procède aux analyses
qui précède les tests



Observation des
algues dans les

vérifié la présence
microalgues aux
prélèvements, on
physico-chimiques
biologiques.

II.1 Analyses physicochimiques

Les analyses physicochimiques des échantillons d'eau collectées ont été effectuées à l'aide d'un multi-paramètre de type HANNA HI 9829 équipé de sondes HI7609829 (figureII.3). A cet égard, plusieurs paramètres ont été pris en considération lors de la procédure à savoir le pH, la température, la DBO et la conductivité.

Figure II.3: Multi-paramètre de type HANNA équipé de sondes

Afin de définir les paramètres physico-chimiques de l'eau on procède comme suit :

- Déposer un volume d'eau suffisant dans un bécher de 500 ml ;
- Pousser sur le bouton rouge pour mettre en marche le multi-paramètre ;
- Appuyer « Add » pour générer un nouveau profil, le profil a été nommé UMMTO ;
- Choisir les différents paramètres à mesurer ;

- Introduire la sonde du multi-paramètre dans le bécher et presser sur le bouton « mesure », cette dernière opération dure environ 10 minutes ;
- Presser sur le bouton gauche pour afficher les résultats.

II.2 Analyses biologiques

Conditions d'asepsies

Travailler avec des microorganismes implique l'usage d'un protocole d'asepsie stricte. A cet effet, afin de réduire au maximum les risques de contamination l'utilisation d'appareil comme une hotte à flux laminaire est essentiel au bon déroulement de la manipulation (figure II.4). La mise en marche de l'appareil doit s'effectuer en vitesse minimale pendant 5 minutes qui sera suivi par un nettoyage à l'alcool à 70°. A cette opération succède la mise en marche de la lampe Ultraviolet (UV) pendant 30 minutes. Par ailleurs, ces opérations doivent être effectuées au début mais aussi à la fin de chaque manipulation.



Figure II.4 : Manipulation au niveau de la hotte à flux laminaire verticale

III. ISOLEMENT, PURIFICATION ET IDENTIFICATION DES SOUCHES MICROALGALES

L'objectif principale de cette étape est d'isoler la souche microalgale désirée, pure et prête à la micro culture d'abord et à la culture par la suite afin de pouvoir mener à bien la suite de cette étude.

L'isolement des différentes espèces microalgales a été réalisé dans le milieu de culture BG11 (tableau II.1). Un milieu simple qui convient à toutes les souches de microalgues, principalement, vertes et aux cyanobactéries.

Le choix de ce milieu est justifié par son efficacité rapportée dans des travaux similaires réalisés pour l'isolement des microalgues quel que soit la nature du sol, des eaux douces,

thermales et des eaux d'origine marine [60]. Ainsi, les colonies correspondantes aux chlorelles ont été prélevées et étalées sur de nouvelles boîtes de Pétri par des repiquages successifs. L'opération est renouvelée à plusieurs reprises pour s'assurer de l'isolement et la purification d'une souche correspondante à *Chlorella vulgaris*.

Tableau II.1 : Composition chimique du milieu BG11

Composition	Concentrations dans le milieu(mg/L)
(NH ₂) ₂ CO (l'urée)	1100
KH ₂ PO ₄	238
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	204
C ₁₀ H ₁₂ O ₈ N ₂ NaFe (EDTA)	40
CaCl ₂	88
Microélément 1	•
Microélément 2	•

L'identification des souches microalgales isolées est faite directement à partir des boîtes de Pétri inoculées (Figure II.5). Elle est basée sur l'observation des caractéristiques morphologiques de la colonie à l'œil nu et aussi des caractéristiques cyto-morphologiques sous microscopie optique. Ainsi, les caractéristiques morphologiques pris en comptes dans le cas des analyses cyto-morphométrique sont : la taille, la forme, la présence et l'absence de flagelle etc... Par ailleurs, pour une meilleure identification on utilise des livres d'identification de références comme celui de GAYRAL (1975) et de DE REVIERS (2002).

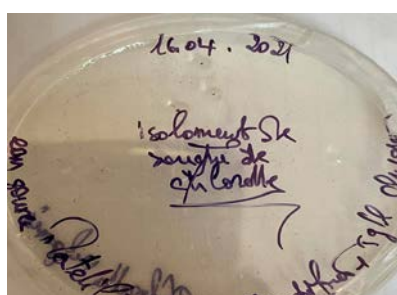


Figure II.5 : Isolement de la souche de *Chlorella. Vulgaris* sur le milieu BG 11

Il à noter qu'en plus du nom de l'espèce de la souche isolée, un code d'identification rappelant la zone de prélèvement lui a été attribué. Quant à l'isolation et la purification de la souche *Chlorella vulgaris*, elles ont été réalisé sur une durée de 21 jours suivant le protocole

mis au point par D.GHOBRINI[58]. Alors que d'ordinaire la période d'isolation peut aller jusqu'à 6 mois.

III.1 Préparation du milieu de culture gélosé pour les cultures en boîtes de Pétri

La culture des souches a été faite dans le milieu BG11. Milieu adéquat pour le développement de la *Chlorella vulgaris*. Les concentrations des solutions mères sont représentées sur le tableau II.2. Le milieu de culture est conservé au frais avant utilisation.

Tableau II.2 : Préparation des solutions mères à partir des sels du BG11

Sels	[solution mère] (g/L)	[Solution utilisée] (ml/L)*
(NH ₂) ₂ CO (l'urée)	110	10
KH ₂ PO ₄	23,8	10
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	204	1
C ₁₀ H ₁₂ O ₈ N ₂ NaFe (EDTA)	40	1
CaCl ₂	88	1
Microélément 1	•	2
Microélément 2	•	2

*On prélève de la solution mère et on dilue dans un litre d'eau

La composition chimique en sels des solutions mères en microéléments 1 et 2 utilisées pour préparer le milieu BG11 est représentée dans le tableau II.3.

Tableau II.3 : Compositions des microéléments 1 et 2

Solutions concentrées de microéléments		[] (g/L)
Microéléments 1	H ₃ BO ₃	18,5
	CuSO ₄ , 5 H ₂ O	21,0
	MnCl ₂ , 4 H ₂ O	73,2
	CoSO ₄ , 7 H ₂ O	13,7
	ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	59,5
Microéléments 2	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	3,80
	(NH ₄)VO ₃	0,31

III.1.1 Procédure expérimentale

Le milieu BG11 est préparé par l'association des sels minéraux et solidifié par de l'agar à 15%. Le pH est alors ajusté à 7,2 avant autoclavage avec du NaOH 1N (Figure II.6). Par ailleurs, du NaNO_3 est mis dans le milieu à la place de l'urée car l'urée est thermolabile (instable à des températures élevées). En fin, le milieu préparé est stérilisé dans un autoclave de marque SANO clav à 120 °C pendant 20 minutes, figure II.7. Après autoclavage, et au niveau de la hotte, le milieu est versé dans des boîtes de Pétri puis laissé à refroidir (figure II.8).

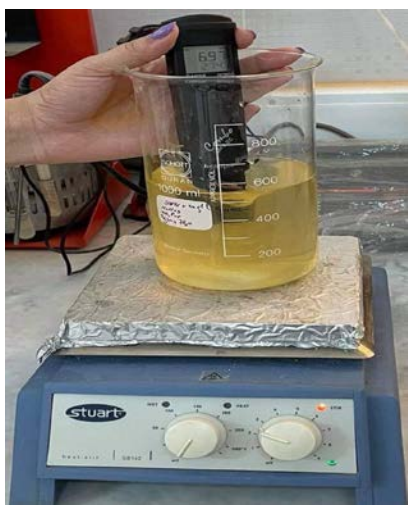


Figure II.6 : Ajustement du pH



Figure II.7 : Autoclave SANO clav

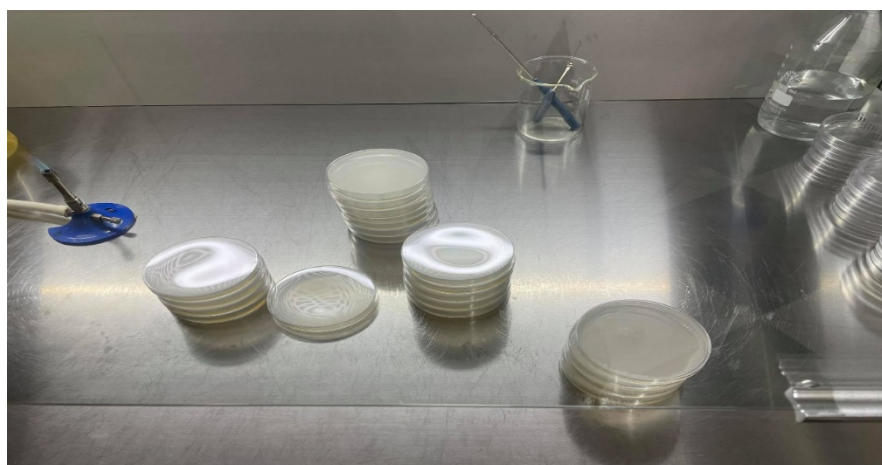


Figure II.8 : Milieu de culture coulé sur des boîtes de Pétri sous la hotte

III.1.2 Etape d'inoculation

A l'aide d'une pipette, une quantité de 3 à 5 ml de la solution d'eau échantillonnée sont déposés sur les boîtes de Pétri contenant le milieu de culture BG11 solidifié avec de l'agar

à 15 % (figure II.9). Ensuite, les boîtes sont hermétiquement fermées avec du Parafilm et maintenues à 30 °C au laboratoire et sous une lumière artificielle continue 24h/24h.

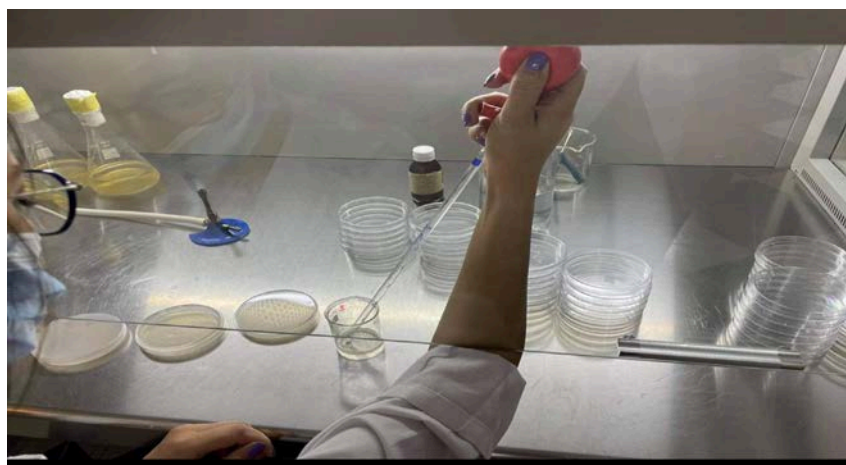


Figure II.9 : Procédure d'isolement des souches micro-algues

IV. CULTURE HETEROTROPHE DE LA SOUCHE INDIGENE CHLORELLA VULGARIS ISOLEE LOCALEMENT

Après l'étape d'isolement des souches vient la pré culture suivie de la culture.

IV.1 Conditions de travail

Comme le travail en condition d'asepsie est une exigence sine qua non. A chaque mise en culture, le travail doit s'effectuer, en plus de l'utilisation de la hotte, à proximité du bec benzène. En effet, la flamme produite par le brûleur à gaz crée autour d'elle une sphère stérile grâce à la chaleur qu'elle dégage (20 cm de diamètre) au niveau de laquelle une zone stérile subsiste. Il est alors possible de travailler en conditions stériles dans cette sphère.

IV.2 Pré-culture

Afin de mettre en culture des micro-algues à partir d'échantillons contenus dans des boîtes de Pétri, une pré-culture s'impose pour éviter des phases de latence trop longue. En effet une pré-culture correspond à une phase d'adaptation de la souche au milieu de culture. Ainsi, une quantité de 10^7 cellules/ml de la souche doit être inoculée dans 250 ml de milieu [61]. A cet égard, à l'aide d'une anse d'inoculation (parfois appelées aiguille d'inoculation) la souche indigène de *C. vulgaris* localement isolée, en culture dans une boîte de Pétri, est inoculée à hauteur de 10^7 cellules/ml dans 250 ml du milieu BG11 modifier et supplémenté de 10 g/l de glucose. Le pH est ajusté à 7,2 avant autoclavage (120 °C, 20 min). Puis les cultures sont incubées sur un agitateur orbital type (Wisd SHO-2D) à 150 tr/min et sont maintenues à l'obscurité à une température de (30 ± 2) °C (figure II.10). Il est à noter qu'une répétition est réalisé simultanément est dans les même conditions.

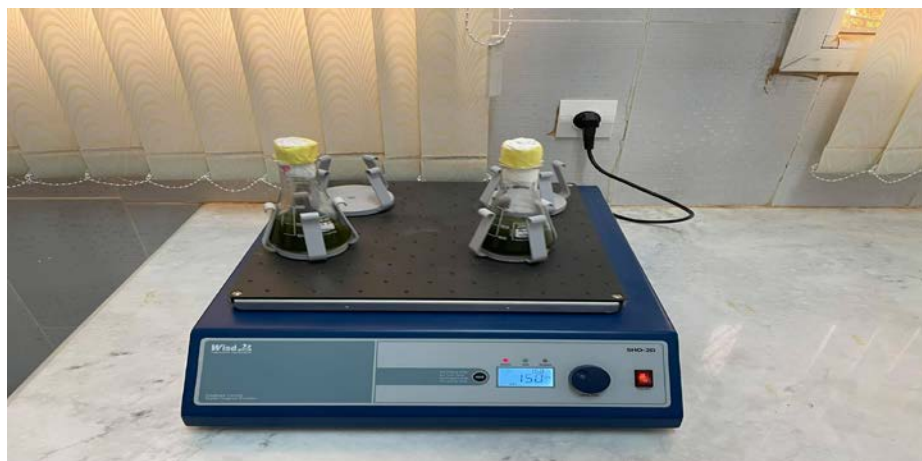


Figure II.10: Préculture hétérotrophe de la souche indigène *C. vulgaris*

IV.3 Préparation du lactosérum pour la culture algale

Parmi les objectifs de cette étude est l'utilisation du lactosérum comme milieu de culture de la souche *C. vulgaris*.

Ainsi, le lactosérum utilisé a été disponible au niveau du laboratoire de biotechnologie des micro-algues de (l'Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables). Cet effluent laitier, de type acide (pH = 5,2), a été collecté au niveau d'une laiterie locale de la région de Ghardaïa et a été conservé dans un réfrigérateur à 4 °C. Avant son utilisation comme support de culture de la souche sélectionnée, le pH du milieu a été ajusté à 7,2 par du NaOH 5M suivi par un chauffage du milieu pendant 10 minutes à 80 °C [58].

IV.4 Culture de la souche indigène *Chlorella vulgaris* isolée localement

La souche verte de *Chlorella vulgaris* a été cultivée dans deux types de milieu, le BG11 modifié et le lactosérum (avec deux conditions), tableau II.4. Les conditions de culture sont les suivantes :

- Les deux milieux ont été supplémentés de 10 g/L de glucose ;
- Le pH a été ajusté avant autoclavage à 7,2.
- Les cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers de 500 ml scellés par des bouchons en papier.

Une fois les milieux ont été inoculés, les erlenmeyers ont été placés sur un agitateur orbital à 150 tr/min pendant 5 jours en absence de lumière et à une température de (30 ± 1) °C. Pour cette phase à chaque milieu de culture est associé un volume d'inoculum de 10% (v/v) [58] ; [60] ; [62]. Ainsi, six cultures ont été lancées simultanément, une répétition pour chaque condition (Figure II.11).

Tableau II.4 : Composition et combinaisons utilisées lors des essais

Essais	Milieu	Supplémentés
MBM	BG11 modifié	Glucose (10g/L) + NaNO ₃ (7 g/L) + KH ₂ PO ₄ (3 g/L) + MgSO ₄ ,7H ₂ O (1 g/L).
SWW	Lactosérum	Glucose (10g/L)
MSWW	Lactosérum modifié	Glucose (10g/L) + NaNO ₃ (7g/L) + KH ₂ PO ₄ (3 g/L) + MgSO ₄ ,7H ₂ O (1 g/L).

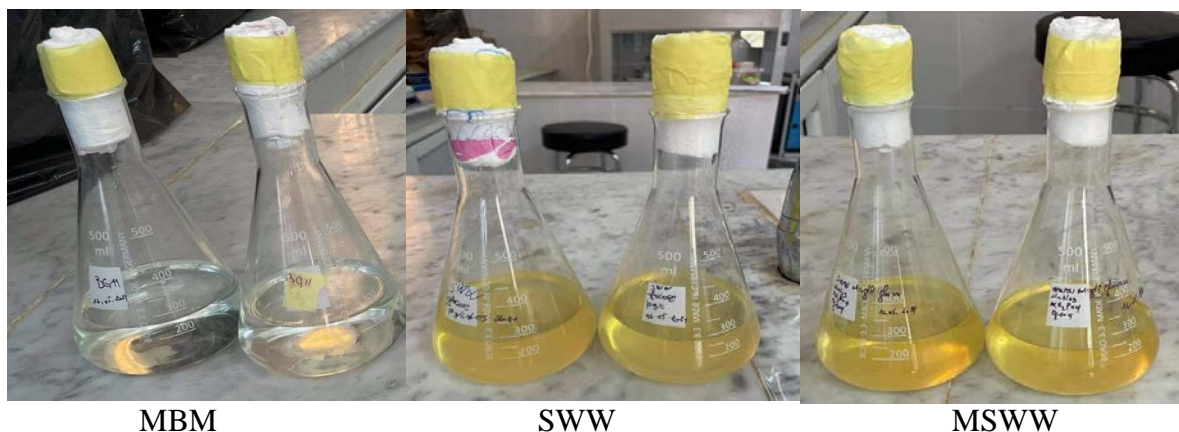


Figure II.11 : Combinaisons des milieux utilisées lors des essais *BG11 modifié

IV.5 Suivi de la croissance hétérotrophique de la souche sauvage *C. vulgaris* par gravimétrie

Des prélèvements réguliers sont effectués quotidiennement au niveau des différents milieux utilisés afin de déterminer la courbe de croissance de la souche isolée. Le mode opératoire suivi est celui décrit dans la littérature par D.Ghobrini [60] à savoir :

- Prélever 2 mL de chaque milieu de culture à intervalle régulier à l'aide de pipettes stériles pour éviter toute contamination bactérienne ;
- Les volumes recueillis sont mis dans des Eppendorf de 2 mL, préalablement pesés, et séchés 24 h dans une étuve de type Memmert à 100 °C (figure II.12) ;
- Après, ils sont mis sous centrifugation dans une centrifugeuse model Hettich-EBA20 pendant 10 minutes à 60000 tr/min (figure II.12) ;
- Le surnageant est récupéré et conservé au congélateur à (- 4 °C) pour l'analyse ultérieure du glucose ;
- Le culot est lavé avec de l'eau distillée puis passé dans un agitateur vortex avant de subir une autre centrifugation pendant 10 minutes à 60000 tr/min (figure II.13).

- Pour chaque point de mesure l'opération a été répétée trois fois.
- Après 24 h de séchage les Eppendorf ont été pesés et la masse de la biomasse a été déterminée suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Biomasse (g)} = \text{Poids de l'Eppendorf contenant la biomasse algale} - \text{Poids de l'Eppendorf vide}$$



Figure II.12 : Matériels utilisés lors de l'analyse gravimétrique

IV.6 Détermination de la productivité volumétrique maximale de la biomasse

Selon GHOBRINI [63], le paramètre utilisé pour caractériser les cultures est la productivité volumétrique maximale de la biomasse (P_{\max} , $\text{g}_{\text{biomasse}} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Elle est calculée à partir de l'équation ci-dessous,

où C_1 et C_2 étaient, respectivement, la concentration de la biomasse initiale (T_1) et maximale (T_2) de la phase de croissance exponentiel.

$$(P_{\max}) \text{ g/L.h} = \frac{(C_2 - C_1)}{T_2 - T_1}$$

IV.7 Analyse du taux de glucose

Afin de déterminer la concentration de glucose lors de la croissance de *C. vulgaris* au niveau des différents milieux de cultures un appareil HPLC (High Performance Liquid Chromatography) modèle Agilent services série 1100 a été utilisé (figure II.13). Après avoir préparées dans des fioles joggées de 100 ml, 3 solutions à différentes concentrations en

glucose, une courbe d'étalonnage a été tracé avec comme blanc l'eau distillée. La valeur affichée par l'HPLC a été appliqué au niveau de la courbe étalon pour déterminer la concentration du glucose au niveau des milieux de culture.



Figure II.13: Photographie de l'HPLC modèle Agilent série 1100

Une fois la courbe étalon tracé, le surnageant issu de la gravimétrie a été filtré à l'aide d'un filtre seringue de 0,22 μm afin d'éliminer les cellules résiduelles.

Les conditions de l'analyse par HPLC sont :

- Une colonne polymère Watrex 250X8mm (Polymer IEXH), utilisée comme phase stationnaire ;
- H_2SO_4 dilué (v/v : 1/1000 ml), utilisé comme phase mobile et comme détecteur d'indice de réfraction ;
- Une température de travail, maintenue à 25 °C ;
- Un débit de 1ml/L a été fixée pour chaque échantillon afin d'avoir la meilleure analyse possible ;
- Le temps de rétention du glucose est approximativement de 4,80 minutes à 5,35 minutes.

IV.8 Mesure du pH

Le suivi du pH au niveau des cultures est réalisé en parallèle avec l'étude de la cinétique de croissance par conductimètres/SDT modèle HANNA (HI 255). Il permet de

détecter des anomalies au niveau des cultures par exemple si des contaminations existent dans le milieu, le pH changera brusquement.

V RECOLTE, EXTRACTION ET TRANSESTERIFICATION

V.1 Récolte

Une fois les cultures cellulaires finies, la biomasse algale a été récoltée par centrifugation en se basant sur la méthode d'écrite par SHEN [64]. A cet effet, deux centrifugations ont été réalisées :

- La première permet de séparer la biomasse de son milieu de culture ;
- La deuxième permet d'éliminer au maximum les traces du milieu de culture de la biomasse par l'ajout d'eau distillée.

La biomasse algale humide une fois récupérée a été soumise au séchage à 45 °C dans une étuve ventilée type Memmert.

V.2 Extraction

L'extraction des lipides à partir des cellules micro-algales a été effectué selon le modèle récemment adapté dans la littérature [62].

- 0,2 g de la biomasse algale est mise dans un tube de 15 ml auquel est additionnée 2 ml de microbille en porcelaine et 13 ml de méthanol – UV.
- Après passage (2 min) sur un appareil de vortex. Le contenu des tubes est transvasé dans de nouveaux tubes de 50 ml. Afin d'assurer une récupération totale de la biomasse, les premiers tubes ont été lavés deux fois avec 5 mL de méthanol.
- Enfin, 30 ml de chloroforme sont additionnés au mélange et le tout est soumis à une agitation orbitale pendant 24 h.
- Une centrifugation à 6000 tr/min pendant 15 min est alors appliquée pour séparer les débris cellulaires de la solution lipidique. Le surnageant est récupéré à l'aide d'une micropipette dans des ampoules en verre préalablement séché et pesé.
- Un passage par un évaporateur rotatif permet de séparer les lipides de la chlorophylle
- Enfin les solvants organiques sont évaporés par l'utilisation d'un rota-vapeur à 55°C. Le contenu des ampoules en verre sont mis à sécher jusqu'à poids constant dans l'étuve puis pesé et la teneur en lipides exprimée en (g) est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Lipide (g)} = \text{Poids de l'ampoule contenant l'extrait} - \text{Poids de l'ampoule vide}$$

La teneur en lipides est donnée par :

$$\text{Teneur (\%)} = (\text{mh}/\text{m}) \times 100$$

Avec : **m** : la biomasse ; **mh** : masse d'huile

V.3 Transestérification

Le protocole de transestérification suivi est celui appliqué par GHOBINI [62]. Ainsi, pour hydrolyser les liaisons esters, libérer les acides gras et former des esters méthyloxy des acides gras (FAME), un mélange de méthanol acidifié par environ 3 % d'acide sulfurique a été utilisé. Enfin de réaction, la solution est transférée dans une ampoule qui contient 20ml d'hexane. Après agitation et la séparation du glycérol et du biodiesel, ce dernier est transféré dans une ampoule à décanter et lavé avec 20 ml d'eau déminéraliser afin de neutraliser l'acide et d'éliminer le méthanol en excès. La séparation des phases organique (biodiesel) et aqueuse se fait à température ambiante pendant 24 h. Le biodiesel produit est ensuite récupéré, séché avec du Na_2SO_4 et le méthanol est évaporé sous pression réduite à 60 °C à l'aide d'un rota-vapeur.

Le rendement de la réaction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{mb}/\text{mh}) \times 100$$

Avec : **mb** : masse du biodiesel ; **mh** : masse d'huile

VI. TECHNIQUE DE CARACTERISATION DU BIODIESEL

VI.1 Analyses physico-chimique

La caractérisation des propriétés physico-chimiques du biodiesel formé a été réalisée en se concentrant principalement sur la détermination de sa densité. L'indice de réfraction a été obtenu à l'aide du réfractomètre ATAGO Abbe et le pH a été réalisé à l'aide d'un pH mètre modèle HANNA (HI 255).

VI.2 Analyses statistiques

En plus, des analyses physico-chimique, des analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Microsoft Excel 2019. Ainsi, les données expérimentales sur la production de biomasse et la teneur en lipide produite par la souche sauvage de *Chlorella vulgaris* au niveau des différents milieux testés ont été évaluées statistiquement en utilisant le test de Student (t), probabilité au seuil de $p < 0,05$.

CHAPITRE 03

Résultats et discussions

TABLE DES MATIERES

I REPARTITION ET ISOLEMENT DES SOUCHES	42
I.1 Analyse physicochimique des échantillons d'eaux.....	42
I.2 Répartition et prolifération des micro-algues.....	42
I.3 Identification des micro-algues	44
II DETERMINATION DE TAUX DU GLUCOSE	45
III DEVELOPEMENT DE LA SOUCHE INDIGENE C.VULGARIS SUR DES DEUX TYPES DE MILIEUX DE CULTURE BG11 MODIFIER ET LACTOSERUM.....	46
III.1 Etude de la culture de la souche indigène c.vulgaris	46
III.2 Variation de la teneur en sucre pendant la croissance hétérotrophe.....	48
III.3 Productivité de la biomasse de c.vulgaris dans différent milieu en condition hétérotrophe	50
III.4 Evolution de PH en culture hétérotrophe	51
IV EXTRACTION DES LIPIDES	51
V TRANSESTERIFICATION DES LIPIDES EXTRAITES ET PROPRIETES DU BIODISEL PRODUIT	53
V.1 Résultats de la transesterification	53
V.2 Propriétés du biodiesel produit.....	54

Chapitre 3 : Résultats et discussions

Ce dernier chapitre sera consacré à la présentation des différents résultats expérimentaux obtenus ainsi qu'à leurs discussions, à commencer du prélèvement de la souche algale jusqu'à sa transformation en biodiesel par transestérification et on conclut par l'évaluation des propriétés de ce dernier et les comparer avec celles des carburants classiques.

La présentation des résultats suivra le même enchaînement du chapitre précédent ainsi chaque démarche expérimentale trouvera ses résultats dans ce chapitre.

I. RÉPARTITION ET ISOLEMENT DES SOUCHES MICROALGALES

Le type de microalgue change en fonction de la nature des eaux où elle prolifère. Notre prélèvement a été effectué au niveau d'un bassin de forage d'eau douce situé dans la localité de Metlili localisée dans la wilaya de Ghardaïa comme déjà cité dans le chapitre 2.

I.1 Analyse physicochimique des échantillons d'eaux

Les analyses des eaux de prélèvement ont pour but d'avoir des renseignements sur les besoins en sels minéraux des souches micro-algues à traiter. Le tableau III.1 regroupe les paramètres physicochimiques des eaux prélevées. Il en ressort après analyse des données, que les eaux de la zone de prélèvement sont douces (pH neutre avoisinant 7,18) avec absence d'ions polluants.

Tableau III.1 : Caractéristiques physicochimiques des eaux de prélèvement récoltées au niveau de la région de Metlili

Paramètres	Echantillon d'eau de Metlili
pH	7,18
Oxygène dissous %	60,9
Oxygène dissous ppm	5,23
Conductivité $\mu\text{s}/\text{cm}$	4537
Conductivité absolue $\mu\text{s}/\text{cm}$	4032
Résistivité $\text{M}\Omega.\text{cm}$	0,0002
Salinité psu	2,46
Température °C	27,53
Pression atmosphérique psi	12,6867

I.2 Répartition et prolifération des microalgues

La présence des microalgues dans les échantillons d'eaux prélevés dans la zone de Metlili est confirmée par les observations au microscope optique, voir figure III.1.

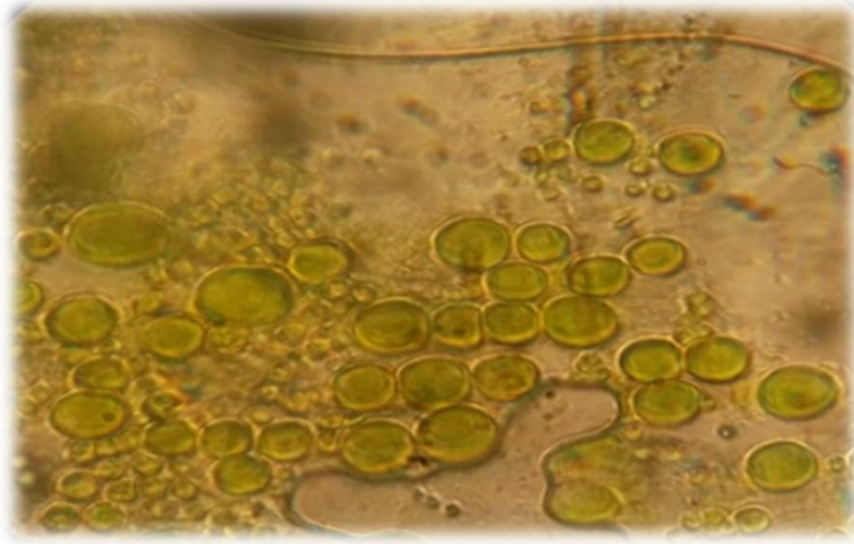


Figure III.1 : Observation au microscope optique de microalgues présentes dans les eaux de prélèvements (G x 40)

Après cette étape de confirmation viens l'étape d'isolation de l'espèce qui a fait l'objet de cette étude. Ainsi, l'isolation, d'une durée d'un mois, s'est faite dans le milieu BG11. En effet, l'utilisation de ce milieu a permis des isolements plus ou moins similaires en terme de taux de prolifération dans les échantillons provenant de la même zone de prélèvement. Plusieurs colonies apparaissent de couleurs vertes mais avec différents aspects après une période d'incubation de 7 à 21 jours (figure III.2).

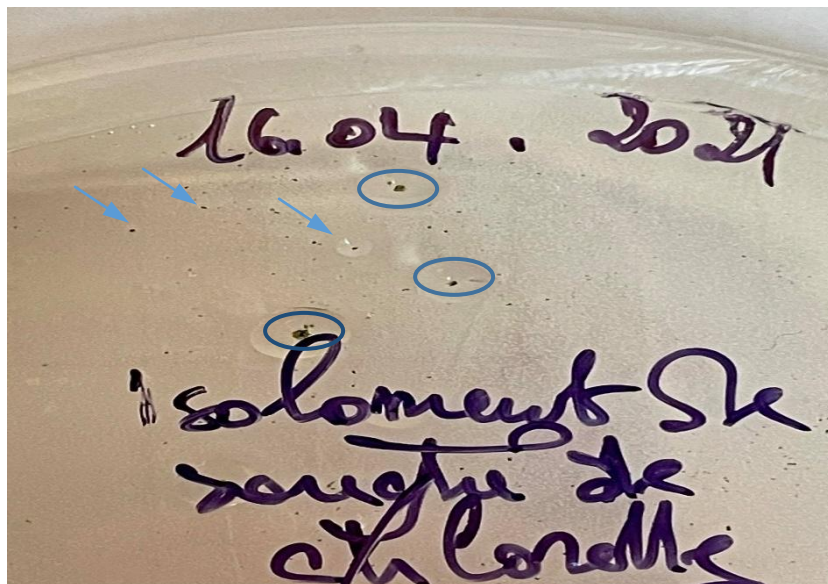


Figure III.2 : Apparition de colonies de couleur verte au niveau des boites de Pétri

I.3 Identification des microalgues

L'identification des différentes espèces a nécessité des recherches plus approfondies par observation sur microscope doté d'un logiciel pour l'analyse et le traitement numérique. La purification est ainsi entamée par une succession de repiquage en stries sur le même milieu qui a servi à l'isolation de la souche.

La souche sauvage sélectionné a été identifié comme étant *Chlorella vulgaris* par M.D.Ghobrini en fonction de ses caractéristiques morphologiques qui sont la taille, la forme ...etc, et par l'utilisation de livre d'identification de références comme celui de Gayral [65] et de REVIERS [66].

Pour une isolation parfaite la souche sélectionnée est prélevée puis étaler dans de nouvelles boites de pétris à plusieurs reprises par des repiquages en strie pour s'assurer de sa pureté, figure III.3.



Figure III.3: Purification de la souche sauvage de *C. vulgaris* GM2 par des repiquages en strie



Figure III.4 : Observation microscopique de *Chlorella vulgaris* GM2 localement isolée (Gx40)

II. DÉTERMINATION DE TAUX DU GLUCOSE

L'objectif étant de suivre les variations du taux de glucose (en g/L) présent au niveau des cultures de *C. vulgaris* sur les différents milieux utilisés : MBM (BG11modifier), SWW et MSWW. Ainsi, à partir de 3 concentration différente de glucose (tableau III.2) et avec l'aide de l'outil d'analyse HPLC, la courbe étalon de la figure.III.5 a été tracé.

Tableau III.2 : Résultats de la courbe d'étalonnage

C (g/L)	A
X	Y
5	886559.5
10	1661248.9
25	4337488.5

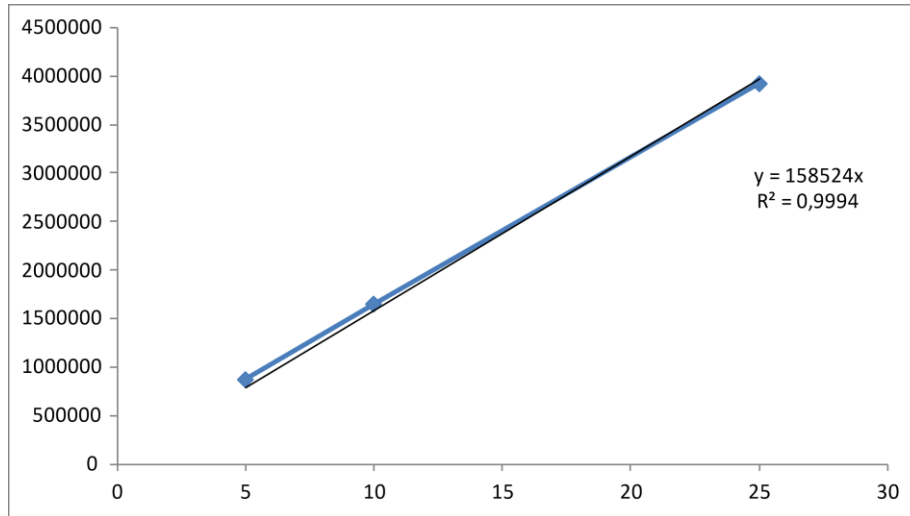


Figure III.5: Courbe d'étalonnage pour la détermination de taux du glucose (g/L)

III. DEVELOPPEMENT DE LA SOUCHE INDIGENE *C. VULGARIS* GM2 SUR LES DEUX TYPES DE MILIEUX DE CULTURE BG11 MODIFIE ET LACTOSERUM

III.1 Etude de la culture de la souche indigène *C. vulgaris* GM2

Il est à noter que la période de préculture a été de 5 jours, durée nécessaire faire l'inoculation à partir d'une culture de *Chlorella*. Ensuite, trois types de cultures en batch de la souche indigène *C. vulgaris* GM2 ont été réalisés dans les milieux listés dans le tableau II.4 du chapitre précédent suivant les conditions de cultures prédéfinie. Les cultures ont été menés sur un agitateur orbital et ont duré au totale environ 5 jours (figureIII.6).

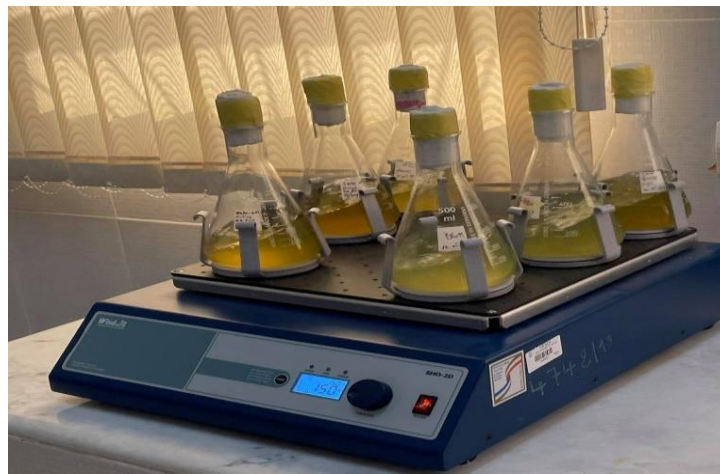


Figure III.6 : Culture de la souche de *C. vulgaris* GM2 sur un agitateur orbital

Les résultats de la cinétique de croissance de la *C. vulgaris* sont données dans ce qui suit. La figure III.7 renseigne sur l'évolution de la biomasse de la souche indigène *C. vulgaris* GM2 au sein des différents milieux utilisés en fonction du temps.

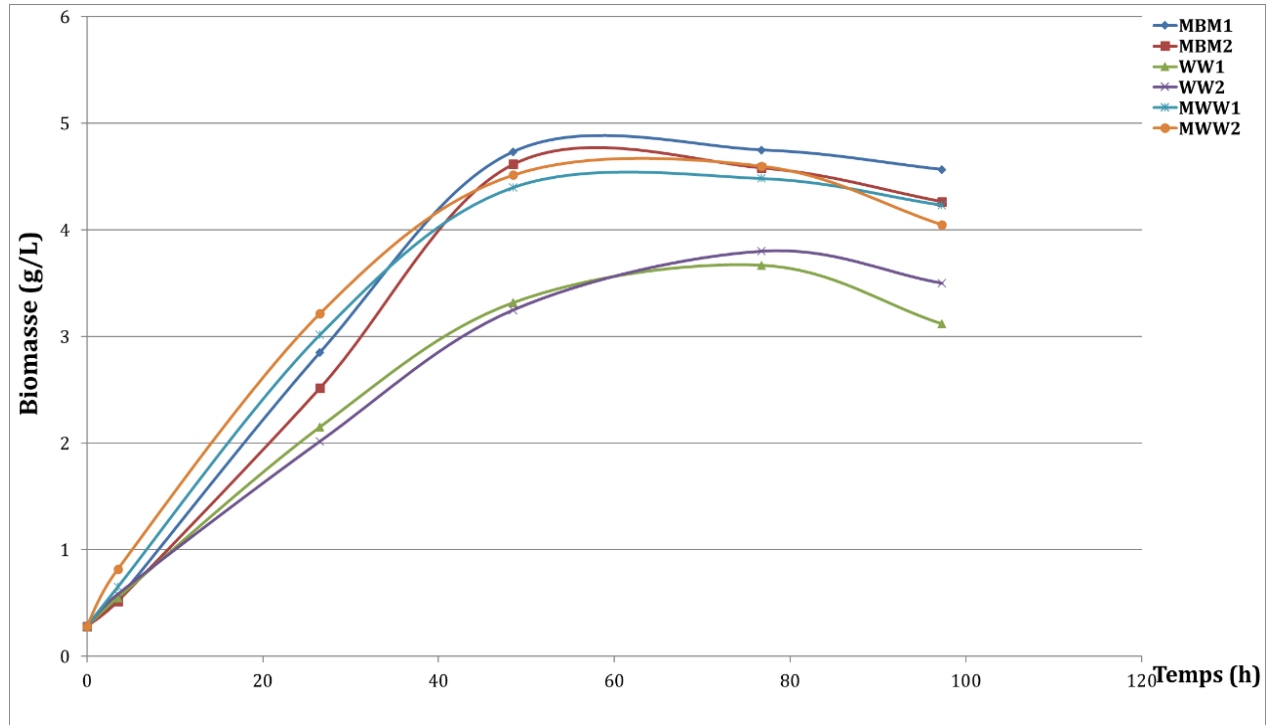


Figure III.7 : Evolution de la biomasse (g/L) dans les différents milieux étudiés en fonction du temps (h)

D'après cette figure, il apparaît clairement que la souche indigène *C. vulgaris* peut se développer au niveau des trois milieux testés. Cependant, les résultats obtenus au niveau des eaux usées (SWW) varient en fonction de la présence d'ajout de sels ou pas. Ainsi, sur le milieu (SWW) les résultats obtenus ont été inférieurs comparativement au développement de la souche sur le milieu MWW et le milieu de synthèse modifier MBG11. En outre, l'addition des trois sels (azote, phosphore et magnésium) au milieu à base de lactosérum a influé positivement sur la production de la biomasse. A cet effet, les résultats obtenus sur le milieu MSWW ne présentent pas de différence significative par rapport à ceux obtenus sur le milieu MBG11.

Par ailleurs, après trois jours de culture, la phase stationnaire a été atteinte au niveau des deux milieux modifiés. La concentration était en moyen autour de 4,6 g/L et 4,45 g/L, respectivement, sur le milieu MBG11 et le MSWW. A l'inverse, la croissance de *C. vulgaris* GM2 sur le milieu

(SWW) a induit une concentration en biomasse de l'ordre de 3,3 g/L, concentration significativement faible en comparaison avec les deux autres milieux.

La comparaison de ces résultats à ceux obtenus par D.GHOBRINI [62] sur une souche mutante de *Chlorella sp.* isolée au niveau de la même station d'étude et avec le même support de culture, à savoir les effluents laitiers, montre d'une part, que les milieux à base de lactosérum utilisés sans ajout de sels majeurs (N, P, et Mg) restent d'une faible productivité. D'autre part, l'ajout de sels s'avère être positif et conduit à un bon rendement au niveau des cultures. En outre, les résultats obtenus au niveau du milieu MBM corroborent ceux obtenus par GHOBRINI [60] qui, en travaillant sur la souche commerciale *C. vulgaris CC256* et sur le même milieu, ont rapporté une concentration en biomasse de l'ordre de 5 g/L.

Ainsi, selon les mêmes auteurs, pour un bon rendement des cultures microalgales, il est indispensable de réaliser des prédictions statistiques sur l'addition des sels majeurs (N, Mg et P) et cela par l'utilisation d'un plan d'expérience afin de déterminer l'optimum de la concentration et du type de sels à additionner au lactosérum pour une meilleure productivité. A cet effet, les valeurs de l'azote, du phosphore et du magnésium ajouté aux deux milieux de culture, ont été adjointes sur la base de leur teneur au niveau du MBM suivant la littérature [58].

Par ailleurs, il est important de signaler qu'au cours de ce travail du NaNO_3 est utilisé comme source d'azote à la place de l'urée comme signalé au chapitre 2. En effet, l'addition de l'urée de nature thermolabile (instable à des températures élevées), au niveau des milieux après autoclavage, exige l'utilisation de filtre spécifique pour éviter toute contamination surtout en condition d'hétérotrophie (travail en présence de sucre simple). Toutefois, il a été récemment rapporté [63] que l'utilisation de l'urée pour la culture de *C. vulgaris* donne de meilleurs rendements en biomasse comparé à NaNO_3 . Aussi, l'ajout de sels majeurs au niveau des milieux n'est pas fortuit. En effet, selon Anderson [67] la présence de (N, P, et Mg) dans le milieu de culture participent de manière directe et/ou indirecte dans le développement cellulaire et la synthèse des protéines.

III.2 Variation de la teneur en sucres pendant la croissance hétérotrophe

La culture hétérotrophe de microalgues permet d'obtenir des cultures avec une phase stationnaire rapidement atteinte. La figure III.8 montre que la variation de la teneur en glucose est à l'opposé de celle de la biomasse (figure III.7) du fait de sa consommation par les microalgues.

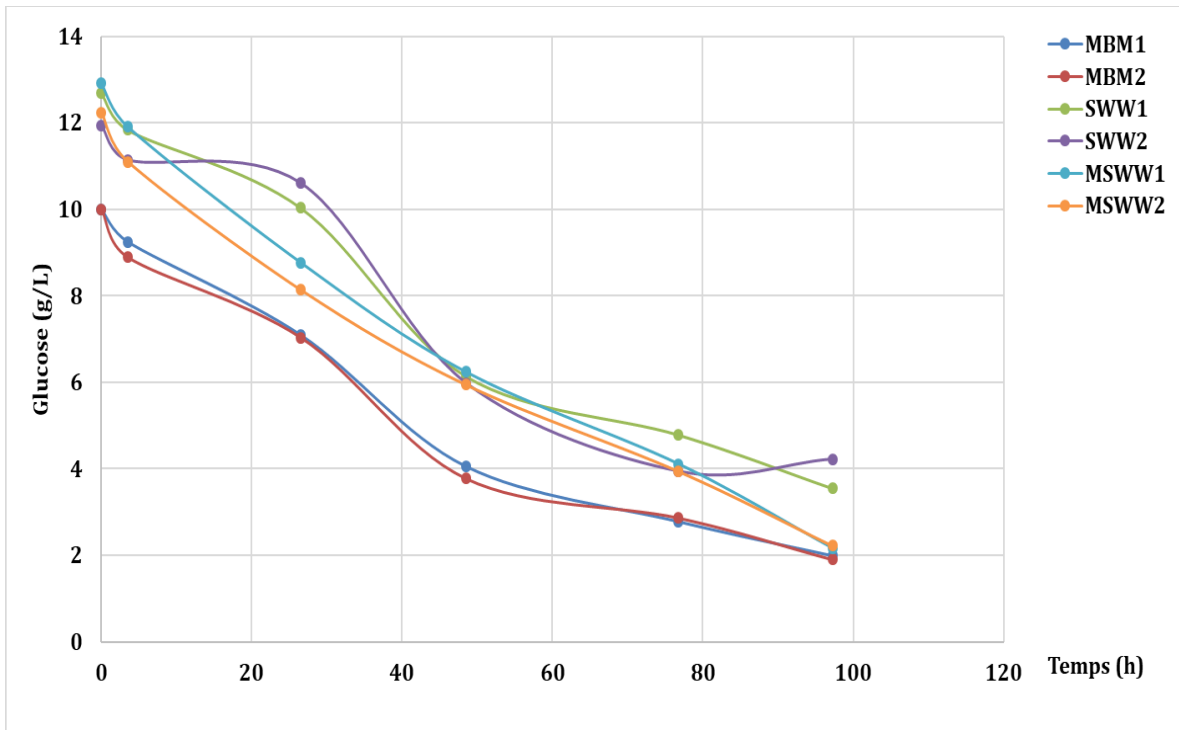


Figure III.8 : Evolution de la consommation de glucose par *C. vulgaris* GM2 durant la croissance hétérotrophe

Pour ces expériences, la variation du glucose à l'intérieur du milieu a été mesurée par HPLC. Ainsi, dans les trois milieux utilisés, la consommation de glucose est en accord avec la croissance de la biomasse. Il est intéressant de noter que la consommation de glucose n'était complète dans aucune des expériences. Par ailleurs, une différence dans les taux en sucre est observée pour les différents milieux de culture alors que la même quantité (10g/L) a été additionnée au niveau des trois milieux utilisés. Ainsi, une valeur de départ entre 12 et 13 g/L a été enregistrée au niveau des deux milieux à base d'effluent laitier contre seulement 10 g/L pour le MBM. Ces mêmes observations ont été rapportées par plusieurs auteurs notamment Xiong [68] sur *Chlorella protothecoides* et Doucha sur *C[69]. vulgaris*. Cela est dû, dans nos conditions, en partie à la présence de lactose au niveau du lactosérum qui après ajustement du pH sous influence de la chaleur a permis la libération des sucres simples dans le milieu. A cet égard, et pour une meilleure optimisation des conditions de culture, une hydrolyse enzymatique ou acide du lactose contenu au niveau des effluents laitiers ou bien même travailler en coculture *Chlorella* – lactobacillus pour libérer des sucres simples dans le milieu peut servir comme matière organique assimilable et ainsi réduire encore plus les coûts de production.

Quant aux taux des sucres résiduels qui n'atteignent jamais 0 à la fin des expériences, selon Humhal[70] les cultures en flacons agités ne permettent pas d'assimiler la totalité du glucose disponible par les microalgues car l'absence d'aération, principalement, l'oxygénation du milieu réduit la possibilité de sa consommation en totalité.

III.3 Productivité de la biomasse de *C. vulgaris* (GM2) dans différents milieux en condition hétérotrophe.

La figure III.9 montre les résultats de la productivité de la biomasse pour *C. vulgaris* (GM2) au niveau des trois milieux utilisés.

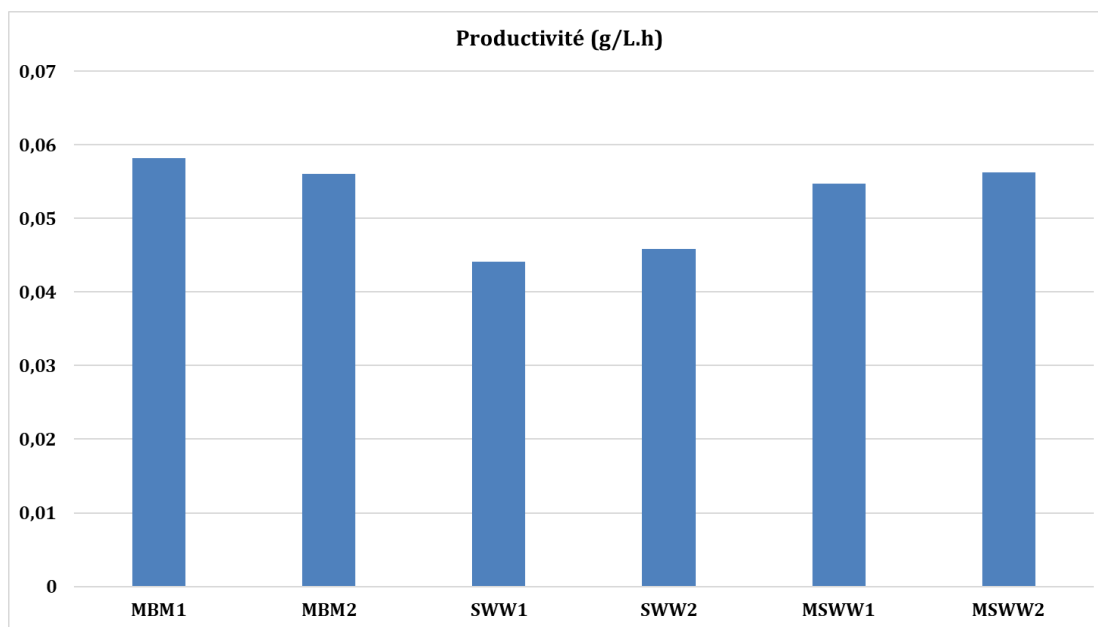


Figure III.9 : Productivité en biomasse chez *C. vulgaris* (GM2) au niveau des trois milieux utilisés

Ces résultats ont montré que le SWW seul ne peut rivaliser le MBM. Par contre l'utilisation du milieu MBG11 additionné de sels (N, P et Mg) donne de meilleures productivités qui se rapprochent de celles rapportés au niveau du MBG11 ce qui rend ce milieu plus compétitif. Par conséquent le MSWW peut être présenté comme une alternative aux milieux traditionnels car il offre des avantages économiques certaines.

La comparaison des résultats obtenus dans ce travail avec ceux d'autres auteurs qui ont travaillé sur la valorisation du lactosérum par la production de biomasse algale permet de faire ressortir ce qui suit :

Ces résultats confirment ceux obtenus par Ghobrini [58]. En effet, le milieu à base d'effluents laitiers utilisé seul donne moins de productivité en biomasse algale que le BG11 non modifié. Alors que l'apport en sels au niveau de ce milieu de culture l'a rendu plus performant que le BG11. Ceci rejoint les observations rapportées aussi par Humhal [70] où les milieux de synthèse se sont avérés moins compétitifs que les résidus de l'industrie laitière.

III.4 Evolution du pH en culture hétérotrophe de la souche indigène *C. vulgaris* (GM2)

Les valeurs du pH enregistrées tout au long de la culture sur les différents milieux montrent que le pH reste dans un intervalle qui favorise le développement des Chlorelles en générale, vu qu'elles sont comprises entre 6,73 et 7,92, ce qui implique un bon développement des cultures sans contamination.

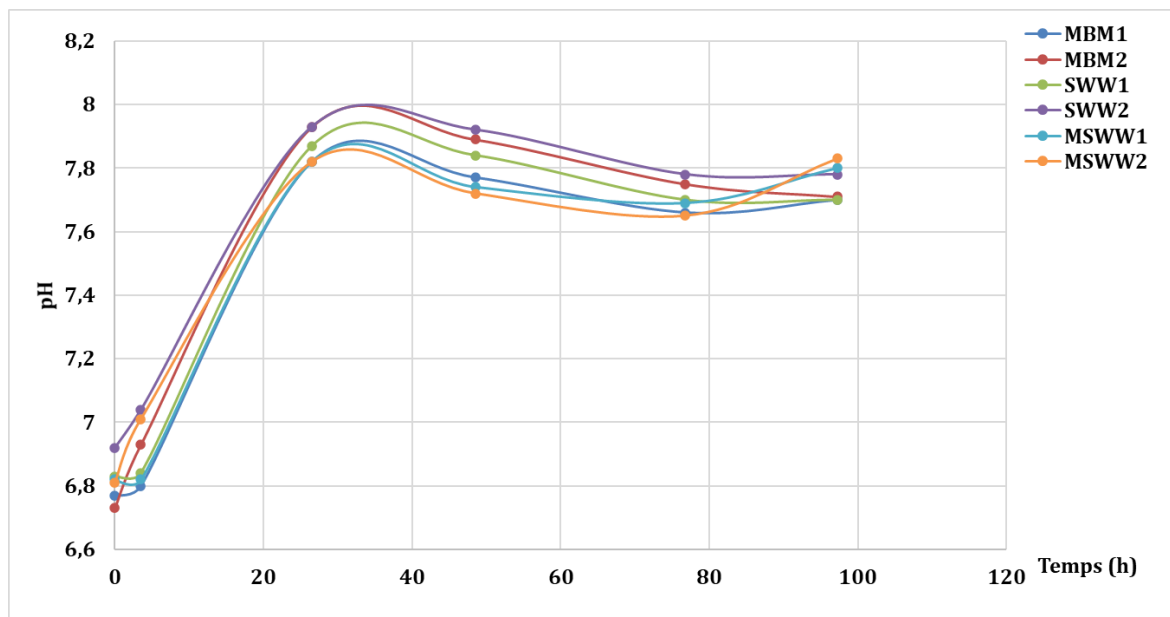


Figure III.10 : Variation du pH des trois milieux de culture au cours de l'expérience

Ainsi, pour les milieux MBM et MWW des valeurs plus proches de pH=7,8 ont été enregistrées en fin de culture ce qui certifie les observations de Ghobrini [60]. Par contre pour le milieu composé de lactosérum seul la valeur de pH est inférieure. En effet, il est important de rappeler que plus le pH s'éloigne de 7 et tend vers des valeurs acides ou basiques, un dérèglement au niveau des cultures apparut, dû à des contaminations par des bactéries ou champignons respectivement [62].

IV. EXTRACTION DES LIPIDES

Le but de cette étape est de libérer les lipides (acides gras) emprisonnée dans les cellules microalgales. L'analyse de la teneur en lipides a pour objectif de déterminer l'effet des différents milieux de culture sur la production de lipide chez la souche indigène de *C. vulgaris* (Tableau

	MWW1	MWW2	MBM1	MBM2	WW1	WW2
Biomasse algale sèche (g)	0,2150	0,2480	0,2462	0,239	0,2602	0,1989
Lipide (mg)	0,0502	0,0672	0,0588	0,0724	0,0359	0,0348
Proportion %	23,330	27,110	23,892	30,290	13,790	17,510

III.3).

Pour rappel la teneur en lipide est calculée comme suit :

$$\text{La teneur en lipides : Teneur \%} = \frac{m(\text{huile})}{m(\text{Biomasse})} \times 100$$

$$\text{Exemple de calcul : Teneur (\%)} = \frac{0,0542}{0,215} \times 100 = 25,22 \%$$

Tableau III.3 : Teneurs en lipides obtenues à partir des différentes cultures de la souche indigène *C.vulgaris* GM2 extraits pour les différents milieux.

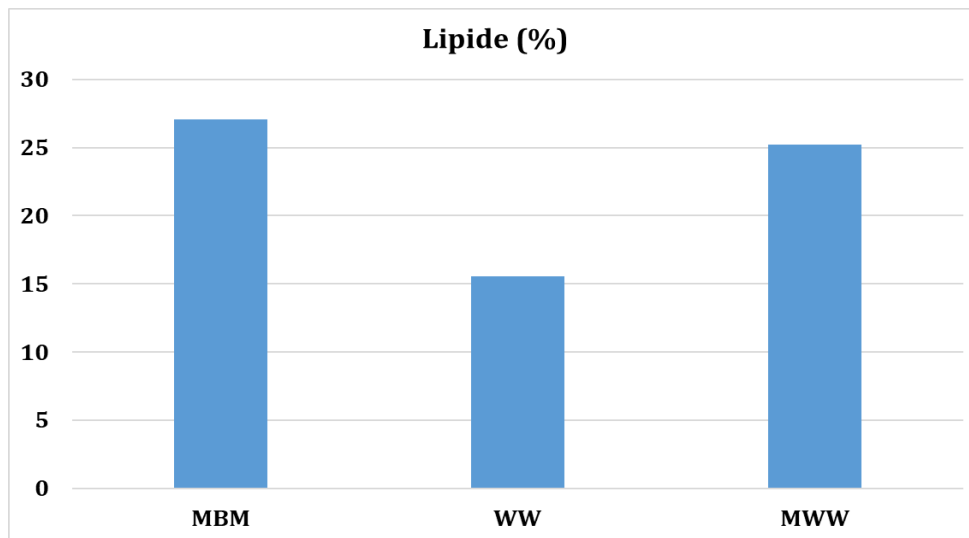


Figure III.11 : Proportion moyenne de lipides extraite à partir des différentes cultures de la souche indigènes *C. vulgaris* GM2

La figure III.11 donne la teneur moyenne en lipides totaux obtenue après 98 h de culture sans utilisation de limitation en nutriments. Cette analyse a été initiée pour déterminer l'effet des

différents milieux de culture sur la production de lipide. Ainsi, les meilleurs résultats sont obtenus au niveau de la biomasse des deux milieux modifier MBG11 et MSWW. Par contre pour le milieu SWW la proportion de lipide extraite dans les mêmes conditions de travail reste moyennement faible par rapport aux deux milieux modifiés. L'analyse de la variance a fait ressortir une différence significative entre la quantité de lipide produite en fonction du milieu de culture. Deux groupes se sont dégagés le groupe (A) avec les milieux MBG11 et MSWW et le groupe (B) avec le milieu SWW.

Des petites billes (2mm) ont été utilisé pour faciliter l'extraction des lipides au niveau des cellules algales. Ce procédé a permis d'une part, de faciliter l'extraction, d'autres part, d'éviter le broyage dans un mortier qui peut influencer sur les rendements en lipide. Par ailleurs, l'extraction, par un mélange de chloroforme : méthanol (2:1, v/v), a permis par le biais du méthanol de casser les parois et faire perforer la membrane afin de faire ressortir le maximum de lipides. Alors que, l'utilisation du chloroforme a permis de former un complexe avec les lipides et ainsi faciliter leur extraction .

Au final, les résultats obtenus convergent vers ceux obtenus par Arief [71] où le taux de lipides totaux enregistré chez *C. vulgaris* au cours d'une alimentation normale était de 26,71% sur un milieu de culture artificiel. De même, ils sont aussi en accord avec de ceux obtenus en présence d'une souche mutante de *Chlorella* GM12 isolée au niveau de la région de Metlili (27 %)[62].

V. TRANSESTERIFICATION DES LIPIDES EXTRAITES ET PROPRIETES DU BIODIESEL PRODUIT

V.1 Résultats de la transtérification

À partir des données des masses lipidiques extraites au niveau des différentes cultures de la souche indigènes *C. vulgaris* GM2 (voir Tableau III.3). La somme des lipides extraites correspond à un total de l'ordre de 0,3193 g pour l'étude de la transtérification.

De ce fait, la quantité du biodiesel obtenue, après transtérification bien sûr, est calculée à partir de la formule suivante :

$$m(\text{biodiesel}) = \text{masse ballon plein} - \text{masse ballon vide}$$

Ainsi :

$$m_{(\text{biodiesel})} = 23,301 - 23,086 \implies m_{(\text{biodiesel})} = 0,215 \text{ g.}$$

D'où un rendement de :

$$\text{Rendement \%} = \frac{m(\text{biodiesel})}{m(\text{huile})} \times 100$$

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{0,215}{0,3193} \times 100 = 67,33 \text{ \%}.$$

La proportion de biodiesel obtenu montre que le procédé suivi est prometteur (efficace). En effet, la proportion d'huile transformée en biodiesel est de 67 % ce qui représente une proportion non négligeable pour des cultures à grand échelle.

À présent, si les coûts de production de biomasse algale représentent une part importante dans le prix de production du biodiesel, le processus d'extraction représenterait à lui seule 50 % du coût de production [72]. Ainsi, le biodiesel étant un produit de faible valeur marchande. Les cultures algales pour la production du biodiesel doivent associer à la vente de biodiesel des coproduits ayant une valeur de revente élevée issue de la même culture pour permettre une meilleure rentabilité du processus [73].

V.2 Propriétés du biodiesel produit

Afin de déterminer les propriétés du biodiesel obtenu, le produit obtenu (le biodiesel) a été soumis à l'étude des propriétés physicochimiques. Au vu de la quantité de biodiesel obtenu, l'étude s'est focalisée sur la détermination de la densité, l'indice de réfraction et le pH (Tableau III.4).

Tableau III.4 : Propriétés du biodiesel obtenu

Caractère étudié	Biodiesel	Diesel	Norme mondiale du biodiesel
Masse volumique	0,87	0,81 – 0,89	0,86 – 0,89
pH à T=16°C	05,41	5,50 – 8,00	Neutre
n ^{20*}	01,45	1,444 – 1,484	–

*indice de réfraction

Il en ressort ainsi que les propriétés du biodiesel algale obtenu au cours de ce travail sont

analogues à celles du diesel fossile et du biodiesel avec des standards mondiaux. En outre, la masse volumique enregistrée appartient à la fois à la gamme du biodiesel et du diesel fossile, cela indique que ce biodiesel ou ce biocarburant peut facilement intégrer les moteurs à explosion actuel. Par ailleurs, si le pH enregistre des valeurs légèrement inférieures à celle d'un diesel fossile, cela pourrait être dû à l'utilisation de l'acide sulfurique (H_2SO_4 , 98%) à 4 %.

Conclusion générale

Aujourd'hui l'intérêt pour les microalgues est grandissant. Les différents domaines de leur application, leur plasticité métabolique et leur utilisation comme source d'énergie incite de plus en plus de laboratoires dans le monde à se pencher sur les possibilités de développement de la filière microalgale.

Dans la même optique, le travail entrepris au cours de ce projet de fin d'étude avait pour objectif d'évaluer l'influence que peut exercer les milieux de culture non conventionnel (effluents laitiers) sur la productivité en termes de biomasse mais aussi sur la production de lipides chez une souche indigène de *C. vulgaris* GM2 isolée dans la localité de Metlili dans le but de produire du biodiesel à moindre cout.

Ainsi, la méthode adoptée pour l'isolement et la purification de la souche indigène de *C. vulgaris* GM2, réalisée sur le milieu (BG11), a permis d'obtenir des souches purifiées utilisables pour la production de biodiesel.

Par ailleurs, les résultats obtenus, sur la culture de la souche indigène de *C. vulgaris* GM2, ont montré que l'utilisation du lactosérum peut remplacer l'usage de milieu artificiel comme le BG11. Ainsi, il a été constaté que la concentration de la biomasse était plus élevée lorsque le lactosérum était supplémenté de sels (N, P et Mg) (MSWW) que lorsque cet effluent était utilisé seul (SWW). A cet égard, le MSWW a augmenté la productivité en biomasse de façon significative par rapport au SWW, respectivement, $0,107 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et $0,062 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Par ailleurs, l'utilisation du milieu artificiel BG11 modifié (MBM) a donné une productivité en biomasse légèrement supérieur au milieu MSWW, en moyen de l'ordre de $0,116 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ qui reste statistiquement non significative. Ainsi, il paraît clair que la valorisation du lactosérum, par son utilisation comme support de culture, permet de réduire les coûts de production de la biomasse algale, et donc sur le prix du biodiesel algal mais aussi de réduire l'impact environnemental ce type d'effluents.

En outre, l'ajout de sels au niveau du lactosérum a également augmenté la teneur totale en lipides au niveau de la biomasse microalgale. Ainsi, les pourcentages obtenus sur le milieu

MSWW ont été supérieurs à ceux obtenus sur le milieu SWW. Par ailleurs, la variation de la teneur en lipides obtenus en culture sous MSWW reste non significative par rapport à la culture sous MBM et elle représente environ 25 % et 27 % de la biomasse algale produite, respectivement. De plus, 67 % des lipides produits ont été transformés en biodiesel cela signifie que la biomasse microalgale obtenue contenait une composition favorable en acides gras. En outre, le biodiesel obtenu a montré une qualité similaire au diesel fossile et au biodiesel standard mondial.

Globalement, les résultats obtenus dans ce projet se sont avérés très satisfaisants et ont permis de montrer que la valorisation d'un effluent laitier en l'occurrence le lactosérum reste réalisable et avantageuse économiquement et surtout environnementalement.

Pour parfaire notre travail, il aurait été préférable de réaliser un plan d'expérience préalable afin de déterminer la nature mais aussi la concentration en sels à additionner au lactosérum pour atteindre un optimum de rendement en biomasse algale. Par ailleurs, l'utilisation de la GPG-SM aurait été d'une grande aide car elle nous aura permis de déterminer la qualité des acides gras présents ce qui rendra leurs valorisations plus ciblées. D'autre part, le biodiesel est un produit de faible valeur, la centrifugation pour la récolte des microalgues entraînerait une augmentation importante des prix de ce biocarburant. Ainsi, l'utilisation d'autres techniques de récolte comme l'auto-floculation permettrait sans doute de réduire le coût de ce biocarburant et de rendre cette filière plus compétitive.



Glossaire

Biocarburant : est un combustible liquide ou gazeux, destiné à alimenter des équipements de chauffage ou de transport, dont les voitures. À l'inverse de l'essence ou du gazole, il est obtenu à partir de matières premières non fossiles, issues de la biomasse : des matières organiques d'origine végétale, animale, ou issues de déchets. Ils peuvent être mélangés directement à l'essence ou au gazole, sans adaptation du réseau de distribution ni des véhicules.

Biodiesel : est un carburant alternatif au diesel pétro-sourcé. Il peut être utilisé seul dans les moteurs ou être mélangé avec du pétro-diesel à différentes concentrations. Ce carburant est obtenu à partir d'huile végétale ou de graisse animale transformée par un procédé chimique appelé la transestérification. Il consiste à faire réagir de l'huile avec un alcool (méthanol ou éthanol) en présence d'un catalyseur (hydroxyde de sodium ou de potassium) afin d'obtenir des esters méthyliques ou éthyliques (le biodiesel) et un sous-produit, la glycérine. Cette dérivé est écologique contrairement au petro-diesel permette aux pays qui le produise de devenir moins dépendants sur le plan énergétique. Tout en évitant des rejets de CO₂ dans l'atmosphère.

Bioéthanol : est considéré comme une énergie renouvelable, produit à partir de céréales (maïs, blé...) ou de betteraves. Il est obtenu par la fermentation des sucres contenus dans ces matières végétales. Distillé puis déshydraté (l'eau ne s'incorporant pas à l'essence), cet alcool brut devient un composant de l'essence à différents pourcentages selon les carburants. Il permet également de diminuer les émissions de gaz à effet de serre, par rapport aux carburants fossiles.

Biogaz: est un gaz produit par la fermentation de matières organiques animales ou végétales en l'absence d'oxygène. L'énergie du biogaz provient uniquement du méthane. Le biogaz est ainsi la forme renouvelable de l'énergie fossile très courante qu'est le gaz naturel qui, lui, contient essentiellement du méthane, mais aussi du butane, du propane et d'autres éléments.

Biomasse: est l'ensemble de la matière organique d'origine végétale ou animale d'un milieu naturel. Considérée comme source d'énergie, la biomasse englobe le bois et ses sous-produits, les sous-produits de l'industrie (papetière et agroalimentaire notamment), les produits et sous-produits issus de l'agriculture, les sous-produits animaux ainsi que les déchets urbains (boues de stations d'épuration, ordures ménagères, déchetteries, etc). C'est une source d'énergie verte tel que : les biocarburants pour le transport (produits essentiellement à partir de céréales, de sucre, d'oléagineux et d'huiles usagées); le chauffage

domestique (alimenté au bois) ; et la combustion de bois et de déchets dans des centrales produisant de l'électricité, de la chaleur ou les deux.

Chimie verte : parfois qualifiée de chimie durable ou renouvelable, est l'application des principes du développement durable au monde de la chimie. Il s'agit donc d'une chimie qui se soucie de l'équilibre économique, social et environnemental du milieu dans lequel elle s'exerce. Elle a pour but de concevoir et de développer des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses.

Chlorella Vulgaris : est une espèce d'algues vertes unicellulaire microscopique de la famille des Chlorelace. Grâce à la photosynthèse, elle se reproduit très rapidement en eau douce dans des régions où l'ensoleillement est important et les températures assez douces. La chlorelle mesure entre 2 et 10 microns et il est possible de voir sa couleur verte et sa forme presque sphérique au microscope.

Dioxyde de carbone (CO₂) : Gaz qui se produit naturellement et qui est également le produit dérivé de la combustion des ressources fossiles et de la biomasse, ainsi que des changements d'affectation des terres et autres processus industriels.

Effet de serre est un phénomène naturel: la surface de la Terre absorbe naturellement 70% du rayonnement solaire tandis que le reste est renvoyé vers l'espace sous l'effet de la réverbération. Le rayonnement solaire absorbé est alors transformé en rayonnement infrarouge et restitué dans l'atmosphère. Une partie de ce rayonnement infrarouge est alors à son tour renvoyée vers l'espace tandis que l'autre partie est retenue par les gaz à effet de serre présents dans l'atmosphère. En effet, en l'absence de ce phénomène, la température moyenne serait de -18°C, au lieu de +15°C actuellement. Néanmoins, les activités humaines ont déséquilibré ce phénomène naturel, en rejetant plus de gaz à effet de serre, le climat se réchauffe car l'atmosphère ne peut absorber cet effet de serre additionnel.

Énergie fossile : est une énergie dont les réserves se sont constituées il y a des millions d'années, par décomposition sédimentaire de substances organiques pour l'essentiel végétale, dans des conditions géophysiques et géochimiques particulières, pour produire le charbon, le pétrole et le gaz naturel. Ces énergies sont la cause principale du réchauffement climatique

Énergie renouvelable: une énergie est dite renouvelable lorsqu'elle provient de sources que la nature renouvelle en permanence. Ainsi, sont classées dans cette catégorie (EnR), toutes les énergies que la nature constitue ou reconstitue plus rapidement que l'Homme ne les utilise. Elles peuvent ainsi être considérées comme inépuisables à l'échelle du temps

humain. Elles sont également désignées par le terme « énergies vertes » ou « énergies propres » relatif au faible impact environnemental de leur exploitation.

Gaz à effet de serre : Gaz qui absorbent l'énergie émise par la Terre (sous forme de rayonnement infrarouge) et qui la rayonnent, à leur tour, vers le sol, provoquant ainsi un réchauffement de la surface du globe.

Lactosérum : est la fraction liquide obtenue lors de la coagulation du lait dans le processus de fabrication du fromage et de la caséine, après la séparation du caillot ou de la phase micellaire. Ses caractéristiques correspondent à un liquide de couleur jaune verdâtre, trouble, de saveur fraîche, faiblement sucrée par le lactose, de caractère acide qui contient 94% d'eau, de protéines, de sucre et peu de graisses. C'est un déchet difficile à traiter et à éliminer en raison des grandes quantités produites dans l'industrie du fromage, c'est l'une des principales sources de pollution de l'environnement d'où l'importance et la nécessité de sa valorisation.

Photosynthèse : Grâce à la chlorophylle, les végétaux verts utilisent l'énergie du soleil pour transformer le dioxyde de carbone (CO_2) et l'eau (H_2O) absorbés en matière organique (le glucose) qui leur permettent de se développer (c'est une réaction chimique). A la fin de la réaction, le dioxygène (O_2) est rejeté par les végétaux.

Réchauffement climatique : est une augmentation de la température moyenne à la surface de la Terre, qui modifie durablement les équilibres météorologiques et les écosystèmes. Le principal facteur de ce phénomène est l'émission de gaz à effet de serre, dont plus de 90 % sont le dioxyde de carbone (CO_2) et le méthane. La combustion de combustibles fossiles comme le charbon, le pétrole et le gaz naturel pour la consommation d'énergie est la principale source de ces émissions.



Références Bibliographiques

- [1] Artus, P., d'Autume, A., Chalmin, P., & Chevalier, J. M. (2010). Les effets d'un prix du pétrole élevé et volatil. *CAE Rapport*.
- [2] Alain, D. (2008). La Biomasse Energie: Définition, Ressources et Usages. *Dunod, Paris*.
- [3] Ballerini, D., Girard, P., His, S., Marty, E., Montagne, X., Napoli, A., & Seiler, J. M. (2006). La transformation de la biomasse lignocellulosique par voie chimique.
- [4].https://www.actu.environnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/biocarburant.php4, consulté le 18 JUIN 2021.
- [5] Poitrat, E. (2009). Biocarburants, Techniques de l'Ingénieur. *France, BE, 8550*.
- [6] Campos-Fernandez, J., Arnal, J. M., Gomez, J., Lacalle, N., & Dorado, M. P. (2013). Performance tests of a diesel engine fueled with pentanol/diesel fuel blends. *Fuel, 107*, 866-872.
- [7] Wang, C., Xu, H., Daniel, R., Ghafourian, A., Herreros, J. M., Shuai, S., & Ma, X. (2013). Combustion characteristics and emissions of 2-methylfuran compared to 2, 5-dimethylfuran, gasoline and ethanol in a DISI engine. *Fuel, 103*, 200-211.
- [8] Keskin, A., Yaşar, A., Reşitoğlu, İ., Akar, M. A., & Sugözü, İ. (2013). The influence of diesel fuel-biodiesel-ethanol-butanol blends on the performance and emission characteristics of a diesel engine. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 35*(19), 1873-1881.
- [9] Ballerini, D., & Lemarchand, J. L. (2007). *Le plein de biocarburants?: enjeux et réalités*. Éditions Technip.
- [10] Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances, 25*(3), 294-306.
- [11] Gonzales, A. D. C. (2008). Overall stocktaking of biofuel development in Asia-Pacific: Benefits and challenges, [Enligne]. http://www.unescap.org/ESD/energy/dialogue/biofuels/benefit_challenges/documents/Overall%20Stocking%20of%20Biofuel%20Development-Final.pdf, consulté 16 mai 2021.
- [12] Gui, M. M., Lee, K. T., & Bhatia, S. (2008). Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy, 33*(11), 1646-1653.
- [13] Himmel, M. E. (2009). *Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Wiley-Blackwell.
- [14] Miao, X., & Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource technology, 97*(6), 841-846.
- [15] Mounir, M., Belgire, M., Lahnaoui, S., Hamouda, A., Thonart, P., Delvigne, F., & ALAOUI, M. I. (2016). Maîtrise de la fermentation alcoolique sous stress éthanolique, thermique et osmotique de la souche *Saccharomyces cerevisiae* YS-DN1 en vue de la

préparation du vinaigre de fruits. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 4(2), 86-95.

[16] <https://www.connaissancedesenergies.org/fiche-pedagogique/biocarburantv> consulté le 25 mai 2021.

[17] Bastien, J. C. (2012, January). SYLVABIOM: Nouveaux concepts de cultures ligneuses durables pour la production de biomasse à des fins énergétiques. In *Quelle recherche pour les Énergies du futur? Colloque Bilan Énergie ANR*

[18] BOUBOU-BOUZIANI, N. (2017). Potentiel et développement des énergies renouvelables en Algérie. *Communication science et technologie*

[19] Schönborn, A., Ladommatos, N., Williams, J., Allan, R., & Rogerson, J. (2009). The influence of molecular structure of fatty acid monoalkyl esters on diesel combustion. *Combustion and flame*, 156(7), 1396-1412.

[20] Fernando, S., Karra, P., Hernandez, R., & Jha, S. K. (2007). Effect of incompletely converted soybean oil on biodiesel quality. *Energy*, 32(5), 844-851.

[21] <http://cerig.pagora.grenoble-inp.fr/memoire/2013/biocarburant-microalgue.htm> consulté le 19 juin 2021

[22] <https://www.futura-sciences.com/planete/environnement/energie-renouvelable> consulté le 19 juin 2021

[23] Sumi, Y. (2009). *Microalgae pioneering the future-application and utilization*. NISTEP Science & Technology Foresight Center.

[24] Norton, T. A., Melkonian, M., & Andersen, R. A. (1996). Algal biodiversity. *Phycologia*, 35(4), 308-326.

[25] Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.

[26] Mann, D. G., Sato, S., Trobajo, R., Vanormelingen, P., & Souffreau, C. (2010). DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. *Cryptogamie Algologie*.

[27] Kehr, J. C., & Dittmann, E. (2015). Biosynthesis and function of extracellular glycans in cyanobacteria. *Life*, 5(1), 164-180.

[28] Ksouri, J., & Ben Said, R. (1998). Potentialités en macroalgues: cartographie et biomasse de l'agarophyte *Gracilaria* dans le lac de Bizerte.

- [29] Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4), 621-639.
- [30] Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.
- [31] Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Asian pacific phycology in the 21st Century: Prospects and challenges*, 33-37.
- [32] Salomez, M., Hoarau, M., Gautret, L., & Riviere, L. (2009). Microalgae industry development opportunities at Reunion island.
- [33] Amor, H. B. (2015). *Etude et optimisation de bioaccumulation de Mg²⁺ dans les microalgues «Chlorella vulgaris»* (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay; Université de Sfax (Tunisie)).
- [34] Crofcheck, C. L., Monstross, M., Xinyi, E., Shea, A. P., Crocker, M., & Andrews, R. (2012). Influence of media composition on the growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* utilized for CO₂ mitigation. In *2012 Dallas, Texas, July 29-August 1, 2012* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- [35] <https://eol.org/pages/921268>, consulté le 21 juin 2021.
- [36] Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of biotechnology*, 126(4), 499-507.
- [37] Xiong, W., Li, X., Xiang, J., & Wu, Q. (2008). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(1), 29-36.
- [38] Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2013). *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press.
- [39] Luan, T. G., Jin, J., Chan, S. M., Wong, Y. S., & Tam, N. F. (2006). Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process biochemistry*, 41(7), 1560-1565.
- [40] Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., & Canizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1), 1-10.
- [41] Weiss, H. (2008). *U.S. Patent Application No. 12/073,495*.
- [42] Chisti Y (2007) Biodiesel from Microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306.

- [43] Luquet, F. M. (1985). Lait et produits laitiers: vache, brebis, chèvre. v. 1: Les laits: de la mamelle à la laiterie. -v. 2: Les produits laitiers: transformation et technologies. -v. 3: Qualité, énergie et tables de composition.
- [44] Dendouga, W. (2006). Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. *Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Diplôme de Magister, Université MENTOURI, Constantine, Algérie.*
- [45] Benaouida, K. (2008). Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnement des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. *Université Mentouri, Constantine.*
- [46] Gana, S., & Touzi, A. (2001). Valorisation du lactosérum par la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue. *Rev. Energ. Ren, 1*, 51-58.
- [47] McIntosh, G. H., Royle, P. J., Le Leu, R. K., Regester, G. O., Johnson, M. A., Grinsted, R. L., ... & Smithers, G. W. (1998). Whey proteins as functional food ingredients? *International Dairy Journal, 8*(5-6), 425-434.
- [48] LINDEN, G., & LORIENT, D. (1994). Biochimie Agro-Industrielle: Valorisation alimentaire de la production agricole. Edition Masson, Paris. *LOWRY OH ROSEBROUGH NJ FARR A. L and RANDELL RJ (1951). protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193*, 265-275.
- [49] Mollea, C., Marmo, L., & Bosco, F. (2013). Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In *Food industry*. IntechOpen.
- [50] Sottiez, P. (1990). Produits dérivés des fabrications fromagères in: lait et produits laitiers; vache, brebis, chèvre. *Ed Lavoisier, Paris, 633p.*
- [51] Yang, S. Y., Jones, J. H., Olsen, F. J., & Paterson, J. J. (1980). *Soil as a medium for dairy liquid waste disposal* (Vol. 9, No. 3, pp. 370-372). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
- [52] <https://perspective.usherbrooke.ca/bilan/servlet/BMTendanceStatPays?langue=fr&codePays=D%20ZA&codeStat=RSA.FAO.CheeseAllKinds&codeStat2=x> consulté 20 juin 2021.
- [53] Marwaha, S. S., & Kennedy, J. F. (1988). Whey—pollution problem and potential utilization. *International journal of food science & technology, 23*(4), 323-336.
- [54] Siso, M. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource technology, 57*(1), 1-11.
- [55] Durmus, N., Tasli, O., & Kadioglu, A. (1999). The effect of whey on the growth of some algae.

- [56] Silva, A. C., Guimarães, P. M., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2010). Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(9), 973-982.
- [57] Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J., & Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource technology*, 118, 61-66.
- [58] GHOBIRINI D., BRANYIK T., YAKOUB-BOUGDAL S., AIBOUD K. BioTech 2017, and 7 th Czech-Swiss Symposium: Heterotrophic cultivation of *Chlorellavulgaris* on saline wastewater from dairy industry, 13-17 June 2017, Biotech: Prague, Czech Republic.
- [59] <https://fr.tutiempo.net> consulté 30juin 2021.
- [60] Ghobrini, D., Brányik, T., Kebbab, L., Poutout, B., & Aïboud, K. (2018, December). Cultivation of *Chlorella vulgaris* using medium from a dairy effluent. In *2018 6th International Renewable and Sustainable Energy Conference (IRSEC)* (pp. 1-5). IEEE.
- [61] Ghobrini, D., Aïboud, K., Kebbab, L., Koumad, L., & Yakoub-Bougdal, S. (2012). Production de bioéthanol à partir de rebuts de dattes par fermentation en milieu solide. *Revue des Energies Renouvelables SIENR'12*
- [62] Daouda, D., Douadi, T., Ghobrini, D., Lahouel, N., & Hamani, H. (2019, December). Investigation of some phenolic-type antioxidants compounds extracted from biodiesel as green natural corrosion inhibitors; DFT and molecular dynamic simulation, comparative study. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2190, No. 1, p. 020098). AIP Publishing LLC.
- [63] Ghobrini, D., Potocar, T., Smolova, J., Krausova, G., Yakoub-Bougdal, S., & Branyik, T. (2020). Heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using saline waste water from the demineralization of cheese whey. *Biotechnology letters*, 42(2), 209-217.
- [64] Shen, B. G., Sun, J. R., Hu, F. X., Zhang, H. W., & Cheng, Z. H. (2009). Recent progress in exploring magnetocaloric materials. *Advanced Materials*, 21(45), 4545-4564.
- [65] Escande, M., Gayral, L., & Girard, M. (1975, July). Psychotic states and psychotic organization during anorexia nervosa. In *Annales medico-psychologiques*. Elsevier Science.
- [66] Guerif, F., Cadoret, V., Rahal-Perola, V., Lansac, J., Bernex, F., Jacques Panthier, J., ... & Royere, D. (2002). Apoptosis, onset and maintenance of spermatogenesis: evidence for the involvement of Kit in Kit-haplodeficient mice. *Biology of reproduction*, 67(1), 70-79.

- [67] Anderson, C., & Cabana, G. (2005). $\delta^{15}\text{N}$ in riverine food webs: effects of N inputs from agricultural watersheds. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(2), 333-340.
- [68] Gao, C., Xiong, W., Zhang, Y., Yuan, W., & Wu, Q. (2008). Rapid quantitation of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance. *Journal of microbiological methods*, 75(3), 437-440.
- [69] Doucha, J., & Lívanský, K. (2012). Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. *Journal of applied phycology*, 24(1), 35-43.
- [70] Humhal, T., Kastanek, P., Jezkova, Z., Cadkova, A., Kohoutkova, J., & Branyik, T. (2017). Use of saline waste water from demineralization of cheese whey for cultivation of *Schizochytrium limacinum* PA-968 and *Japonochytrium marinum* AN-4. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40(3), 395-402.
- [71] Nasr, N., Arief, M., Abdel-Aleem, A., & Malhat, F. (2009). Persistent organic pollutants (POPs) in Egyptian aquatic environment. *J. Appl. Sci. Res*, 5(11), 1929-1940.
- [72] Pienkos, P. T., & Darzins, A. L. (2009). The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, 3(4), 431-440.

Résumé

Face à l'éventuel épuisement des ressources pétrolières ainsi qu'à la pollution engendrée par l'utilisation d'énergie fossiles, plusieurs alternatives ont été envisagées. De nos jours, la production du biodiesel à partir des microalgues représente l'une des alternatives viables pour remplacer les combustibles (carburants) fossiles. Ces microorganismes photosynthétiques présentent plusieurs avantages dont leur capacité à croître sur des effluents (milieux de cultures). Néanmoins cette technologie reste confrontée à plusieurs défis dont les coûts de production relativement élevés.

La présente étude a pour but de trouver un milieu de culture pour les microalgues, durable et moins coûteux pour se substituer aux milieux artificiels dans le but de produire du biodiesel à moindre coût. A cet effet, une souche indigène de *C. vulgaris* est évaluée pour sa capacité à croître, en condition hétérotrophe, au niveau des effluents laitiers (SWW). Les résultats montrent que l'utilisation du WW seul ne peut pas rivaliser avec un milieu de culture artificiel (BG11). Par contre l'ajout de sels (N, P et Mg) à l'effluent MSWW permet d'augmenter la productivité notamment en terme de lipides. De plus, un rendement significatif en biodiesel (67%), de qualité comparable à celle du diesel fossile et du biodiesel avec des standards mondiaux, est obtenu par transestérification des lipides extraits. Ceci indique que ce biocarburant peut facilement intégrer les moteurs actuels.

Mots clés : Microalgues, lactosérum, biomasse, lipides, biodiesel

Abstract:

Confronted with the eventual depletion of oil resources as well as the pollution generated by the use of fossil fuels, several alternatives have been reconsidered. Nowadays, the production of biodiesel from microalgae represents one of the viable alternatives to replace fossil fuels. These photosynthetic microorganisms have several advantages, including their ability to grow on effluents. However, this technology remains confronted to several challenges, including relatively high production costs.

The purpose of this study is to find a sustainable and less expensive growing medium to replace artificial media in order to produce biodiesel at a lower cost. To this end, an indigenous strain of *C. vulgaris* will be evaluated for its capacity to grow, in heterotrophic conditions, inside milk effluents (SWW). The results show that the use of SWW alone cannot compete with an artificial culture medium (BG11). On the other hand, the addition of salts (N, P and Mg) to the milk effluents (SWW) increased especially its lipid productivity. Moreover, a significant yield of biodiesel (67%), of a comparable quality to that of fossil diesel and biodiesel with world standards, is obtained by transesterification of the extracted lipids indicating that this biofuel can easily integrate current motors.

Key words: Microalgae, milk effluents, biomass, lipids, biodiesel