

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOU MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCE AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE**



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique en Biologie
Option : Microbiologie Appliquée**

Thème

**Recherche de souches d'intérêt biotechnologiques :
Evaluation de leurs pouvoirs de dégradation et/ou de
biotransformation sur quelques sous-produits industriels**

Présenté par :

Melle : OULD HAMOUDA Mélissa Dahbia

Melle HABACHOU Mélissa

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme OUALI-ABDOUNE Samia Maitre assistante chargée de cours UMMTO

Co-promotrice : Mme LARDJANE Nadia Maitre de conférences A UMMTO

Promotrice : M^{elle} DERMECHE Samia Maitre-assistante Classe A UMMTO

Examinatrice 1 : M^{elle} BEN AHMED DJILALI Adiba Maitre de conférences UMMTO

Examineur 2 : M^r CHERGUI Achour Maitre-assistant Classe B UAMOB

2014-2015

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions le bon Dieu, le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la volonté de mener à long notre travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude aux personnes, qui grâce à leur aide, notre travail a vu le jour :

Notre promotrice *Mlle DERMECHE Samia*, pour le suivi et l'aide précieuse qu'elle nous a apportée pour la réalisation de ce projet, pour l'intérêt qu'elle a apporté à notre travail ainsi que ses précieux conseils et ses critiques fondées.

Notre Co-promotrice Mme *LARDJANE Nadia* d'avoir eu l'amabilité d'évaluer notre travail.

Nous exprimons notre reconnaissance à Mme *OUALI-ABDOUNE Samia* (UMMTO) qui a accepté de présider le jury. Nous remercions également *BEN AHMED DJILLALI Adiba*, et *CHERGUI Achour* qui nous font l'honneur d'être les examinateurs de ce mémoire.

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOU MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCE AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE**



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique en Biologie
Option : Microbiologie Appliquée**

Thème

**Recherche de souches d'intérêt biotechnologiques :
Evaluation de leurs pouvoirs de dégradation et/ou de
biotransformation sur quelques sous-produits industriels**

Présenté par :

Melle : OULD HAMOUDA Mélissa Dahbia

Melle HABACHOU Mélissa

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme OUALI-ABDOUNE Samia Maitre assistante chargée de cours UMMTO

Co-promotrice : Mme LARDJANE Nadia Maitre de conférences A UMMTO

Promotrice : M^{elle} DERMECHE Samia Maitre-assistante Classe A UMMTO

Examinatrice 1 : M^{elle} BEN AHMED DJILALI Adiba Maitre de conférences UMMTO

Examineur 2 : M^r CHERGUI Achour Maitre-assistant Classe B UAMOB

2014-2015

Dédicaces

Nous dédions ce modeste travail

A ceux qui nous ont donné sans rien en retour,

*A ceux qui nous ont encouragés et soutenus dans nos moments les plus
difficiles,*

Et ceux à qui nous devons tant.

*A **IDRIS** sans lequel ce travail n'aurait pas abouti.*

*A nos parents, que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux
de nos profondes reconnaissances pour tout ce que vous avez fait.*

A nos chères familles

A tous nos ami(e)s

*Nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à
la réalisation de ce travail.*

Un grand merci à tous

Résumé

De nombreux sous-produits de l'industrie agroalimentaire sont rejetés dans la nature et constituent de ce fait un facteur de pollution de par leur grande quantité, ainsi que leur charge en matières organiques et en produits toxiques.

Aujourd'hui grâce aux procédés biotechnologiques, il est possible de valoriser ces résidus et de les mettre sur le marché local, comme la valorisation énergétique de la biomasse (grignon d'olive, lactosérum) par le procédé de bioconversion ou par le procédé de biodégradation des résidus toxiques (phénol) qui se déversent dans les effluents d'eaux.

Nous avons réalisé de nombreux essais de fermentation afin de fixer les paramètres suivants: les différentes levures oléagineuses et champignons cellulolytiques ayant la capacité de dégrader ou pas le substrat, l'adaptation ou non au substrat, et le temps de fermentation afin d'optimiser le procédé. Pour la biodégradation du phénol, *Y.lipolytica* a révélé une meilleure aptitude à dégrader le phénol par rapport à *C.curvatus* mais l'effet de l'adaptation au substrat, l'a rendue plus efficace avec un taux de dégradation de 97% après 72h d'incubation. Pour la bioconversion du lactosérum déprotéiné, c'est *Y.lipolytica* qui a une meilleure activité de bioconversion de par sa production lipidiques 1,3µg/360mg de MS par rapport à *C.curvatus*. Pour la bioconversion du grignon d'olives c'est pour *Penicillium sp* qu'on enregistre la meilleure production protéique (130µg/ml).

Mots clés : Sous-produits agro-alimentaire, bioconversion, biodégradation, levures oléagineuse, champignons cellulolytiques.

Liste des abréviations

°C : Degré celsius

°D : Degré dornic

4-AAP : 4-aminoantipyrine

AGU : Unité d'anhydroglucose

C100 : Acétate de cellulose

CMC : La Carboxy-Méthyl-Cellulose

CPL : Concentré protéique de lactosérum

DBO : Demande biochimique en oxygène

DIB : Déchets industriels banals

DID : Déchets industriels dangereux

DII : Déchets industriels inertes

DNS : Dinitrosalicylique

DO : densité optique

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FMS : Fermentation sur milieu solide

GO : Grignon d'olive

IAA : Industries agroalimentaires

MM : Milieu minimal

MW : Mendel et Weber

Pa : Tension de vapeur

Liste des abréviations

PDA : Gélose dextrosée à la pomme de terre

SmFs : Fermentation sur milieu liquide

TAG: Triacylglycérols

Liste des figures

Figure 1 : schéma représentatif des différents types de déchets organiques.	4
Figure 2 : Schéma de la composition physique de l'olive.	9
Figure 3 : Représentation de la molécule de cellulose JASPARD (2012).	13
Figure 4 : La CMC sous forme de poudre.	13
Figure 5 : Représentation d'une molécule de CMC.	14
Figure 6 : représentation chimique du xylane.	14
Figure 7 : Représentation d'une molécule d'Avicel.	15
Figure 8 : Représentation moléculaire de C100 LAPOINTE (2000).	16
Figure 9 : Structure chimique de la molécule de phénol	18
Figure 10 : Diagramme récapitulatif du matériel et méthodes de travail.	31
Figure 11 : Monoculture en batch dans des erlenmeyers de 100ml.	33
Figure 12 : Etapes suivies pour la réalisation de la courbe d'étalon.	34
Figure 13 : Dosage colorimétrique du phénol la couleur est proportionnelle à la concentration en phénol.	35
Figure 14 : Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique du phénol.	35
Figure 15 : Protocole expérimental de la biodégradation du phénol.	36
Figure 16 : Les monocultures en batch de <i>C.curvatus</i> et de <i>Y.lipolytica</i> dans le lactosérum dé-protéiné.	37
Figure 17 : Les étapes suivies pour la bioconversion du lactosérum dé-protéiné.	39
Figure 18 : Grignon d'olives brut utilisé.	40
Figure 19 : A : Grignon d'olives broyé. B : filtration du G.O hydrolysé.	42
Figure 20 : Protocole expérimental de la bioconversion du grignon d'olives.	43

Liste des figures

Figure 21: Photographie prise après incubation des tubes à 100°C durant 5min pour le dosage du glucose, la couleur est proportionnelle à la concentration en glucose.	45
Figure 23 : Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique de la BSA avec le réactif (1).	46
Figure 24 : Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique de la BSA avec le réactif (2).	47
Figure 25 : Photographie prise lors du dosage de la BSA (la couleur est proportionnelle à la concentration en BSA).	47
Figure 26 : Biodégradation du phénol par les deux souches en fonction des concentrations (mg/l) phénoliques.	49
Figure 27: l'effet de l'adaptation de <i>C.curvatus</i> (A) et <i>Y.lipolytica</i> (B) sur la biodégradation du phénol.	50
Figure 28 : Cinétique de biodégradation du phénol. A : par <i>C.curvatus</i> . B : par <i>Y.lipolytica</i> (Adaptées).	52
Figure 29 : Cinétique de croissance de la biomasse A : de <i>C.curvatus</i> B : de <i>Y.lipolytica</i> .	54
Figure 30 : Cinétique de dégradation du lactose (A) et de production de protéines(B) par deux levures : <i>C.curvatus</i> (A) et <i>Y.lipolytica</i> (B).	57
Figure 31 : Activité cellulolytiques d' <i>Aspergillus niger</i> .(A) ; <i>Penicillium sp</i> (B) ; <i>Trichoderma reesei</i> (C) sur trois substrats témoins Xylane, Avicel et CMC.	60
Figure 32 : Concentrations des sucres totaux dégradés et protéines produites après culture des trois souches de champignons sur le grignon d'olives.	62

Liste des tableaux

Tableau I : Comparaison de différents types de lactosérum (SOTTIEZ, 1990).	6
Tableau II : Teneur en vitamines dans le lactosérum (LINDEN et LORIENT, 1994).	7
Tableau III : Composition chimique indicative des différents types de grignons (Plusieurs auteurs).	10
Tableau IV : Teneur en cellulose de différentes espèces végétales SHIRAIISHI (2000).	12
Tableau V : Propriétés physico-chimiques du phénol.	18
Tableau VI : Comparaison entre SSF et SmF (RAIMBAULT, 1998; ASSAMOI <i>et al</i> , 2009).	23
Tableau VII : les différentes souches d'intérêt biotechnologiques. (wikipédia).	24
Tableau VIII : Aspect des pré-cultures des souches étudiées sur milieu PDA et leurs caractéristiques. (wikipédia).	29
Tableau IX : Conditions de réalisation des essais de la biodégradation du phénol par les levures librement suspendus dans des erlenmeyers.	33
Tableau X : Concentration des sucres et des protéines du lactosérum déprotéiné, après culture de de <i>C.curvatus</i> et <i>Y.lipolytica</i> .	56
Tableau XI : Le taux de sucres totaux dégradés (%) et les concentrations en protéines produites (µg/ml). après culture de <i>C.curvatus</i> et de <i>Y.lipolytica</i> .	63

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Les déchets industriels	3
I. Définition des déchets	3
II. Les déchets industriels	3
II.1 Les déchets inertes (DI)	3
II.2 Les déchets industriels banals (DIB)	3
II.3 Les déchets dangereux	4
III. Les déchets organiques industriels	4
III.1. Les déchets organiques non toxiques	4
III.1.1. Le lactosérum	5
III.1.1.1. Différents types de lactosérum	5
III.1.1.2 Comparaison entre les différents types du lactosérum	6
III.1.1.3. Les différentes exploitations du lactosérum	7
III.1.1.4. Lactosérum substrat de fermentation	8
III.1.2. Le grignon d'olives	8
III.1.2.1. Définition du grignon d'olive	8
III.1.2.2. Types des grignons d'olives	9
III.1.2.3. Composition chimique des grignons	9
III.1.2.4. Pollution des grignons d'olives	10
III.1.2.5. Biodégradabilité/ hydrolyse et fermentation microbienne	11
III.1.3. La cellulose	11
III.1.3.1. définition de la cellulose	11
III.1.3.2. Structure de la cellulose	12
III.1.3.3. Dérivés de cellulose	13
III.1.3.3.1. La Carboxy-Méthyl-Cellulose (CMC)	13
III.1.3.3.2. Le xylane	14

III.1.3.3.3. L'avicel	15
III.1.3.3.4. Acétate de cellulose (C100)	15
III.1.3.3. Généralités sur les cellulases	16
III.2. les sous-produits industriels toxiques	17
III.2.1. Le phénol	17
III.2.1.1. Identité et propriétés physiques et chimiques	17
III.2.1.2. Comportement du phénol dans l'environnement	19
III.2.1.3. Toxicité	19
III.2.1.4. Biodégradation (minéralisation) du phénol	20
Chapitre II : Valorisation des déchets des organiques	21
I. Valorisation des déchets	21
II. Types de valorisation	21
II.1. Valorisation biologique (Valorisation organique)	21
II.1.1. Par bioconversion	21
II.1.1.1. Méthode de bioconversion	22
II.1.1.2. Généralités sur la fermentation	22
II.1.1.2.1 Fermentation sur milieu solide (SSF)	22
II.1.1.2.2. Fermentation sur milieu liquide (SmF)	22
II.1.1.3. Quelques souches d'intérêt biotechnologique	24
II.1.1.4. Bioconversion des acides gras volatiles pour la production du biodiesel	25
II.1.2. Par biodégradation des résidus organiques toxiques	26
II.1.2.1. la biodégradation du phénol	26
II.2. Valorisation énergétique	26

Partie expérimentale	
Matériel et méthodes	28
I. Objectif du travail	28
II. Matériel	28
II.1. Echantillonnages	28
II.2. Souches fongiques utilisées	29
II.3. Appareillage	30
III. Méthodes de travail	31
III.1. Biodégradation des eaux polluées par le phénol	32
III.1.1. Mode opératoire	32
III.1.2. Dosage colorimétrique du phénol	34
III.2. Bioconversion du lactosérum dé-protéiné par les levures	37
III.2.1. Mode opératoire	37
III.3. Bioconversion du grignon d'olives	39
III.3.1. Mode opératoire	40
III.3.2. Cultures témoins sur les dérivés de celluloses	41
III.3.3 Grignon d'olive hydrolysé à l'acide sulfurique	41
IV. Dosage colorimétrique des glucides	44
IV.1. Principe de la méthode	44
IV.2. Protocole expérimental	44
IV.3. Courbe d'étalonnage	45
V. Dosage colorimétrique de la BSA	46
V.1. Principe	46
V.2. Protocole	46
IV.3. Courbes d'étalonnage	46

Résultats et discussions	
I. Biodégradation du phénol par les levures <i>C.curvatus</i> et <i>Y.lipolytica</i>	49
I.1. L’aptitude des deux souches à biodégrader le phénol	49
I.2. Effet de l’adaptation des cellules au phénol sur la biodégradation	50
I.2.1. Cinétique de biodégradation du phénol par les souches adaptées	52
I.3. Effet de la concentration du substrat phénolique sur la croissance de la biomasse	54
II. Bioconversion du lactosérum dé-protéiné par des levures oléagineuses	56
III. Bioconversion de la cellulose du grignon d’olives par trois souches fongiques	59
III.1. Fermentation sur milieu liquide (dérivés de cellulose) et sur milieu solide (grignon d’olives)	59
III.1.1. Evaluation de la biomasse mycélienne	59
III.1.2. Fermentation sur milieu liquide des dérivés de cellulose	60
III.1.3. Fermentation sur milieu solide (sur le grignon d’olives)	62
III.2. Fermentation de l’hydrolysate du grignon d’olives par les levures (<i>C.curvatus</i> et <i>Y.lipolytica</i>)	63
Conclusion	64

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction générale

Le développement industriel et économique de ces dernières décennies a entraîné une forte production de déchets. En Algérie, elle a été estimée à environ 10.3 millions de tonnes par an, ce qui équivaut à 278 kg par Algérien, ils peuvent être classés en plusieurs catégories :

- Déchets municipaux et ménagers : ordures, boues, stations d'épurations.
- Déchets industriels : phénol, papier, carton, bois.
- Déchets de l'agriculture : grignon d'olive, les margines, lactosérum.
- Déchets médicaux et pharmaceutiques.

Mieux produire et moins polluer sont les défis auxquels sont confrontés les industriels de tous secteurs par les responsables politiques en charge de l'environnement et l'opinion publique, en effet l'industrie agroalimentaire constitue un réceptacle de 1^{er} choix pour les déchets qu'elle génère. Jadis, les processus de valorisation étaient abandonnés au profit des techniques d'éliminations simples et rapides : l'incinération et la mise en décharge. Mais désormais on parle beaucoup plus de bioconversion et de valorisation que d'incinération (ADEME, 2001).

La bioconversion ou la biodégradation des déchets, lorsqu'elle est possible est la conversion de la matière organique qu'elle soit toxique (phénol...) ou non (lactosérum, grignon d'olive...), en produits utilisables comme source d'énergie par des processus ou des agents biologiques, tels que certains champignons et levures (cryptococcus, yarrowia...) (TAIMA, 2001)

En effet, ces microorganismes ont des activités cellulosiques (pouvant dégrader la cellulose à partir d'un substrat riche en cellulose tel que le grignon d'olive), des activités lipolytiques (pouvant dégrader les lipides à partir d'un substrat riche en lipide comme le lactosérum) seront utilisés dans le but de produire d'autres produits ou de l'énergie. Elles ont aussi la capacité à dégrader un produit toxique qui est le phénol en un produit moins toxique bien sûr à des concentrations bien déterminées.

Notre recherche a pour objectif de rechercher de souches d'intérêt biotechnologiques et d'évaluer leurs pouvoir de dégradation et ou de biotransformation sur quelques sous-produits industriels (grignon d'olive, lactosérum, phénol).

Introduction générale

Parmi les critères ayant conduit au choix de ces substrats on cite leur abondance, leur faible coût et le fait qu'ils représentent une source organique naturelle disponible partout sur la planète. Cependant, aujourd'hui, l'industrie mondiale utilise moins de 10% de la biomasse végétale produite et des quantités énormes des résidus d'agriculture sont brûlés chaque année, ce qui cause un problème environnemental sérieux.

Notre manuscrit sera en trois parties, la première sera consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour de cinq petits chapitres, expliquant la notion de la valorisation des sous-produits agricoles et elle contiendra aussi des généralités sur les différents substrats utilisés.

La seconde partie du manuscrit présentera le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail, ou seront détaillés les procédés de fermentation, de dégradation, leurs méthodes de quantification et de dosage. Les résultats obtenus au cours de cette étude seront ensuite exposés dans la troisième partie et seront discutés.

En final, une conclusion générale permettra de récapituler les principaux résultats de ce travail.

Synthèse bibliographique

*Chapitre I : Les déchets
industriels.*

Chapitre I : Les déchets industriels

Depuis le début des années 1990, la protection de l'environnement est devenue une préoccupation collective. La question des déchets est quotidienne et touche chaque individu tant sur le plan professionnel que familial.

I. Définition des déchets

Selon l'article L 541-1-I du code de l'Environnement, est considéré comme déchet « tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matériau, produit ou plus généralement, tout bien meuble abandonné ou que son détenteur destine à l'abandon »

II. Les déchets industriels

Un déchet industriel est un type de déchet produit par l'activité d'industries ; et se divisent en trois catégories, en fonction de la dangerosité de ces derniers pour l'environnement ou l'être humain : [2]

II.1. Les déchets inertes (DI)

Déchets qui ne subissent aucune modification physique, chimique ou biologique importante. Ils ne sont pas biodégradables et ne détériorent pas d'autres matières avec lesquelles ils entrent en contact, d'une manière susceptible d'entraîner une pollution de l'environnement ou de nuire à la santé humaine. [1]

Ils sont utilisés en remblais ou alors stockés dans des centres spécialisés : les Centres Stockage des Déchets Ultimes (CSDU) de classe 3.

II.2. Les déchets industriels banals (DIB)

Ils ne contiennent pas de substances toxiques ou dangereuses. Ils sont assimilables à des ordures ménagères.

Les DIB sont triés et revalorisés (recyclage, compostage, incinération...) ou éventuellement stockés en Centres Stockage des Déchets Ultimes (CSDU) de classe 2. Ils sont traités de la même façon que les ordures ménagères. [1]

II.3. Les déchets dangereux

DTQD (Déchets Toxiques en Quantité Dispersée) lorsqu'ils sont produits en petites quantités,

DID (Déchets Industriels Dangereux) (anciennement Déchets Industriels Spéciaux, DIS) lorsqu'ils sont produits en plus grande quantité [1].

Les traitements : les déchets peuvent être soit valorisés (valorisation matière, valorisation énergétique) ou stockés.

III. les déchets organiques industriels

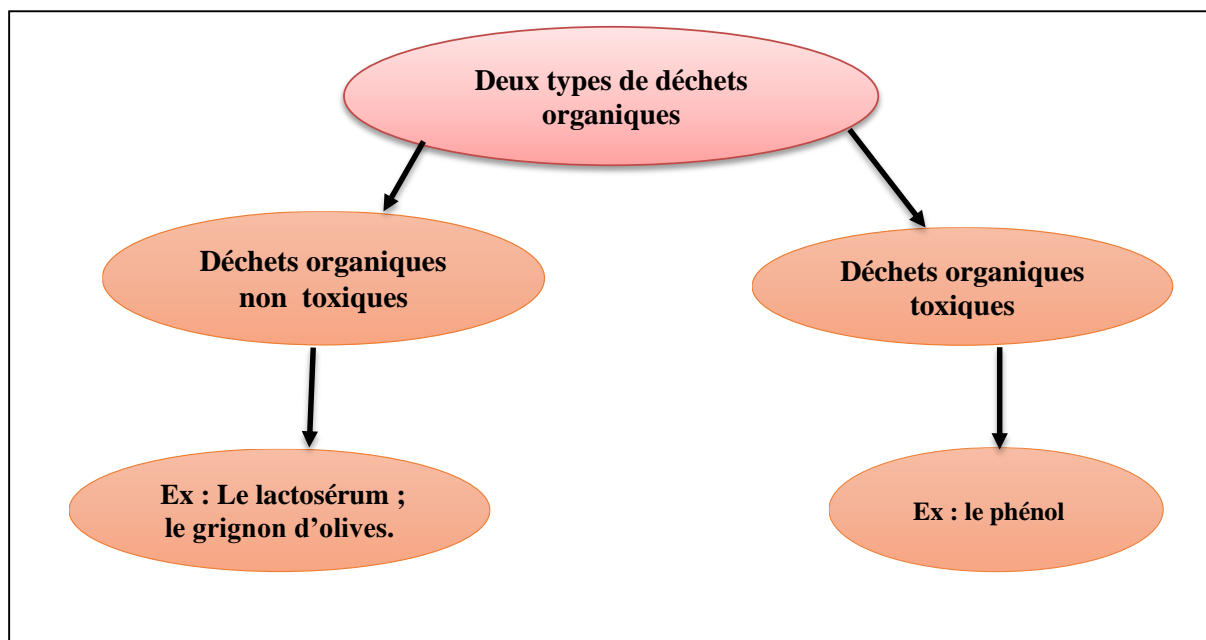


Figure 1 : Schéma représentatif des différents types de déchets organiques.

III.1. les déchets organiques non toxiques

Ces sous-produits organiques ne représentent pas un danger direct sur la santé humaine, mais à des fortes concentrations ils peuvent provoquer des déséquilibres environnementaux tels que l'eutrophisation et cela aura comme conséquence de supprimer quasiment la totalité de la microflore aquatique.

III.1.1. Le lactosérum

Le lactosérum est un sous-produit de la fromagerie et de la caséinerie, c'est un liquide surnageant jaune verdâtre, son pH compris entre 5 et 6,5. Il représente près de 90% du lait mis en œuvre (KOSIKOWSKI, 1979 ; MEREIO, 1980).

III.1.1.1. Différents types de lactosérum

Selon le type de fromage ou de caséine produit et donc la coagulation employée acide, présure ou mixte, on distingue deux types de lactosérum (BOUDIER et LUQUET, 1980):

- Le lactosérum obtenu par coagulation du lait par la présure, et provenant de la fabrication des fromages à pâtes molles et à pâtes pressées (l'acidité est inférieure à 18°D), est appelé lactosérum doux.
- Le lactosérum obtenu par coagulation lactique et provenant soit de la fabrication des fromages de type pâtes fraîches et pâtes molles ou de la fabrication de caséines lactiques et acides (l'acidité est supérieure à 18°D), est appelé lactosérum acide.

La coagulation est la première étape de transformation du lait en fromage. Elle se traduit par la formation du lactosérum et d'un gel appelé le caillé qui est la base de la fabrication du fromage.

Dans la majorité des fromageries, le caillage du lait se fait par la conjugaison des deux méthodes de coagulation avec, généralement, la prédominance de l'une ou de l'autre d'entre elles. On appelle cette méthode la coagulation mixte

III.1.1.2. Comparaison entre les différents types du lactosérum

Ce tableau représente les différents taux en différentes matières présentes essentiellement dans ce produit.

Tableau I: Comparaison de différents types de lactosérum (SOTTIEZ, 1990).

	Lactosérum doux	Lactosérum acide (%)
Matière sèche (%)	71	65.8
Matières grasses (%)	2.0	0.4
Lactose (%)	49	44
Azote non protéique (%)	0.5	0.2
Protéines (%)	8.0	7.0
Acide lactique (%)	2.0	5.0
Acide citrique (%)	1.3	0.3
Minéraux (%)	5.0	8.0
Dont : Phosphore	0.41	0.65
Calcium (%)	0.47	1.25
Potassium		
Sodium	1.45	1.48
Chlorures	0.52	0.53
	2.19	2.09

Chapitre I : Les déchets industriels

Tableau II : Teneur en vitamines dans le lactosérum (LINDEN et LORIENT, 1994)

Vitamines	Concentrations (mg/ml)
-Riboflavine	1.20
-Thiamine	0.38
-Acide nicotinique	0.85
-Acide pantothénique	3.4
-Pyrodoxine	0.42
-Cobalamine	0.03
-Acide ascorbique	2.2

III.1.1.3. Les différentes exploitations du lactosérum

Pendant de très nombreuses années, le lactosérum était considéré comme un déchet organique de l'industrie agroalimentaire. Il n'était pas bien exploité mais il était généralement épandu dans les champs ou déversé dans les rivières et les cours d'eau. Ainsi, il représentait un sérieux problème environnemental cause de sa grande teneur en matières organiques et à cause des volumes abondants générés (pour produire un kilogramme de fromage, on obtient environ 9 litres du lactosérum à partir de 10 litres de lait).

Jusqu'à la fin des années soixante, le lactosérum était généralement utilisé tel quel dans l'alimentation porcine, notamment dans des porcheries proches aux unités de production de fromages ou pour l'élaboration de certaines préparations laitières très anciennes et pauvres en matières grasses.

Quelques années plus tard, à cause des coûts élevés du rejet du lactosérum dans l'environnement et grâce à ses propriétés nutritionnelles et biologiques ainsi qu'à l'apparition de nouvelles technologies de séparation, ... plusieurs techniques de traitement de valorisation du lactosérum ont vu le jour. Ainsi, le lactosérum a d'abord servi à l'alimentation animale sous forme de poudre du lactosérum avant d'être introduit dans l'alimentation humaine et dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'additif alimentaire (émulsifiant, liant, ...).

III.1.1.4. Lactosérum substrat de fermentation

Le lactosérum pourrait être un substrat de fermentation pour de nombreuses espèces microbiennes. Selon BOTOFONJA (1994), la croissance de certaines souches telles que *Streptococcus*, *yarrowia* serait bonne sur lactosérum seul du fait de la richesse de celui-ci en lactose.

Le lactosérum est un bon milieu de culture permettant le développement des levures et moisissures qui utilisent le lactose comme source de carbone.

III.1.2. Le grignon d'olives

En Algérie, les grignons d'olive sont peu utilisés et abandonnés, générant, ainsi, de sérieux problèmes d'environnement. Grâce à leur aptitude à utiliser les aliments lignocellulosiques, les ruminants peuvent représenter une alternative intéressante pour la valorisation du grignon d'olive comme aliment de bétail. Cette dernière est, cependant, limitée à cause de leur faible valeur nutritive en raison de leur richesse en lignocellulose et leur pauvreté en azote. Les tissus contenus dans les grignons d'olive sont résistants à la dégradation microbienne, les traitements biologiques (par culture de champignons dotés de lignases) permettraient non seulement une amélioration de la dégradation des constituants pariétaux du grignon d'olive, mais, également, son enrichissement en protéines (THERIEZ et BOULE, 1970 ; THERIEZ *et al*, 2015)

III.1.2.1. Définition du grignon d'olives

Les grignons d'olives sont des résidus végétaux issus après extraction de l'huile d'olive. Il renferme une grande partie de la matière sèche de l'olive composée de peau, pulpe, petits morceaux de noyau et une certaine proportion d'eau de végétation qui contient à son tour les composants hydrosolubles de l'olive (ROUSSAS *et al*, 2006).

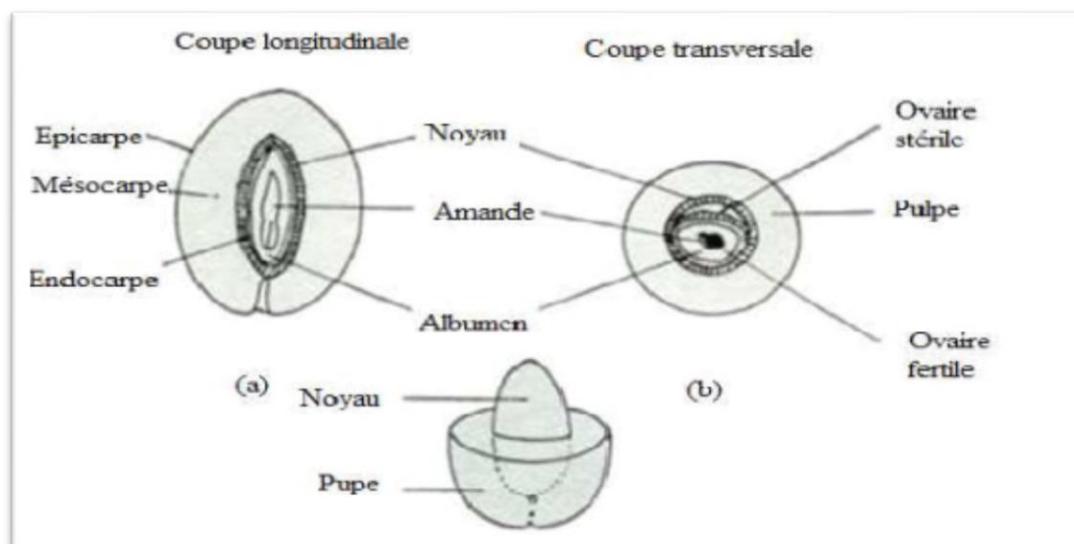


Figure 2 : Schéma de la composition physique de l'olive.

III.1.2.2. Types des grignons d'olives

- **Le grignon brut** (celui utilisé) : C'est le résidu de la première extraction de l'huile par pression de l'olive entière, ses teneurs relativement élevées en eau (24%) et en huile (9%) favorisent son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre.
- **Le grignon épuisé** : C'est le résidu obtenu après déshuilage du grignon brut par un solvant, généralement l'hexane.
- **Le grignon partiellement dénoyauté** : Résulte de la séparation partielle du noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation.
- Il est dit "gras" si son huile n'est pas extraite par solvant.
- Il est dit "dégraissé ou épuisé" si son huile est extraite par solvant.

III.1.2.3. Composition chimique des grignons

La composition chimique des grignons d'olive varie selon le stade de maturité des olives, le procédé d'extraction de l'huile et l'épuisement par les solvants.

Les grignons bruts sont pauvres en matières azotées et riches en cellulose brute. Ils restent relativement riches en matières grasses. L'épuisement par les solvants diminue la

Chapitre I : Les déchets industriels

teneur en matières grasses et augmente relativement les autres teneurs. Le dénoyautage partiel par tamisage ou ventilation réduit les teneurs en cellulose brute.

Tableau III : Composition chimique indicative des différents types de grignons (Plusieurs auteurs).

% de la Matière Sèche					
Type	Matière Sèche	Matières minérales	Mat. Azoté. Totales	Cellulose brute	Matières Grasses
Grignon brut	75–80	3–5	5–10	35–50	8–15
Grignon gras partiellement dénoyauté	80–95	6–7	9–12	20–30	15–30
Grignon épuisé	85–90	7–10	8–10	35–40	4–6

Remarque :

Les valeurs indiquées ci-dessus sont très variables principalement pour les grignons bruts et les grignons gras partiellement dénoyautés et ne peuvent être considérées que comme indicatives. Il est à noter que ces différents grignons proviennent d'olives d'origines variées et ont subi des traitements différents ce qui explique l'hétérogénéité de certains résultats (MAYMONE *et al*, 1961).

III.1.2.4. Pollution des grignons d'olives

La majorité des grignons rejetés dans la nature, se considère comme une source de pollution ; soit parce qu'ils sont contaminés par des champignons, soit parce qu'ils rejettent des substances toxiques dans l'environnement. Les toxines fongiques ou les composés polyphénoliques qui résistent à la dégradation bactérienne peuvent alors se lixivier, et polluer les sources d'eau à proximité ; menaçant ainsi la santé humaine et l'environnement. (BATAICHE, 2014).

III.1.2.5. Biodégradabilité du grignon d'olives/ hydrolyse et fermentation microbienne

Les grignons d'olives peuvent causer plusieurs problèmes dans l'environnement. Pour pallier à cette pollution, ils sont revalorisés en produits bénéfiques notamment dans les pays développés. La fermentation des grignons d'olives, par des champignons, en milieu solide produit une panoplie de composés d'arômes d'intérêt dans les domaines agroalimentaire, cosmétique et même pharmaceutique (KADEMI *et al*, 2003).

Le grignon d'olive est très hautement ligno-cellulosiques selon NEFZAOU (1983). La ligno-cellulose est une matière organique renouvelable pour la production de biocarburants durant la fermentation microbienne et est le composant structurel majeur de toutes les plantes. La ligno-cellulose se compose de trois éléments principaux: la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. En outre, de petites quantités d'autres matières telles que des protéines et des cendres, de la pectine peuvent être trouvés dans les résidus lignocellulosiques, à des degrés divers en fonction de la source (RAGAUSKAS *et al*, 2006 ; SANCHEZ, 2009).

La bioconversion de résidus ligno-cellulosiques est initiée principalement par des micro-organismes tels que des champignons et des bactéries qui sont capables de dégrader des matériaux ligno-cellulolytiques. Les champignons tels que *T.reesei* et *A.niger* produisent de grandes quantités d'enzymes cellulolytiques extracellulaires, lors de la fermentation en monoculture en batch, les cellulases produites ont un grand intérêt industriel et aussi les produits d'hydrolyse : hexoses monomères (glucose, mannose et galactose) et des pentoses (xylose et arabinose) sont fermentés en produits de valeur tels que l'éthanol (CHU BC et LEE, 2007).

III.1.3. La cellulose

La cellulose, qui est le principal constituant des végétaux et du bois, est une matière très utilisée dans l'industrie, sous forme de fibres brutes ou de dérivés divers. Cette matière première renouvelable intéresse notamment les chercheurs en tant que source de carburant, sous forme d'éthanol cellulosique VAUTHEROT (2007).

III.1.3.1. Définition de la cellulose

La cellulose est le polymère le plus abondant sur terre. Elle représente environ 50% de la biomasse et les végétaux en produisent 50 à 100 milliards de tonnes par an. Elle est le

Chapitre I : Les déchets industriels

principal constituant de la paroi cellulaire des plantes et du bois (jusqu'à 95% dans les fibres de coton et de 40 à 55% dans le bois) LOO (2012).

La macromolécule de cellulose est présente dans toutes les espèces végétales sous la forme de fibrilles avec des proportions très variables. Le bois (résineux ou feuillus) contient entre 40 et 50 % en masse sèche de cellulose alors que les fibres de coton entre 85 et 95 % FREDON (2001).

Tableau IV : Teneur en cellulose de différentes espèces végétales SHIRAISHI (2000)

Espèces végétales	Teneur en cellulose (%)
Cotton	95-99
Bois	40-50
Son de maïs	17-20
Paille	50-60

III.1.3.2. Structure de la cellulose

La cellulose (Figure 3) est un polysaccharide de la série des β -D-glucanes. Son motif répétitif est la cellobiose. Ce dernier est constitué de deux β -D-glucopyranoses (AGU : Unité d'anhydroglucose) dans leur conformation chaise 4C_1 et liés par une liaison glycosidique β (1-4) ce qui lui confère une structure linéaire contrairement à celle de l'amidon (les monomères glucoses de l'amidon sont liés par des liaisons α (1-4)) et α (1-4)) SEVERIAN (2005)

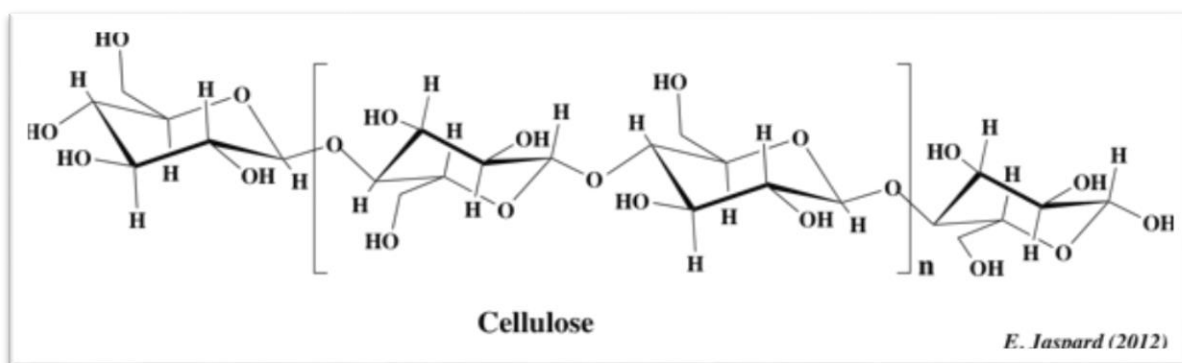


Figure 3: Représentation de la molécule de cellulose JASPARD (2012).

III.1.3.3. Les dérivés de cellulose

Les dérivés de cellulose sont classés en fonction du type de traitement chimique en acétate de cellulose, éthers de cellulose et esters de cellulose, on peut citer :

III.1.3.3.1. La Carboxy-Méthyl-Cellulose (CMC)

La CMC de forme moléculaire $C_6H_7O_2(OH)_2CH_2COONa$ est un gel d'origine synthétique. C'est un dérivé de cellulose très hygroscopique. Elle est souvent utilisée sous la forme de son sel de sodium, la Carboxy-Méthyl-Cellulose de sodium



Figure 4 : La CMC sous forme de poudre

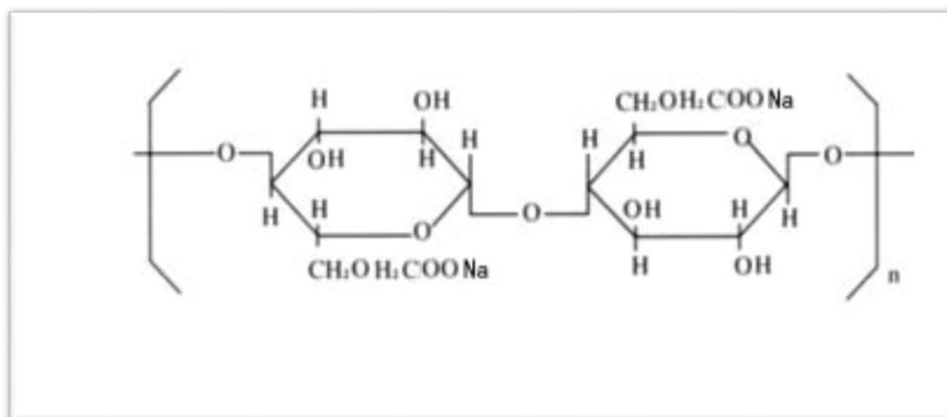


Figure 5 : Représentation d'une molécule de CMC

III.1.3.3.2. Le xylane

Le xylane est un composant principal des hémicelluloses, et le deuxième polysaccharide naturel le plus abondant après le xyloglucane. Les xylanes sont des polymères de xyloses. Plusieurs enzymes sont nécessaires pour la dégradation de xylane, mais la principale enzyme impliquée est la xylanase. Les xylanases sont des enzymes glycosyles hydrolases qui catalysent l'hydrolyse de β -1,4-glycosidiques en xylane via un double mécanisme de déplacement Dahamna (2011).

Ces dernières années, les applications de la biotechnologie des xylanases/xylane se sont élargies sensiblement : ces composants sont aujourd'hui employés comme suppléments dans la fabrication du papier, l'alimentation animale, le biobleaching des pâtes et papiers et dans la production de bioéthanol GROSJEAN (2011).

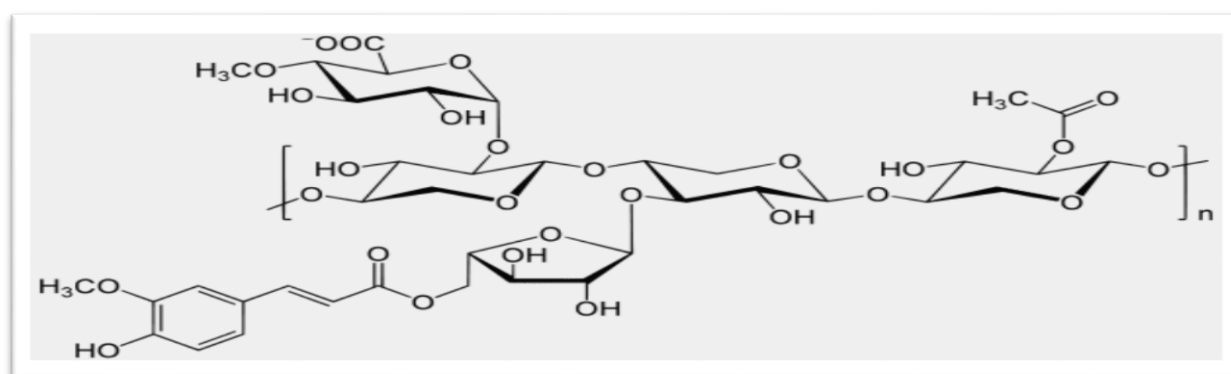


Figure 6 : représentation chimique du xylane

II.1.3.3.3. L'avicel

C'est la de la cellulose microcristalline ; elle est isolée à partir des fibres végétales, la cellulose y est présente comme composante de la paroi cellulaire, sous forme de faisceaux de micro-fibrilles. Une partie de ces micro-fibrilles est composée de cellulose amorphe, alors qu'une seconde partie est constituée de cellulose cristalline (on dit d'un polymère qu'il est amorphe lorsque ses chaînes sont emmêlées n'importe comment, alors qu'un polymère dont les chaînes sont alignées en cristaux ordonnés est dit cristallin) Les autres composants principaux de la paroi cellulaire sont l'hémicellulose et la lignine. La cellulose microcristalline est donc isolée à partir des fibres végétales, d'abord en la séparant de la lignine et de l'hémicellulose, puis en la purifiant par hydrolyse acide de manière à éliminer la partie de cellulose amorphe.

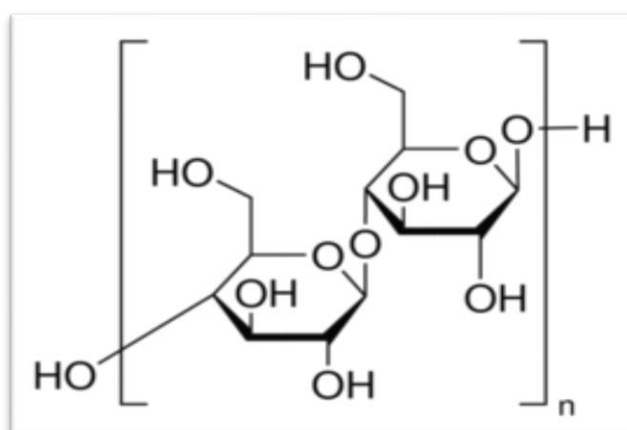


Figure 7 : Représentation d'une molécule d'Avicel

III.1.3.3.4. Acétate de cellulose (C100)

Les acétates de cellulose sont des esters organiques de cellulose (Figure 7). Leur structure chimique dérive de celle de la cellulose, les groupements hydroxyles ayant été substitués (en totalité ou en partie) par des groupements acétates. Dans le procédé d'estérification de la cellulose LAPOINTE (2000).

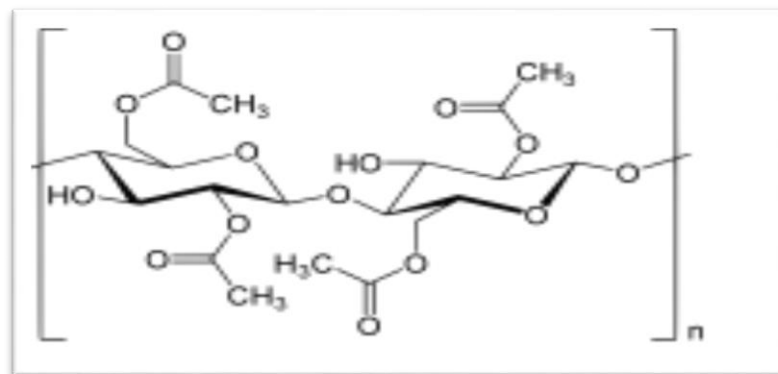


Figure 8 : Représentation moléculaire de C100 LAPOINTE (2000).

III.1.3.4. Généralités sur les cellulases

Les cellulases sont des enzymes capables de dégrader la cellulose qui est un des principaux constituants des parois des cellules, elles sont généralement produites par des levures ou des bactéries présentes dans l'intestin BAYER (1998).

Elles font partie de la 3^{ème} classe d'enzymes, les hydrolases EC 3.2.1.4. Il y a plusieurs types de cellulases :

- Bêta-glucosidases (Cellobiase): elles réalisent l'hydrolyse des chaînes polysaccharidiques en les rendant monosaccharides.
- Exo-cellulases (cellobiohydrolases, CBH'): elles coupent les chaînes polysaccharides aux extrémités.
- Cellulases oxydative: elles effectuent la dépolymérisation de la cellulose.
- Cellulose phosphorylases: en utilisant des phosphates elles dépolymérisent la cellulose.
- Endo-cellulases: elles génèrent des chaînes polysaccharidiques en cassant la structure cristalline de la cellulose.

L'Homme ne peut pas synthétiser de cellulase, donc il est incapable de digérer la cellulose des parois des cellules végétales, par conséquent sa flore intestinale est constituée de microorganismes qui peuvent en synthétiser MAZEAU (2005).

Elles ont des applications en industrie, notamment pour la fabrication de diverses substances et matériaux à partir de matières végétales. Elles sont utilisées pour la fabrication de divers produits à partir de matières végétales, En agroalimentaire, pour modifier la texture

Chapitre I : Les déchets industriels

en dégradant les parois végétales ou pour perméabiliser les parois végétales afin de libérer des substances. Elles servent aussi d'additif dans certaines lessives ou détergents. En industrie papetière, on peut modifier la qualité du papier par la modification des fibres cellulosiques MAZEAU (2005).

Certains micro-organismes produisent des quantités importantes d'enzymes (les cellulases) qui sont capables de l'hydrolyse de la cellulose in vitro. Les champignons sont les principaux micro-organismes producteurs de cellulase BAYER (1998).

III.2. Les sous-produits industriels toxiques

III.2.1. Le phénol

Les composés aromatiques, y compris le phénol, sont parmi les polluants organiques les plus communs dans les effluents provenant des industries du papier, du plastique, du pétrole, des teintures, de résine et du bois (SHAO, 2007).

Le phénol est considéré comme un composé toxique, ce qui nécessite le développement d'une technologie efficace pour l'éliminer à partir des eaux usées. Pour cela, diverses méthodes ont été élaborées telles que l'extraction par solvant, la dégradation microbienne, l'adsorption sur charbon actif et l'oxydation chimique (LEBOUKH, 2011).

Les méthodes d'extraction sont incomplètes et onéreuses, alors que les traitements par adsorption et d'oxydation sont extrêmement coûteuses pour de faibles concentrations de l'effluent. Les traitements microbiologiques sont alternatifs à ces procédés de traitement mais qui ont aussi leurs limites (instabilité, inhibition...) (SHAO; LING-LING; YU-MIN, 2008).

III.2.1.1. Identité et propriétés physiques et chimiques

Le phénol est un composé aromatique polluant modèle (figure 1). Il a été découvert par RUNGE en 1834 dans le goudron provenant de la houille (BASHA *et al*, 2010). Mais c'est qu'en 1842 que la vraie composition chimique et son poids moléculaire de 94,11g/mol ont été donnés par le chimiste français AUGUSTE LAURENT (KARRER, 1947 ; MONTIZAN, 1994 ; EPA, 1998).

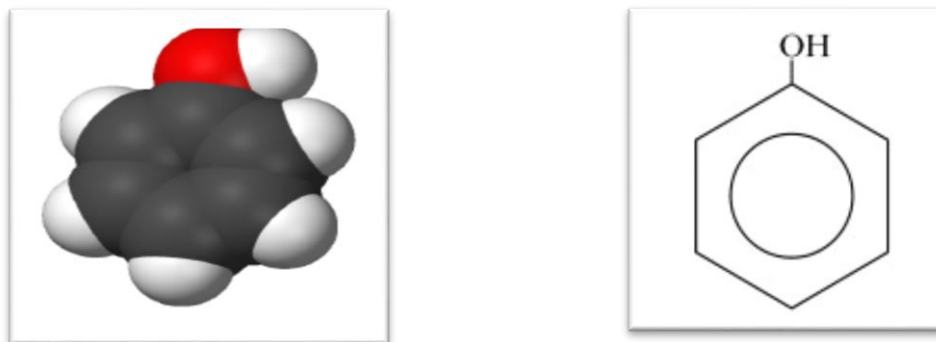


Figure 9 : Structure chimique de la molécule de phénol

Il représente une unité structurale de base pour une large variété de composés naturels et synthétiques (ANNADURAI *et al*, 2000 ; AGARRY et DUROJAIYE, 2008 ; BASHA *et al*, 2010). A une température inférieure à 43°C, il apparaît sous la forme cristalline et est relativement soluble dans l'eau. Le phénol est un acide faible et sa forme ionisée est très sensible aux réactions d'oxydation et de substitutions électrophiles (AGARRY et DUROJAIYE, 2008). Il a une odeur très forte (odeur âcre) avec un seuil olfactif de 0,04 ppm (AMOORE et HAUTALA, 1983).

Tableau V : Propriétés physico-chimiques du phénol

Propriété	Grandeur
Point de fusion (°C)	41
Point d'ébullition (°C)	182
Tension de vapeur (Pa)	47
Constante de la loi d'Henry (Pa·m ³ /mol)	0.059
PKa	9.99
Solubilité dans l'eau (mg/L)	88360

Industriellement, le phénol est un composé important. Il est utilisé dans la fabrication des antioxydants, des herbicides, des développeurs de photos, des adhésifs, des résines synthétiques pour les matériaux de construction et des peintures. Les eaux usées provenant de ces industries contiennent habituellement des concentrations élevées en phénol, de l'ordre de 10 à 10000 mg/l. Des utilisations en médecine et dans la production pharmaceutique ont été aussi rapportées. Au départ, il a été largement utilisé comme antiseptique et désinfectant. Pour son effet anesthésiant, il a été souvent utilisé pour calmer les blessures. Il trouve alors ses applications dans les préparations médicinales telles que les lotions antiseptiques, les

collutoires et les pastilles pour le traitement des maux de gorge et des gouttes nasales (DARISIMALL, 2006).

III.2.1.2. Comportement du phénol dans l'environnement

Le phénol est un polluant ubiquitaire, donc il peut être détecté dans tout l'environnement à différentes concentrations:

- **Atmosphère** : Dans l'air, les vapeurs de phénol sont plus lourdes que l'air et forment des mélanges explosifs sous l'effet de la chaleur. Le phénol s'oxyde à l'air, et ce processus d'oxydation est accéléré par la lumière ou par des impuretés à effet catalytique. Une partie est lessivée par la pluie (EISENREICH *et al*, 1981)
- **Sols** : Le phénol est une substance naturellement abondante, qui tend à se biodégrader rapidement dans l'environnement (BAKER, 1980 ; DOBBIN *et al*, 1987 ; HOWARD, 1989). Les micro-organismes du sol, aérobies comme anaérobies, sont capables de l'utiliser comme substrat de croissance, bien que sa décomposition soit plus rapide en aérobiose qu'en anaérobiose (SCOTT *et al*, 1982; HOWARD, 1989).
- **Eaux** : Le phénol a été détecté dans les eaux de surfaces, eaux souterraines, eaux de pluie, eaux potables, les effluents industriels et les eaux de ruissellements urbaines. Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer et se dissout lentement et même dilué continue de former des solutions toxiques (GIANFREDA *et al*, 2003).

III.2.1.3. Toxicité

La basse volatilité du phénol et son affinité pour l'eau font de la consommation orale de l'eau potable qu'il souille le plus grand danger pour l'homme (PRPICH et DAUGULIS, 2005).

Même à de basses concentrations (HILL et ROBINSON, 1975 ; LI et HUMPHREY, 1989), les composés phénoliques sont très toxiques aussi bien pour les organismes unicellulaire que les organismes les plus évolués. Heureusement, quelques micro-organismes peuvent les utiliser comme source de carbone et d'énergie.

Des concentrations en phénol aussi faibles que 0,25 mM ont été rapportées comme étant inhibitrices de croissance des microorganismes mésophiles (GURUJEYALAKSHMI et ORIEL, 1989).

Chapitre I : Les déchets industriels

Sur le plan médical, le phénol est un produit caustique dangereux. Chez l'homme, le phénol peut être absorbé à travers la peau par les voies respiratoires ou par ingestion. Selon la concentration et le mode d'exposition au phénol, les effets observés peuvent aller de la simple irritation de la peau, aux vertiges, aux complications neurotoxiques, aux dommages du foie et des reins, aux brûlures et aux nécroses, au choc cardio-vasculaire, au coma, à l'anorexie, aux problèmes respiratoires et même à la mort. Les doses létales (DL50) par voie orale chez le rat sont de l'ordre de 414 mg/ kg (JUANG et TSAI, 2006 ; YAN *et al.*, 2006 ; BAI *et al.*, 2007).

III.2.1.4. Biodégradation (minéralisation) du phénol

Un grand nombre de micro-organismes y compris les bactéries, les champignons, les levures et les algues sont capables de dégrader le phénol (LIKA et PAPADAKIS, 2009).

Les champignons ont un rôle important dans le recyclage des composés aromatiques dans la biosphère et plusieurs études ont montrées que divers champignons sont capables de minéralisation des phénols. Ils sont capables de consommer une grande variété de sources de carbone par des mécanismes enzymatiques, produisant ainsi des métabolites dérivés du phénol. (STOILOVA *et al.*, 2007).

Les champignons les plus abondants dans les environnements pollués sont des levures. Certaines levures telles que *Candida tropicalis*, *Fusarium flocciferium*, *Trichosporon cutaneum* sont capables d'utiliser le phénol comme principale source de carbone et d'énergie, il y'a aussi des études qui attestent la capacité des souches de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Graphium* et genres *Phanerochaete* à dégrader des composés aromatiques (GERRARD *et al.* 2006 ; AGARRY *et al.* 2008).

*Chapitre II : Valorisation
des déchets organiques*

Chapitre II : Valorisation des déchets organiques

I. Valorisation des déchets

Par valorisation, on entend toute transformation de résidus ou de sous-produits industriels alimentaires en vue de les réintroduire sur le marché à titre de nouveaux ingrédients ou comme nouveaux produits (BOUCHERBA, 2014).

L'agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) définit la valorisation comme "le réemploi, le recyclage ou toute autre action visant à obtenir, à partir de déchets, des matériaux réutilisables ou de l'énergie".

Avant de valoriser un déchet, il faut connaître son origine, l'analyser, caractériser son état actuel et son comportement dans le temps et évaluer sa traçabilité. Il s'agit donc de « mesurer pour connaître et connaître pour agir » [3].

II. Types de valorisations

Il existe plusieurs types de valorisation des déchets :

II.1. Valorisation biologique (Valorisation organique)

C'est le mode de traitement des déchets organiques ou fermentescibles par bioconversion ou biodégradation qui sont des procédés du domaine de la biotechnologie. Il existe deux principaux modes de dégradation naturelle de la matière organique par des micro-organismes:

II.1.1. Par bioconversion

La bioconversion est la transformation de la matière organique résultant de la croissance de micro-organismes, et consiste donc en la modification d'une substance organique en une ou plusieurs autres grâce à l'action d'organismes vivants, ou d'un système enzymatique (cellulases, xylases et lipases).

Les bioconversions sont réalisées soit au moyen d'enzymes libres ou fixées, soit au moyen de cellules entières libres ou fixées. L'immobilisation des cellules ou des enzymes permet leur réutilisation, le microorganisme joue le rôle d'un complexe enzymatique. L'intérêt des bioconversions réside dans le fait que les transformations catalysées s'effectuent dans des conditions expérimentales (pH et température) douces et que les molécules sont modifiées de façon spécifique et le plus souvent sans réactions secondaires (HAICHOURNORA, 2014).

Chapitre II : Valorisation des déchets organiques

II.1.1.1. Méthode de bioconversion

Elle se fait par fermentation soit sur milieu liquide ou sur milieu solide :

II.1.1.2. Généralités sur la fermentation

La fermentation est un procédé utilisé pour produire des biomolécules comme les enzymes, les acides organiques, les métabolites secondaires et la biomasse. Généralement, la production des enzymes (telles que les lipases) est effectuée, en utilisant, deux types de fermentations ; une solide SSF (pour *Solid State Fermentation*) et l'autre liquide ou submergé SmF (pour *Submerged Fermentation*). Ces deux techniques sont des approches communes et conventionnelles, et chaque technique possède quelques avantages par rapport à l'autre (UL-HAQ *et al*, 2002 ; RIGO *et al*, 2009).

Il existe deux types de fermentations qui nous aboutissent à réaliser une bioconversion, l'une est réalisée sur un milieu liquide (phénol, lactosérum et l'hydrolysa du grignon d'olives) et l'autre sur un milieu solide (grignon brut ; broyé) :

II.1.1.2.1 Fermentation sur milieu solide (SSF)

Les microorganismes cultivés en milieu solide sont dans la plupart des cas des champignons filamenteux. En effet ces milieux sont semblables à leurs milieux naturels (sols) et leur forme de développement végétatif constituée par des hyphes aériens ramifiés est propice à la colonisation de matrices solides poreuses et humides qui jouent un rôle de support et de source de nutriments. De plus les champignons filamenteux peuvent se développer avec des humidités aussi basses que 12% et supportent des pressions osmotiques élevées caractéristiques que ne présentent pas en général les levures et les bactéries (BEUCHAT, 1983).

II. 1.1.2.2. Fermentation sur milieu liquide (SmF)

La fermentation submergée comprend une large variété de processus microbiens agités et non agités, où la biomasse est complètement encerclée dans le milieu de culture liquide. Les protéases de *Mucor miehei*, *Endothia parasitica*, *yarrowia*, *cryptococcus* et la majorité des espèces de *Bacillus* sont produites par les fermentations liquides (SANDHYA *et al*, 2005). Celles-ci sont réalisées avec différents substrats, habituellement dissout ou en suspension dans un milieu aqueux.

Chapitre II : Valorisation des déchets organiques

Tableau VI : Comparaison entre SSF et SmF (RAIMBAULT, 1998; ASSAMOI *et al*, 2009).

Facteur	Fermentation sur milieu solide (SSF)	Fermentation liquide (SmF)
Substrat	Polymères insolubles (amidon, pectine, cellulose, lignine)	Substrats solubles (sucres)
Eau	Consommation limitée de l'eau; aw faible	Des grands volumes d'eau sont consommés
pH et Température	Contrôle aléatoire et transfert difficile de la chaleur	Contrôle facile
Aération (O₂)	Aération facile et diffusion rapide de l'oxygène	Faible solubilité de l'(O ₂) dans l'eau
Fermentation	Fermentation en batch	Fermentation continue
Contamination	Risque de contamination fongique	Risque de contamination bactérienne
Demande énergétique	Besoin énergétique faible	Consommation élevée
Biomasse	Inséparable du substrat	Facilement séparable
Produit	Concentré	Très dilué

Les fermentations continues donnent de meilleurs rendements que celles des cultures en batch. (SUMANTHA *et al*, 2006).

Chapitre II : Valorisation des déchets organiques

II.1.1.3. Quelques souches d'intérêt biotechnologique

Ces souches ont un intérêt dans le domaine de la biotechnologie de par leur capacité à produire des enzymes aptes à bioconvertir et produire des produits d'intérêt énergétique (biogaz) et aussi à biodégrader ou éliminer des substances toxiques polluantes.

Les différentes caractéristiques de ces souches sont résumées dans ce tableau :

Tableau VII : les différentes souches d'intérêt biotechnologiques. (wikipédia)

L'espèce	Généralités
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<ul style="list-style-type: none">- Champignon ascomycète dimorphique- Une levure oléagineuse- Capable de croître sur des composés hydrocarbonés- Capacité de modifier et d'accumuler des lipides- Un modèle intéressant pour les applications biotechnologiques dans des procédés de biodégradation de composés polluants (phénol...).
<i>Cryptococcus curvatus</i>	<ul style="list-style-type: none">- Un champignon extremophile- Il est oléagineux- Utilise les sucres de cellulose pour la croissance-Capable de produire des triglycérides de stockage.
<i>Trichoderma reesei</i>	<ul style="list-style-type: none">-Champignon filamenteux, mésophile- Capable de dégrader les toiles de coton- Capacité de sécréter une grande quantité d'enzymes cellulosiques (Cellulase).- considéré comme un modèle de référence

Chapitre II : Valorisation des déchets organiques

	<p>pour la transformation de la cellulose végétale en sucres simples.</p> <p>- Ces sucres peuvent ensuite être facilement transformés, par fermentation, en biocarburant de type éthanol.</p> <p>-Productrice de cellulase.</p>
<i>Aspergillus niger</i>	<p>- Un champignon filamenteux ascomycète</p> <p>- Aucune forme sexuée (téléomorphe) n'est connue</p> <p>-Une espèce importante sur le plan économique car elle est utilisée en fermentation industrielle pour produire de l'acide citrique et gluconique ou des enzymes (cellulase, xylanase....etc).</p> <p>-Productrice de cellulase.</p>
<i>Penicillium</i>	<p>- sont des champignons filamenteux, de type moisissure</p> <p>- Responsables de nombreuses dégradations</p> <p>- Ils ont pour habitat le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les graines, les céréales.</p>

II.1.1.4. Bioconversion des acides gras volatiles pour la production du biodiesel

Les levures oléagineuses ont la capacité d'accumuler dans des conditions de limitations nutritionnelles (azote, phosphore, fer..) une quantité importante de triacylglycérols (TAG) pouvant dépasser plus de 20% de leur masse totale. La composition en acides gras de ces lipides microbiens est comparable à celle des lipides végétaux, ce qui les rend utilisables pour la production de biodiesel. Ces levures sont donc de bons candidats pour la recherche de voies alternatives de productions d'énergie ne consommant pas d'espace agricole cultivable (FONTAILLE *et al*, 2005).

Chapitre II : Valorisation des déchets organiques

II.1.2. Par biodégradation des résidus organiques toxiques

La biodégradation ou bio remédiation est l'utilisation d'organismes vivants, et plus particulièrement de micro-organismes (champignons, bactéries), pour éliminer les polluants toxiques des différents milieux naturels. Le métabolisme microbien étant souvent limité par des facteurs environnementaux, l'objectif de la biodépollution est d'optimiser ces facteurs afin d'augmenter la densité et l'activité des populations microbiennes pour accélérer la décontamination des sites pollués (CHAILLOU, 2015).

L'action des micro-organismes dans la défense de l'environnement relève d'une constatation ancienne, mais l'importance de ce rôle n'est réellement apparue qu'au début du XX^e siècle. En effet, les micro-organismes sont capables de transformer la plupart des polluants inorganiques et organiques (phénol). Pour ces derniers, la biodépollution consiste en une élimination complète d'un composé (biodégradation) avec comme seul rejet des produits simples tels que l'eau, le dioxyde de carbone, le méthane, l'hydrogène, etc. On parle de minéralisation si le produit ultime de la biotransformation du substrat est le dioxyde de carbone. Cette notion implique que le polluant est utilisé comme source de carbone (PELMONT, 1993).

II.1.2.1. la biodégradation du phénol

En règle générale, la dégradation biologique du phénol entraîne d'abord la formation de pyrocatechine, de o-quinone et d'acide dicarboxylique, puis d'acide acétique et de CO₂. Dans l'organisme humain, le phénol est éliminé par voie urinaire après oxydation ou liaison conjuguée avec l'acide sulfurique ou l'acide gluconique. Les métabolites des phénols peuvent également être très toxiques: la combustion incomplète de 2,4,5-trichlorophénol peut donner naissance à la dioxine TCDD (ANONYME,2006).

II.2. Valorisation énergétique

La valorisation énergétique consiste à utiliser le pouvoir calorifique du déchet en le brûlant et en récupérant cette énergie sous forme de chaleur ou d'électricité et à l'utiliser dans d'autres applications. Donc, c'est l'utilisation de la chaleur dégagée par la combustion des déchets (incinération) ou des biogaz produits par ces déchets pour alimenter des réseaux de chaleur (chauffage, eau chaude sanitaire, serres agricoles...) ou pour la production d'électricité. Cette valorisation des déchets produit des fumées et des cendres souvent toxiques qui doivent être

Chapitre II : Valorisation des déchets organiques

traitées et stockées en Centre de Stockage des Déchets Ultimes (CSDU) (BOUANANE-DARENFED, 2014).

En pratique, la valorisation énergétique est essentiellement appliquée aux déchets susceptibles de produire de l'énergie thermique par incinération. Cela concerne essentiellement les déchets contenant des molécules à base de carbone, de chlore, et d'hydrogène, c'est-à-dire les matières plastiques, les résidus de solvants et les matières organiques sèches (cellulose) comme le papier, le carton, le bois, les tissus et aussi la matière organique lipidique pour sa dégradation par des micro-organismes oléagineux tels que les levures oléagineuses (*Yarrowiya lipolytica* et *Cryptococcus curvatus*) qui sont productrices de bioéthanol (GAGAOUA, 2014).

Partie Expérimentale

Matériel et méthodes

I. Objectif du travail

Notre travail, a pour objectif la sélection de souches fongiques, d'intérêt biotechnologiques, douées d'activité de bioconversion des déchets d'industrie agroalimentaire tels que : le lactosérum dé-protéiné et le grignon d'olives ; et ainsi que leur activité de biodégradation produit aromatique toxique tel que le phénol, polluant les eaux.

Ce travail a été effectué au niveau du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB) de l'université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

II. Matériel

II.1. Echantillonnages



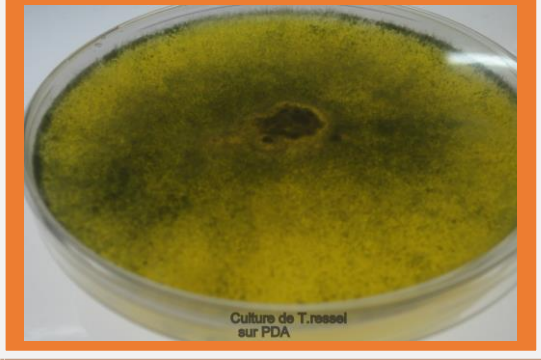
Dans notre expérimentation, le choix des substrats s'est porté sur leur abondance de et leurs effets néfastes et tout ce qu'ils engendrent comme problèmes de par leur richesse en matières organiques et toxicité, les substrats sélectionnés sont les suivants :

- le grignon d'olive récolté au niveau de la région de Béni Douala, Tizi-Ouzou (mars à avril 2015) ; séché à température ambiante pendant 30 jours puis conservé dans un endroit sec.
- le lactosérum acide dé-protéiné provenant de l'ORLAC de Draa Ben Khedda ; collecté dans des petites bouteilles (0,5 l) ; conservé dans un congélateur (-18°C);
- le phénol sous forme de cristaux, utilisé en solution stock de 5% à partir de laquelle des solutions polluées à tester sont préparées.


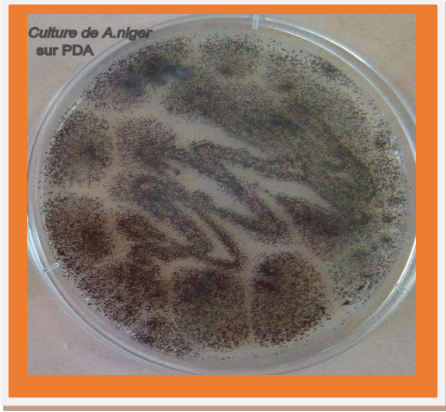
II.2. Souches fongiques utilisées

Les souches fongiques utilisées dans cette étude, sont des souches de collection du LABAB, UMMTO.

Tableau VIII : Aspect des pré-cultures des souches étudiées sur milieu PDA et leurs caractéristiques (wikipédia)

Souches fongiques de collection du laboratoire (LABAB)	Images des souches sur leur milieu de culture
<p><i>Cryptococcuscurvatus</i></p> <p>Levure oléagineuse ; produit des triglycérides de stockage.</p> <p>incubation durant 48h à 30°C.</p>	
<p><i>Yarrowialipolytica</i></p> <p>Levure oléagineuse ; a la capacité de modifier et d'accumuler des lipides.</p> <p>Incubation pendant 48h à 30°C.</p>	
<p><i>Trichoderma reesei</i></p> <p>Forte production de cellulases.</p> <p>Incubation à 28°C pendant une semaine.</p>	

Matériel et méthodes

<p><i>Penicillium sp</i></p> <p>champignons filamenteux, de type moisissure ; responsables de nombreuses dégradations.</p> <p>Incubation à 28°C durant une semaine.</p>	 <p>Culture de P.sp sur PDA</p>
<p><i>Aspergillus niger</i></p> <p>-espèce importante sur le plan économique car elle est utilisée en fermentation industrielle pour produire de l'acide citrique et gluconique ou des enzymes telles que les cellulases.</p> <p>Incubation à 28°C pendant une semaine.</p>	 <p>Culture de A.niger sur PDA</p>

II.3. Appareillage

- Autoclave (PBINTERNATIONAL);
- Bain Marie (MEMMERT);
- Balance de précision à 0,01mg (SARTORIUS) et balances analytiques à affichage digital(0,01g) (DENVER INSTRUMENT);
- Centrifugeuse réfrigérée, (SIGMA 3-18K, SIGMA 4-16K) ;
- Centrifugeuse des petits volumes (2ml), (SIGMA 1-14) ;
- Etuve (MEMMERT);
- Four pasteur (BINDER);
- pH mètre (HANNA instrument);
- Spectrophotomètre visible (SCHIMADZU);
- Agitateurs variés (à barreau magnétiques chauffant et non chauffant, vortex) ;
- Etuve (28-30°C) (BINDER).

III. Méthodes de travail

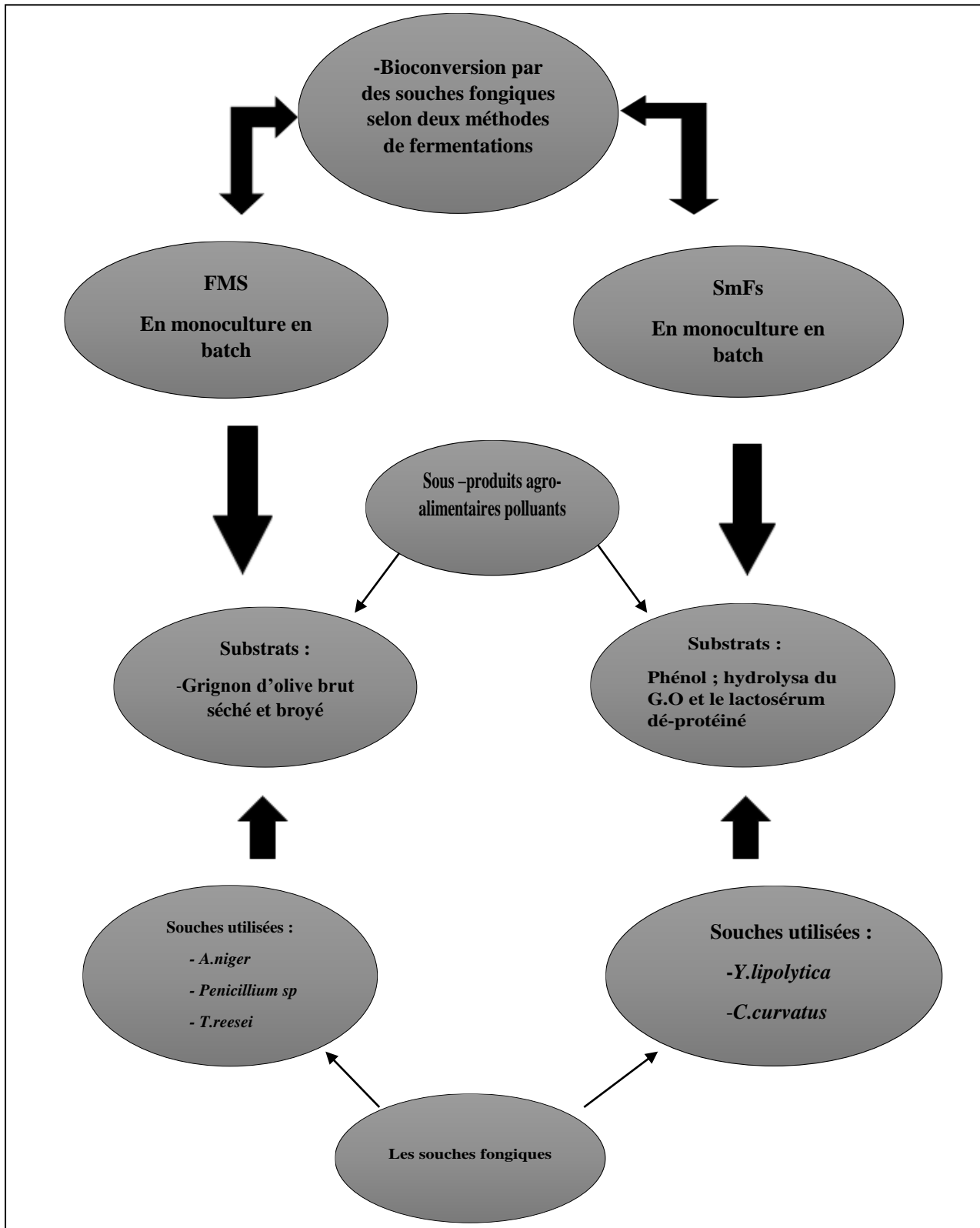


Figure 10 : Diagramme récapitulatif du matériel et méthodes de travail.

III.1. Biodégradation des eaux polluées par le phénol

III.1.1. Mode opératoire

➤ Pré cultures et inoculation

La pré-culture des levures a été faite sur PDA dans des boîtes de Pétri après 48h d'incubation à 30°C.

On récupère toutes les colonies à l'aide d'une anse et les transfère dans des tubes contenant 10ml d'eau physiologique stérile. Ces tubes représenteront notre suspension de levures à partir de laquelle on prendra 2ml à inoculer dans le milieu (Milieu minéral (MM) + Phénol). Tous les prélèvements ont été effectués dans une zone stérile entre deux becs bunsen.

La culture se fait dans des erlenmeyers stérile contenant 50ml du milieu de culture minéral liquide (MM) et stérile dont la composition est la suivante (g /l) : 1,5 g KH_2PO_4 ; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g NaCl ; 0,5 g MgSO_4 ; 3 g NH_4NO_3 ; 0,02 g CaCl_2 ; 0,02 g FeSO_4 , 5 ml de la solution d'éléments minéraux en trace (annexe I) Différentes concentrations de phénol sont préparées, en ajoutant des volumes correspondants aux concentrations désirées de phénol à partir de la solution mère de 5% :

- 100µl → [100mg/l] ;
- 200µl → [200mg/l] ;
- 300µl → [300mg/l] ;
- 400µl → [400mg/l].

Dans cette expérimentation le phénol est utilisé comme unique source de carbone et d'énergie. Le but est de savoir si *C.curvatus* et *Y.lipolityca* peuvent le dégradé. Pour cela on varie les paramètres suivants :

- l'aptitude de chaque souche à biodégrader le phénol ;
- l'effet de l'adaptation sur la biodégradation ;
- l'effet de la concentration du substrat phénolique sur la biomasse.

Matériel et méthodes

Tableau IX : Conditions de réalisation des essais de la biodégradation du phénol par les levures librement suspendus dans des erlenmeyers.

Essai	Adaptation	Concentration initiale en phénol (mg/l)
Influence	Cellules non adaptées au phénol	-100 - 200 -300 -400
Sur l'adaptation	Cellules adaptées au phénol	
Influence de la concentration	Cellules adaptées au phénol	-100 -200 -300 – 400– 800

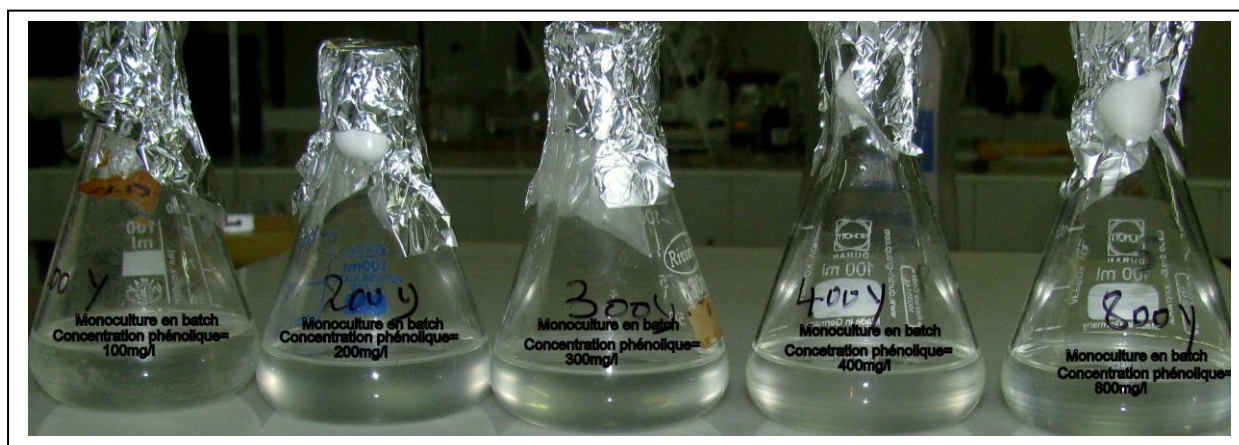


Figure 11 : Monoculture en batch dans des erlenmeyers de 100ml contenant 50ml de MM et les concentrations phénoliques de la plus faible à la plus concentrée (même type de culture pour les souches)

➤ Prélèvement des échantillons à partir des cultures

A des intervalles de temps réguliers (24h- 48h- 72h), des prélèvements sont effectués du milieu de culture afin de suivre le taux de biodégradation du phénol en évaluant sa concentration résiduelle en mg/l, qui est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie à la même longueur d'onde, ainsi que l'évolution de la croissance des levures qui est déterminée par la mesure de la DO à une longueur d'ondes de 620nm en prenant l'eau distillée comme référence.

III.1.2. Dosage colorimétrique du phénol

Le dosage du phénol est suivi par la méthode colorimétrique selon la norme NF (T90-2004) basée sur la condensation du 4-aminoantipyrine (4-AAP) avec le phénol en présence d'un agent oxydant, le ferricyanure de potassium, dans un milieu alcalin pour donner un complexe de couleur rouge. L'intensité de l'absorbance dépend de la concentration du phénol (YANG et HUMPHREY, 1975). Le dosage du phénol avec le 4-AAP a été rapporté pratiquement par la plupart des travaux menés sur la biodégradation du phénol. Parmi ces travaux on trouve ceux de BESHAY *et al*, (2002) ; OBOIRIEN *et al*, (2005) ; CAI *et al*, (2007) et SHOURIAN *et al*, (2009).

➤ **La courbe d'étalonnage est obtenue comme suit**

Des dilutions sont effectuées d'une manière à obtenir une gamme étalon allant de 0 à 5mg/l de phénol (Annexes III) le dosage est effectué selon la figure suivante :

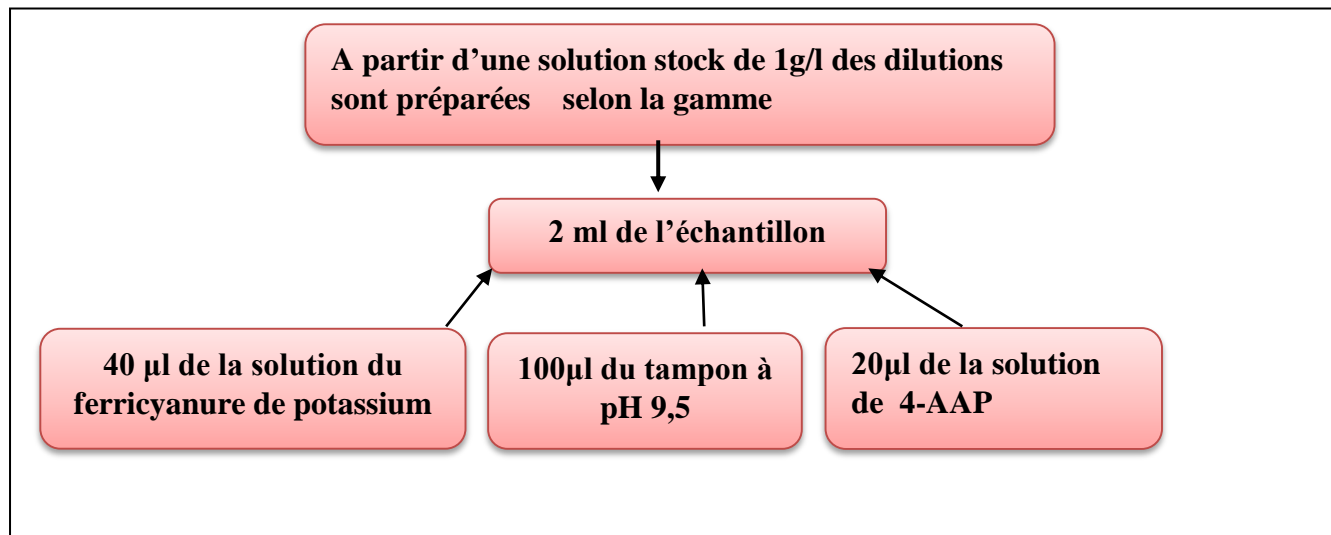


Figure 12 : Etapes suivies pour la réalisation de la courbe d'étalon.

Les solutions sont à chaque fois bien homogénéisées. La coloration se développe à température ambiante après 5min. La lecture est effectuée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 510 nm à différentes concentrations de phénol (mg/l).

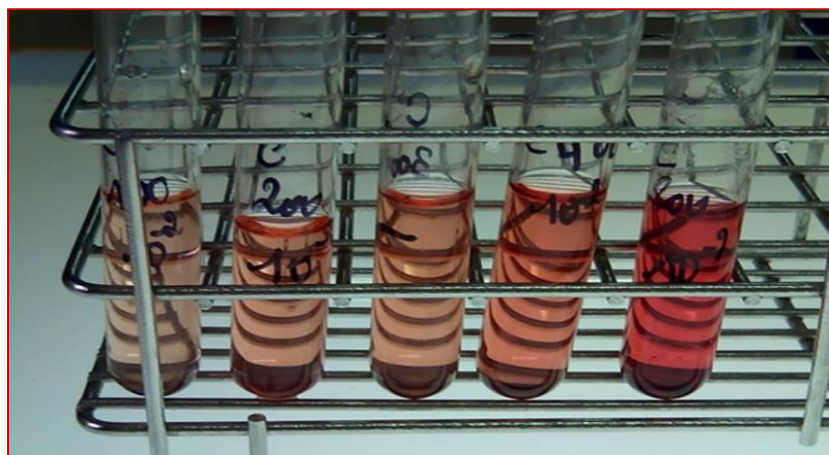


Figure 13 : Dosage colorimétrique du phénol la couleur est proportionnelle à la concentration en phénol.

➤ Courbe d'étalonnage

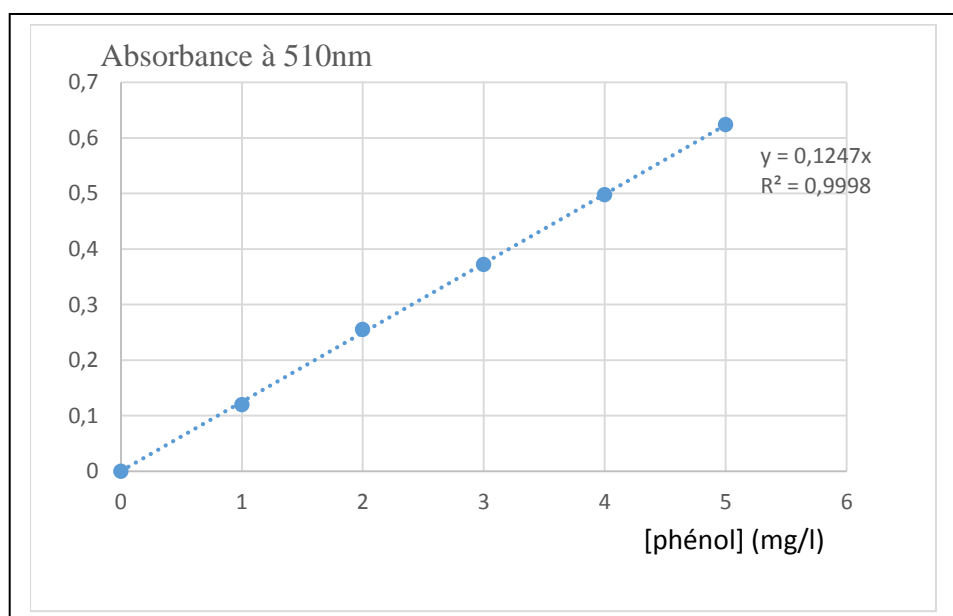


Figure 14 : Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique du phénol.

C'est à partir de cette courbe que vont être déterminées les concentrations phénoliques résiduelles en mg/l après culture afin d'estimer le taux (%) dégradé du phénol, à l'aide de l'équation ressortie de la courbe étalon.

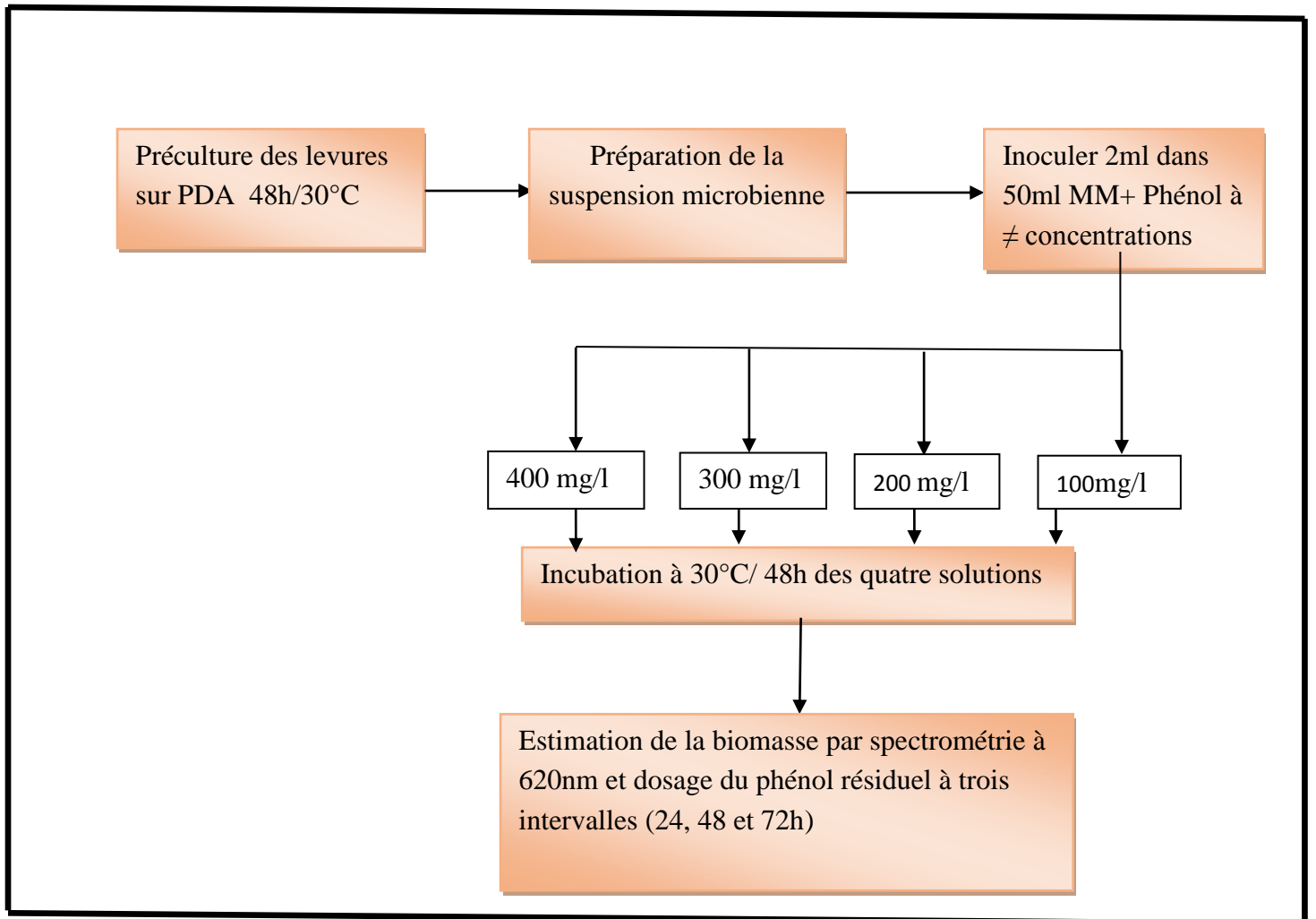


Figure 15 : Protocole expérimental de la biodégradation du phénol.

III.2. Bioconversion du lactosérum dé-protéiné par les levures

Le lactosérum étant conservé au congélateur, doit être retiré la veille du jour de son utilisation et laisser à température ambiante.

➤ Etapes de déprotéinisation du lactosérum

- Le pH du lactosérum est ajusté à une valeur de 4,6 (élimination des protéines sériques) par addition d'acide sulfurique (1N),
- puis centrifugé à 5000 tours pendant 5min,
- le surnagent est filtré sur papier filtre (type Wattman) et cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un sérum limpide et dé-protéiné.
- Le filtrat recueilli est réajusté à pH=7 avec du NaOH (1N), puis stérilisé à 120°C pendant 20 minutes, et prêt à être utilisé comme milieu de culture pour les levures oléagineuses (*C.curvatus* et *Y.lipolytica*), en utilisant le lactose présent comme source de carbone et d'énergie.

III.2.1.Mode opératoire

➤ Inoculation des cultures

Les cultures se font dans deux erlenmeyers stériles, de 250ml, remplis à raison de 100ml de lactosérum. Les milieux sont inoculés à l'aide d'une micropipette stérile à partir des suspensions mères de levures (très chargées) à raison de 2 ml. Ensuite, les erlenmeyers sont bouchés à l'aide de coton stérile et incubés à 30°C/48h.

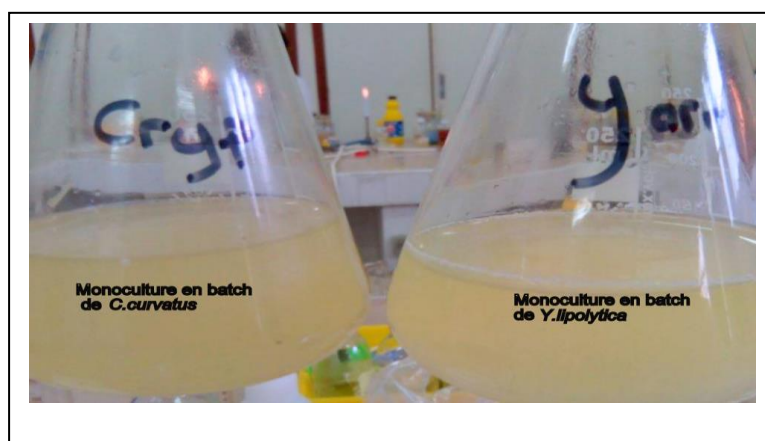


Figure 16 : Les monocultures en batch de *C.curvatus* et de *Y.lipolytica* dans le lactosérum dé-protéiné.

➤ **Mesure de la matière sèche produite**

Les cultures sont versées dans tubes à centrifugation ; pour pouvoir les centrifugés à 5000tours/10min à 4°C. Le culot résiduel va servir pour mesurer la matière sèche afin d'évaluer le développement des levures. La biomasse cellulaire est alors séchée dans une étuve à 44°C jusqu'à obtention d'un poids sec constant.

➤ **Dosage des protéines et des sucres**

Les surnageant préalablement obtenus en fin de culture vont être utilisés pour le dosage des sucres (lactose résiduel, et les sucres libérés après hydrolyse (β -D-galactose et α/β -D-glucose)) par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS) (page 50) et des protéines et enzymes produites dans le milieu par la méthode de Bradford (page 52).

➤ **Extraction des lipides**

Pour l'extraction des lipides on récupère la matière sèche dans un volume d'éthanol pur, on procède ensuite à une centrifugation à 5000G/10min. Le surnageant (solvant+ lipides) est récupéré (c'est la fraction qui nous intéresse) et séché (dans l'étuve à 44°C jusqu'à séchage) jusqu'à obtention d'un poids sec constant.

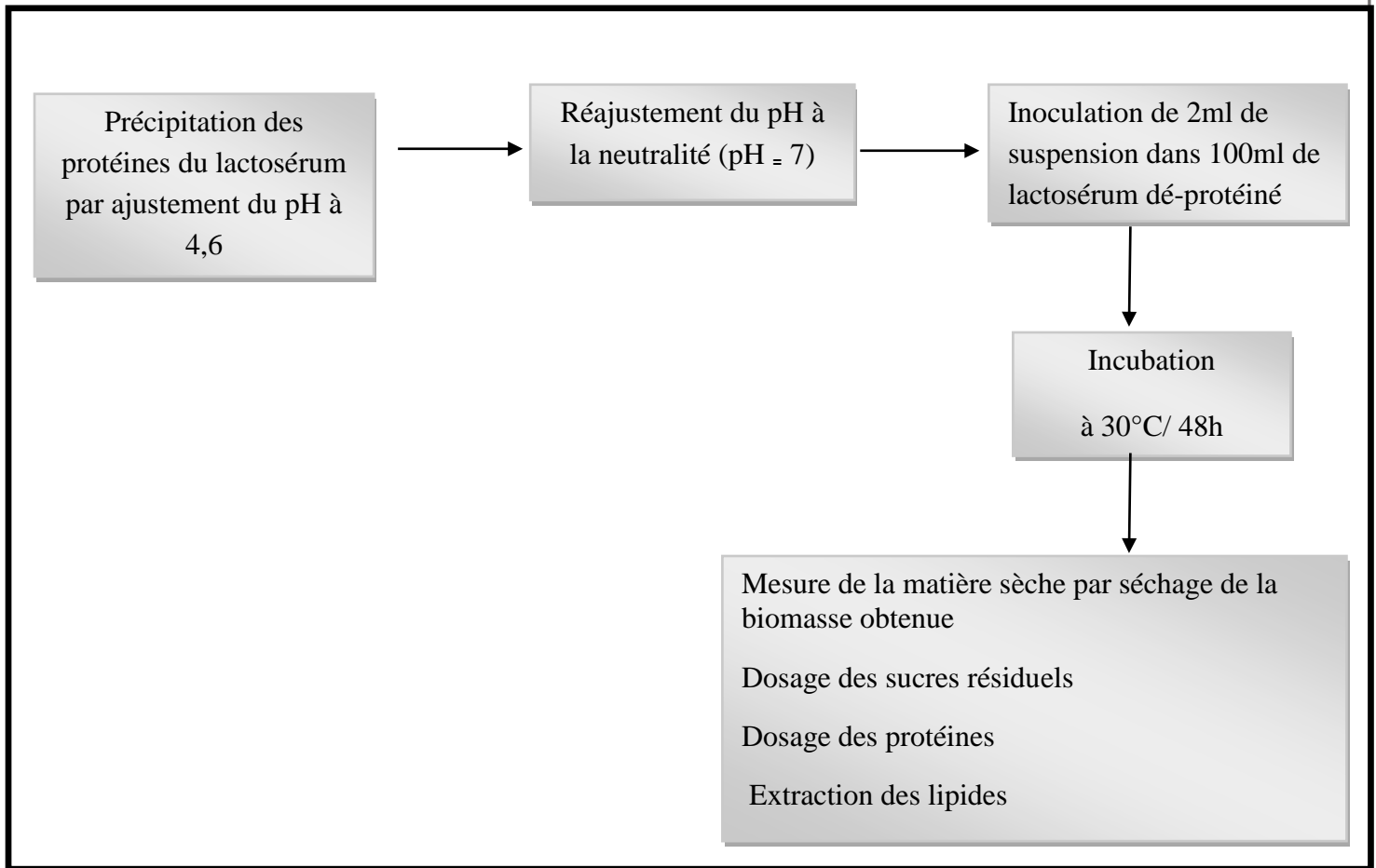


Figure 17 : Les étapes suivies pour la bioconversion du lactosérum dé-protéiné.

III.3. Bioconversion du grignon d'olives

Le grignon d'olives étant riche en substances ligno-cellulosiques, organique, servira de substrat de bioconversion, par trois types de champignons : *A.niger* ; *T.reesei* et *P.sp* par fermentation sur milieu solide (SSF).

Pour que les champignons puissent se développer, ils devront produire des enzymes telle que les cellulases afin de dégradés la cellulose incrusté dans la ligno-cellulose. A cet effet, après chaque culture (incubation à 28°C pendant une semaine) le dosage des sucres (par la méthode du DNS) et des protéines est réalisé.

III.3.1. Mode opératoire

Dans des erlenmeyers, on met 50g de grignon d'olive brut, qu'on autoclave à 120°C/20min. ensuite on l'humidifie avec 50ml du milieu Mendel et Weber (MW) (Annexes I), afin d'assurer l'apport en minéraux et le bon développement mycélien.



Figure 18 : Grignon d'olives brut utilisé.

➤ Inoculation du milieu

A partir de pré-cultures de champignons *T.reesei* et *P.sp*, sur le milieu PDA après 7 jours d'incubation à 28°C; des disques 5 à 6 mm de diamètre de mycélium sont prélevés soigneusement à l'aide d'un emporte pièces. 50g de G.O sont inoculés avec dix disques de mycélium.

Pour *A.niger*, à partir des cultures sur boîtes de Pétri ; sur milieu PDA ; d'une semaine (à 28°C) les spores sont récupérées dans du tween 0,1% (dans la zone stérile). Suite à un dénombrement sur cellule de Mallassez, le substrat est inoculé à raison de 10^6 / g de substrat.

Et ainsi l'incubation est lancée pour une durée d'une semaine à 28°C dans une étuve, en effectuant des agitations manuelle tous les 24 heures pour l'aération.

III.3.2. Cultures témoins sur les dérivés de celluloses

Dans cette partie on utilisera comme témoin de la production de cellulases, quatre milieux de cultures contenant 4 types de dérivés de celluloses : Xylane ; CMC ; Avicel et C100.

- Ces quatre milieux sont sous deux formes :
 - 1) Solide après ajout d'agar pour une culture sur boîte de Pétri (on lui ajoute un indicateur de dégradation qui est le rouge de Congo).
 - 2) Liquide (dérivés de cellulose + MW) pour une culture (fermentation) dans des erlenmeyers de 100ml remplis à raison de 50ml.

Pour le milieu solide, le rouge de Congo est additionné pour la mise en évidence de la production des enzymes où on observe des halos clairs au niveau des zones de développement du mycélium et changement du pH du milieu.

➤ Analyse des cultures liquide et solides

- ❖ Pour les cultures, sur milieu solide, après incubation (une semaine/28°C) ; les enzymes (cellulases) produites, sont récupérées dans une solution tampon de citrate (pH=4,6) (Annexes I). La solution récupérée contenant l'extrait enzymatique est transvasée dans des tubes et est centrifugée à 5000G/10min à 4°C afin d'éliminer les mycéliums restant (culot). Le surnageant est exploité pour le dosage des sucres (par la méthode du DNS) et le dosage des protéines (par la méthode de Bradford).
- ❖ Pour les cultures liquides : Après incubation, on prend un volume suffisant (2ml) à centrifuger (5000G/10min) ; pour le dosage des sucres totaux et des protéines (cellulases ; xylanases)

III.3.3 Grignon d'olive hydrolysé à l'acide sulfurique

Dans un flacon, on met le grignon d'olives broyé additionné d' H_2SO_4 (v/v). Comme flacon témoin de l'hydrolyse, on met de l'eau et de H_2SO_4 (v/v). Deux essais sont réalisés, des flacons sont incubés à 30°C et d'autres à 100°C/1h au bain marie.

Une fois l'incubation terminée ; la solution sera de couleur noire, due au pigment noir et colorants apportés par le G.O. Pour s'en débarrasser, une filtration sur papier Wattman est

Matériel et méthodes

réalisée afin d'obtenir une solution plus claire ayant un pH=6. Le filtrat obtenu est alors soumis à l'analyse des sucres totaux.



Figure 19: A : Grignon d'olives broyé

B : filtration du G.O hydrolysé.

Pour en faire de cet hydrolysate un milieu de culture, il doit être autoclavé à 120°C/20min avant de l'inoculer.

Une fois autoclavé, on remplit des tubes stériles avec les hydrolysats (deux pour chaque hydrolysate) ; dans la zone stérile, les tubes sont inoculés de la suspension mère de levures (*C.curvatus* et *Y.lipolytica*) et incubés à 30°C/48h.

Après incubation ; le surnageant de centrifugation est utilisé pour le dosage des sucres résiduels et des protéines (enzymes) produites par les levures.

Matériel et méthodes

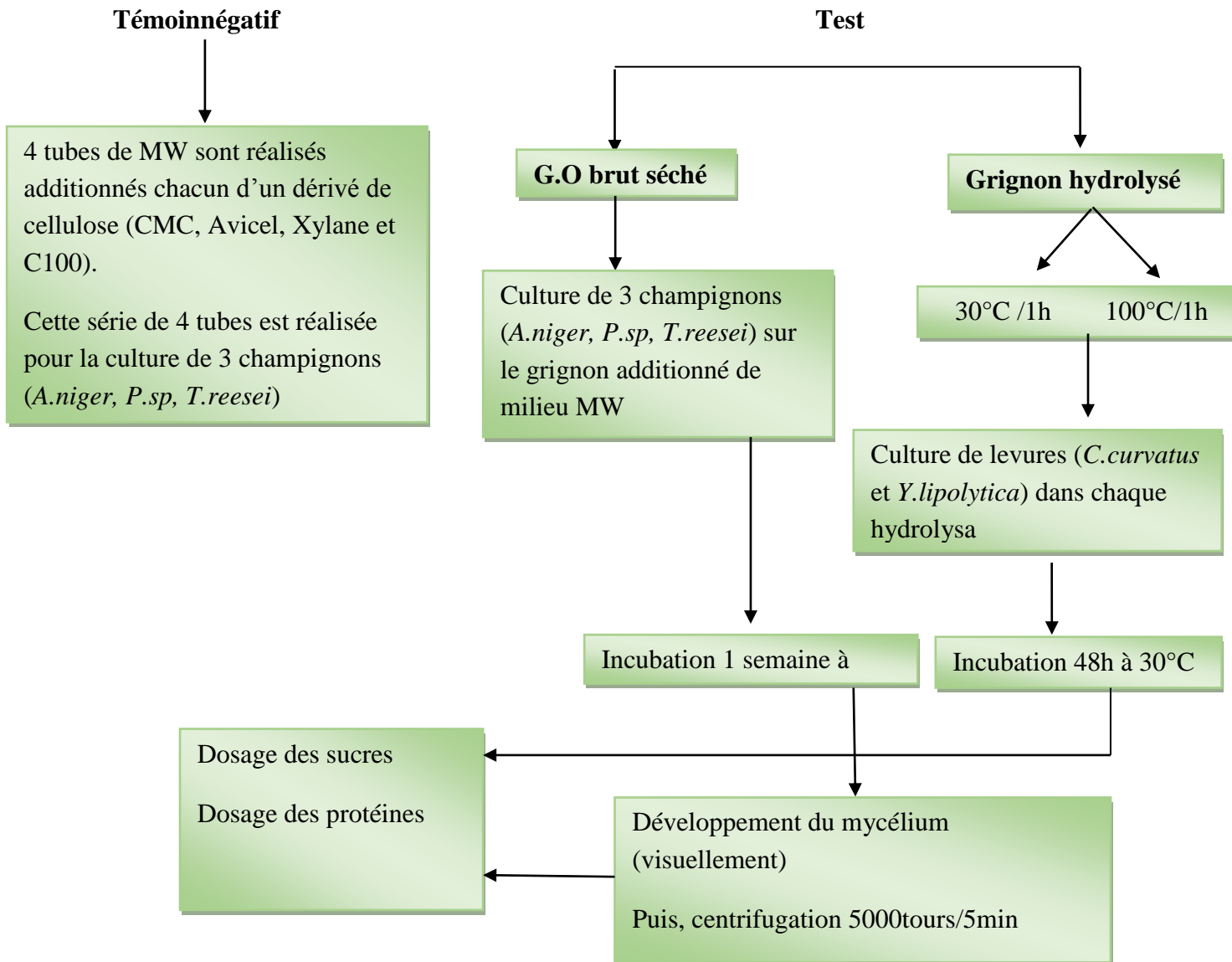


Figure 20 : Protocole expérimental de la bioconversion du grignon d'olives.

IV. Dosage colorimétrique des glucides (Méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS))

IV.1. Principe de la méthode

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique en présence de sucres réducteurs. Le composé obtenu est rouge orangé à reflets pourpres. Il peut être dosé par spectrophotométrie ($\lambda = 530\text{nm}$).

IV.2. Protocole expérimental

- Mettre 1ml de la solution à doser (ou des différentes dilutions) dans un tube à essai ;
- Ajouter 2ml du réactif (3,5 DNS) ;
- Chauffer au bain-marie bouillant pendant 5min ;
- Refroidir par écoulement d'eau sous le robinet ;
- Ajouter 7ml d'eau distillée et homogénéiser ;
- Laisser reposer pendant 15min à température ambiante ;
- Faire la lecture à 530 nm contre le blanc.

NB : afin de déterminer la quantité de sucres réducteurs présente dans les échantillons inconnus :

- réaliser une courbe d'étalonnage avec une solution de glucose à 1g/l.
 - préparer les dilutions nécessaires pour les échantillons inconnus (10⁻¹, 10⁻²)
- dans le cas où ils sont concentrés (leurs DO à 530 nm après la réaction doit être incluse dans la gamme étalon).



Figure 21: Photographie prise après incubation des tubes à 100°C durant 5min pour le dosage du glucose, la couleur est proportionnelle à la concentration en glucose.

IV.3. Courbe d'étalonnage

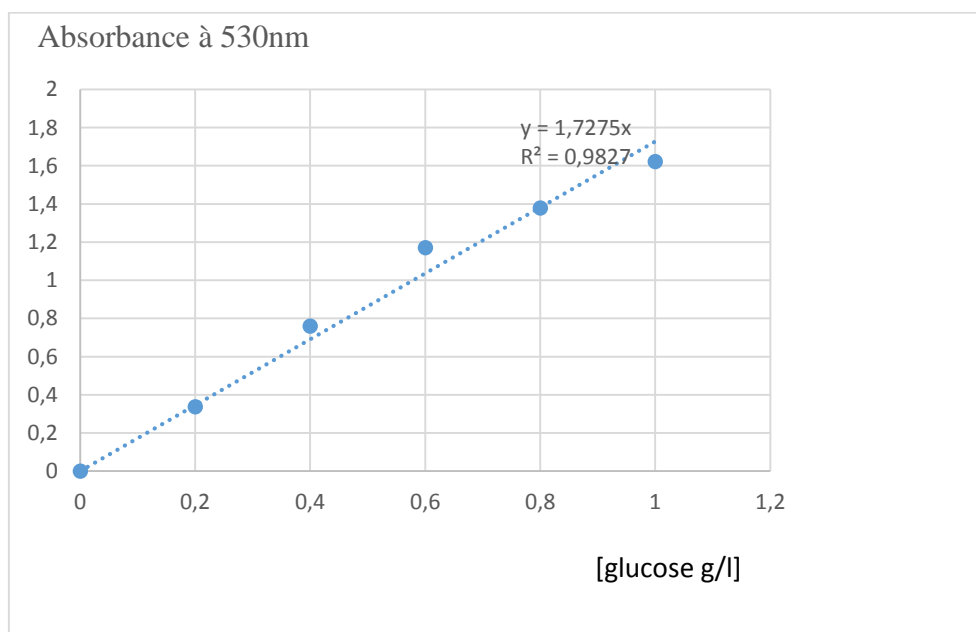


Figure 22: Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique du glucose par la méthode du DNS.

V. Dosage colorimétrique de la BSA (Par la méthode de Bradford)

V.1. Principe

Dans cette méthode, le bleu de Coomassie G250 forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm. L'albumine se colore beaucoup plus intensément que les autres protéines et l'on doit tenir compte lors du choix de l'étalon (GAVRILOVIC et al, 1996).

V.2. Protocole

Pour un volume de 50 μ l d'échantillon ([BSA mg/ml]) ; on ajoute 1,5 ml de réactif de Bradford.

-Préparation du réactif de Bradford :

À partir d'une solution de réactif de Bradford pure, on réalise une dilution au 1/10, suivie d'une filtration sur papier Wattman (ces deux étapes se font à l'abri de la lumière, à cause de la sensibilité du réactif à la lumière) puis conservé dans un flacon teinté à 4°C.

IV.3. Courbes d'étalonnage

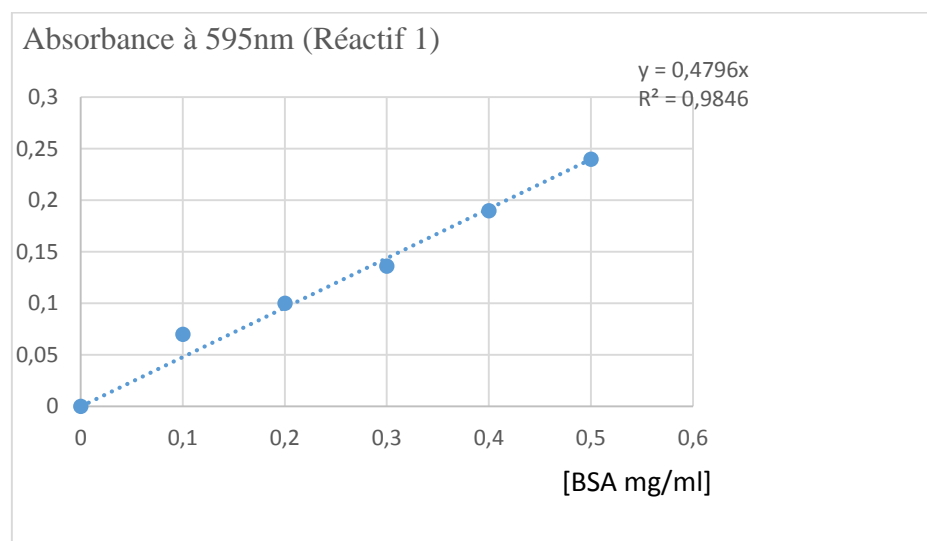


Figure 23 : Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique de la BSA avec le réactif (1)

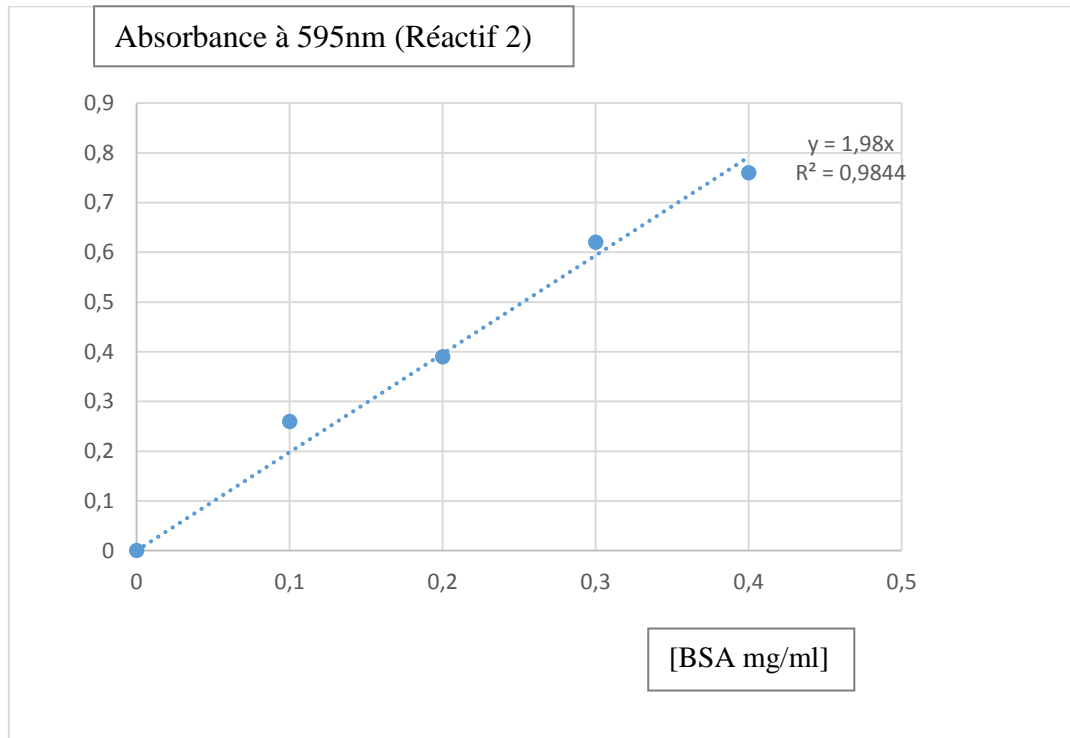


Figure 24 : Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique de la BSA avec le réactif (2)

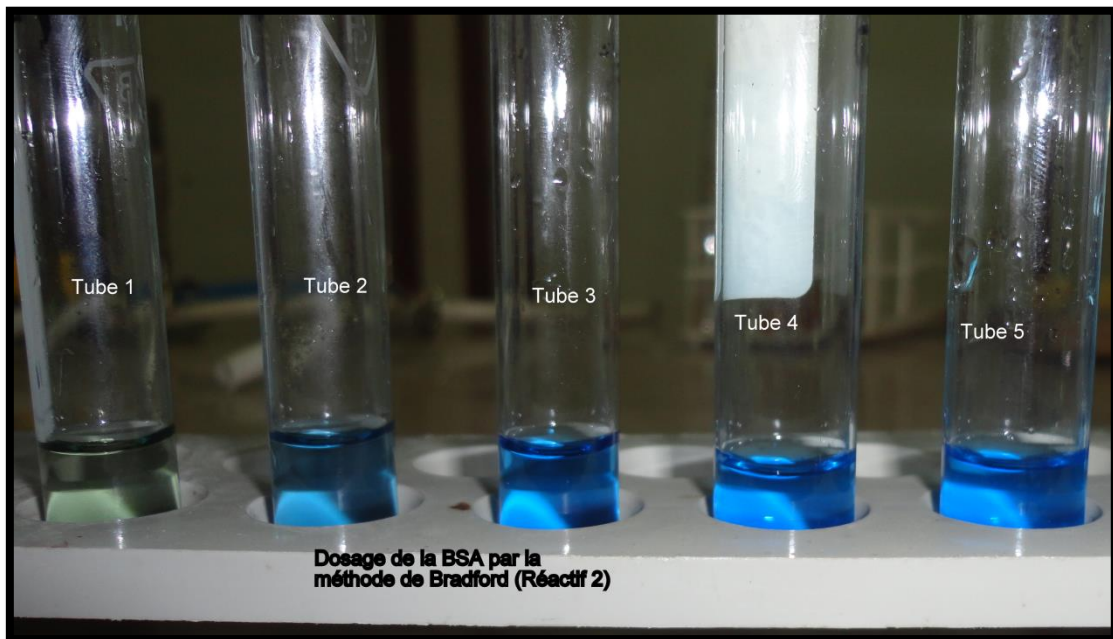


Figure 25 : Photographie prise lors du dosage de la BSA (la couleur est proportionnelle à la concentration en BSA).

Remarque

Les équations ressorties, des deux courbes d'étalonnage du dosage du glucose et de la BSA serviront à déterminer les concentrations en sucres totaux (g/l) et en protéines (cellulases) (g/l).

Résultats et discussions

I. Biodégradation du phénol par les levures *C.curvatus* et *Y.lipolytica*

Pour mettre en évidence l'efficacité de biodégradation du phénol par *C.curvatus* et *Y.lipolytica*, nous nous sommes intéressés à trois paramètres ; l'aptitude de chaque souche à biodégrader le phénol, l'effet de l'adaptation sur la biodégradation et l'effet de la concentration du substrat phénolique sur la biomasse. Les résultats obtenus sont comme suit :

I.1. L'aptitude des deux souches à biodégrader le phénol

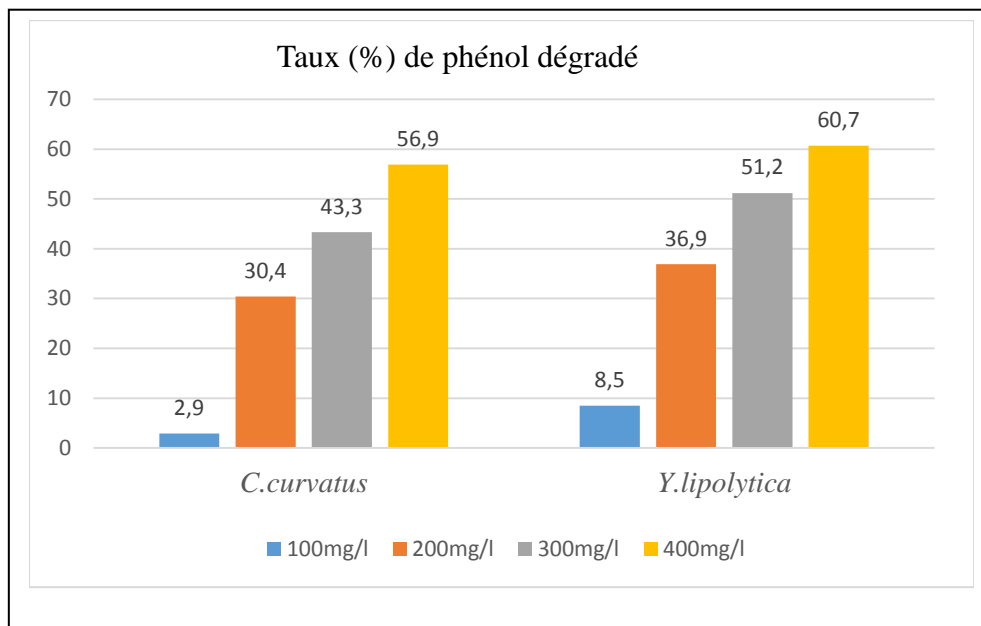


Figure 26 : Biodégradation du phénol par les deux souches en fonction des concentrations (mg/l) phénoliques.

Les résultats de la biodégradation du phénol enregistrés en fonction du taux de dégradation du phénol montrent que *Y.lipolytica* est plus efficace que *C.curvatus* dans la dégradation du substrat phénolique. Notons également que le taux de biodégradation par les deux souches augmente en fonction de l'augmentation des concentrations phénolique, ceci veut dire que le phénol, concentré jusqu'au 400 mg /l, n'est pas toxique pour les deux souches.

I.2. Effet de l'adaptation des cellules au phénol sur la biodégradation

La figure (27) représente l'effet de l'adaptation au phénol selon les taux de dégradations.

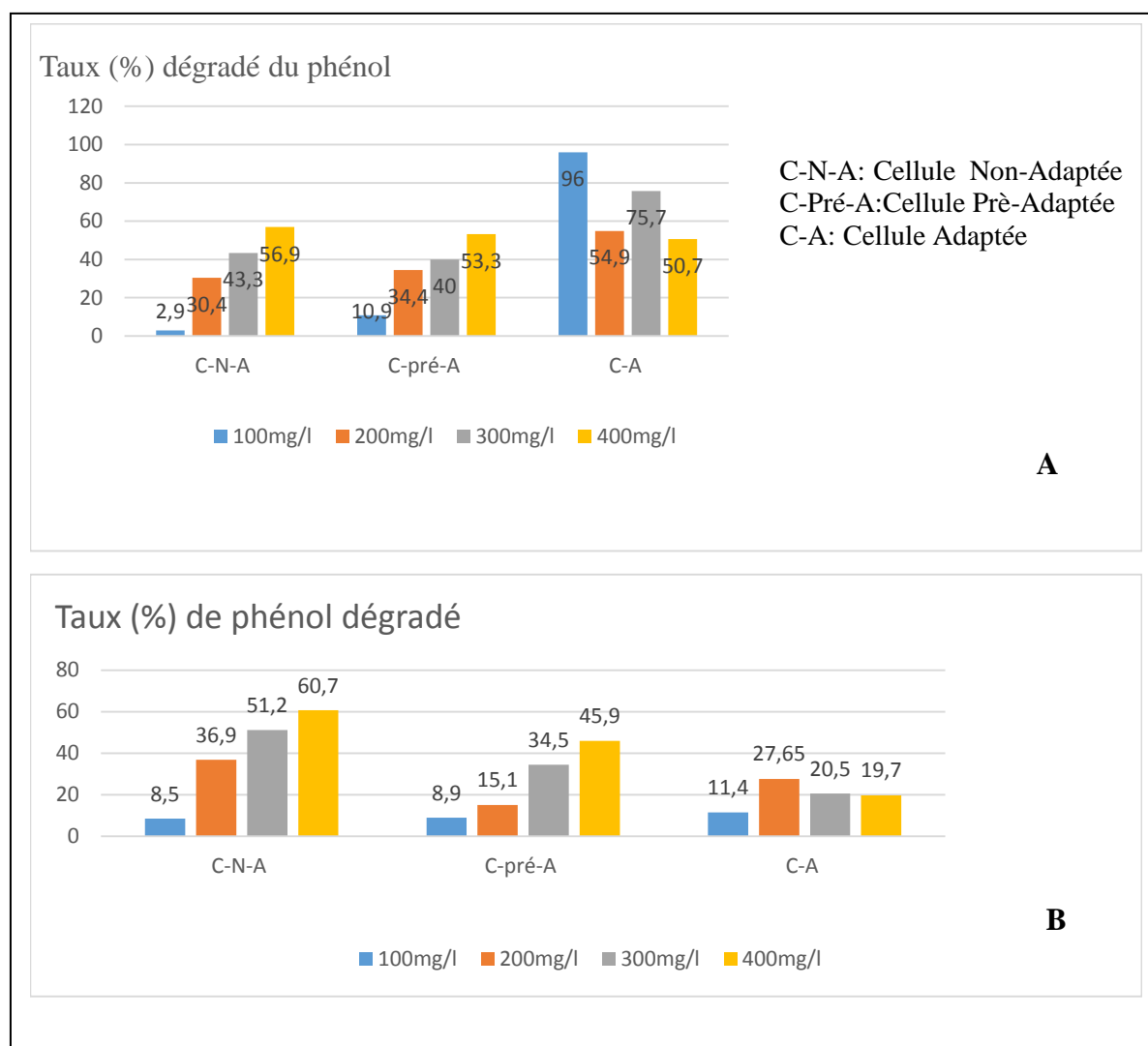


Figure 27: l'effet de l'adaptation de *C. curvatus* (A) et *Y. lipolytica* (B) sur la biodégradation du phénol.

Pour la souche *C. curvatus*, non adaptée, nous constatons que le taux de biodégradation augmente en augmentant les concentrations du substrat phénolique. Donc le substrat phénolique concentré jusqu'à 400mg/l n'est pas toxique pour la souche, mais, en plus il permet une meilleure biodégradation qui pourrait correspondre à la meilleur croissance cellulaire.

Pour le stade pré-adapté (2eme contact avec le phénol) et adapté, une amélioration de la biodégradation est enregistrée avec un meilleur taux obtenu au niveau du stade adapté dans le

Résultats et discussions

substrat phénolique concentré à 100 mg/l. Nous notons également que plus la durée d'adaptation est longue (par rapport aux répétitions de contacts), de plus le taux de biodégradation est meilleur cet effet positif d'adaptation sur la biodégradation a été révélée par SHIMP *et al* (1987) en étudiant le rôle de la durée d'adaptation d'une communauté microbienne aquatique.

Par ailleurs, au niveau de ces deux stades d'adaptation, la corrélation entre le taux de biodégradation et les concentrations du substrat n'est pas linéaire.

Pour la *Y.lipolytica* c'est la souche non adaptée qui a enregistré les taux de biodégradation les plus importants avec un meilleur taux obtenu au niveau de la concentration la plus élevée 400mg /l.

Contrairement à *C.curvatus*, la durée d'adaptation (répétition de culture ou de contact avec le phénol) est plutôt négative sur le rendement de biodégradation de *Y.lipolytica* ceci est probablement lié à l'effet inhibiteur du phénol qui apparaît suite à des contacts répétitifs de la souche avec le substrat phénolique.

I.2.1. Cinétique de biodégradation du phénol par les souches adaptées

Effet de *C.curvatus* et de *Y.lipolytica* adaptées sur la cinétique de biodégradation du phénol.

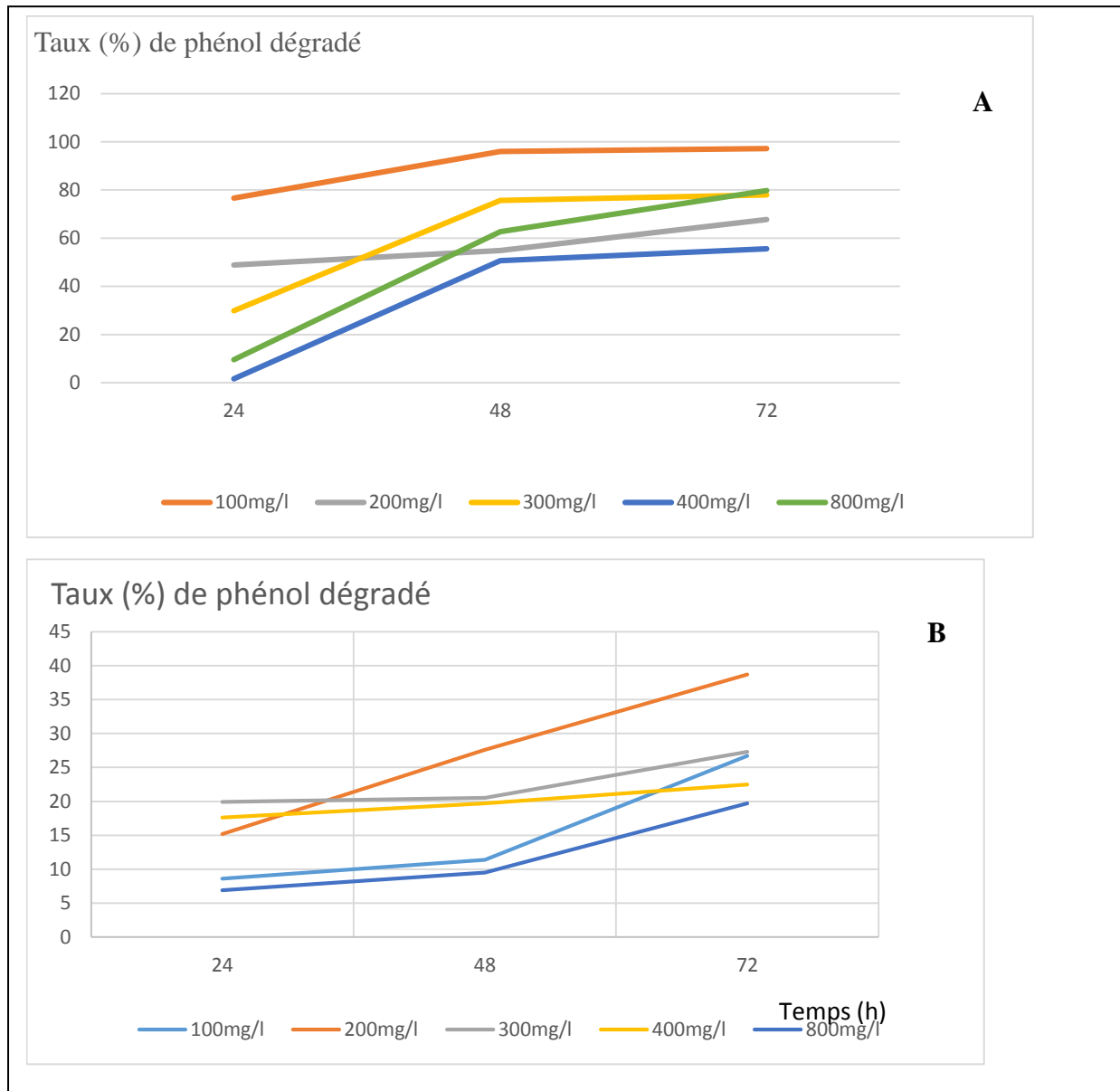


Figure 28 : Cinétique de biodégradation du phénol. A : par *C.curvatus*. B : par *Y.lipolytica*. (Adaptées)

La cinétique de biodégradation (figure 28 (A)) montre que l'évolution de la biodégradation est spécifique pour chacune des souches étudiées, d'une sorte que ;

Pour la souche *C.curvatus*, une augmentation rapide et importante de taux de biodégradation au bout des premières 24 heures avec un taux élevé de biodégradation enregistré à 48h pour toutes les concentrations le meilleur taux de biodégradation (97%) est obtenu au niveau de la

Résultats et discussions

concentration minimale (100mg/l) confirmant ainsi l'effet positif et accentué de l'adaptation de la souche pour biodégrader le phénol à (100mg/l).

A partir de 48h, la courbe de biodégradation tend à se stabiliser, cette stabilisation de biodégradation pourrait être expliquée par l'épuisement du substrat (phénol), synonyme de la diminution de la biomasse cellulaire, dû à sa biodégradation élevée de début.

Contrairement à la première, la souche *Y.lipolytica* (figure 28 (B)) présente une cinétique évolutive croissante pendant les 72 heures d'incubation avec un taux de biodégradation enregistré au final, au niveau de toutes les concentrations. Cette fois-ci le meilleur taux de biodégradation (38,7%) est enregistré au niveau de la concentration 200mg/l.

La comparaison de la cinétique de biodégradation du phénol des deux souches, montre la meilleure efficacité de biodégradation de *C.curvatus* par rapport à *Y.lipolytica*, au niveau de toutes les concentrations. Cela peut être dû aux propriétés physiques et chimiques, il a été souvent rapporté que les polluants aromatiques ont tendance, chez les cellules microbiennes à diminuer la synthèse de l'ATP (LOFFHAGEN *et al*, 1995) et à modifier ou dénaturer les biomolécules (TAMARIT *et al*, 1998). De tels effets perturbent la croissance et réduisent ainsi l'activité de biodégradation qui devient inefficace.

I.3. Effet de la concentration du substrat phénolique sur la croissance de la biomasse

L'évolution de la biomasse cellulaire des deux souches adaptées en fonction du temps, dans le substrat phénolique aux concentrations différentes est représentée dans la figure 29.

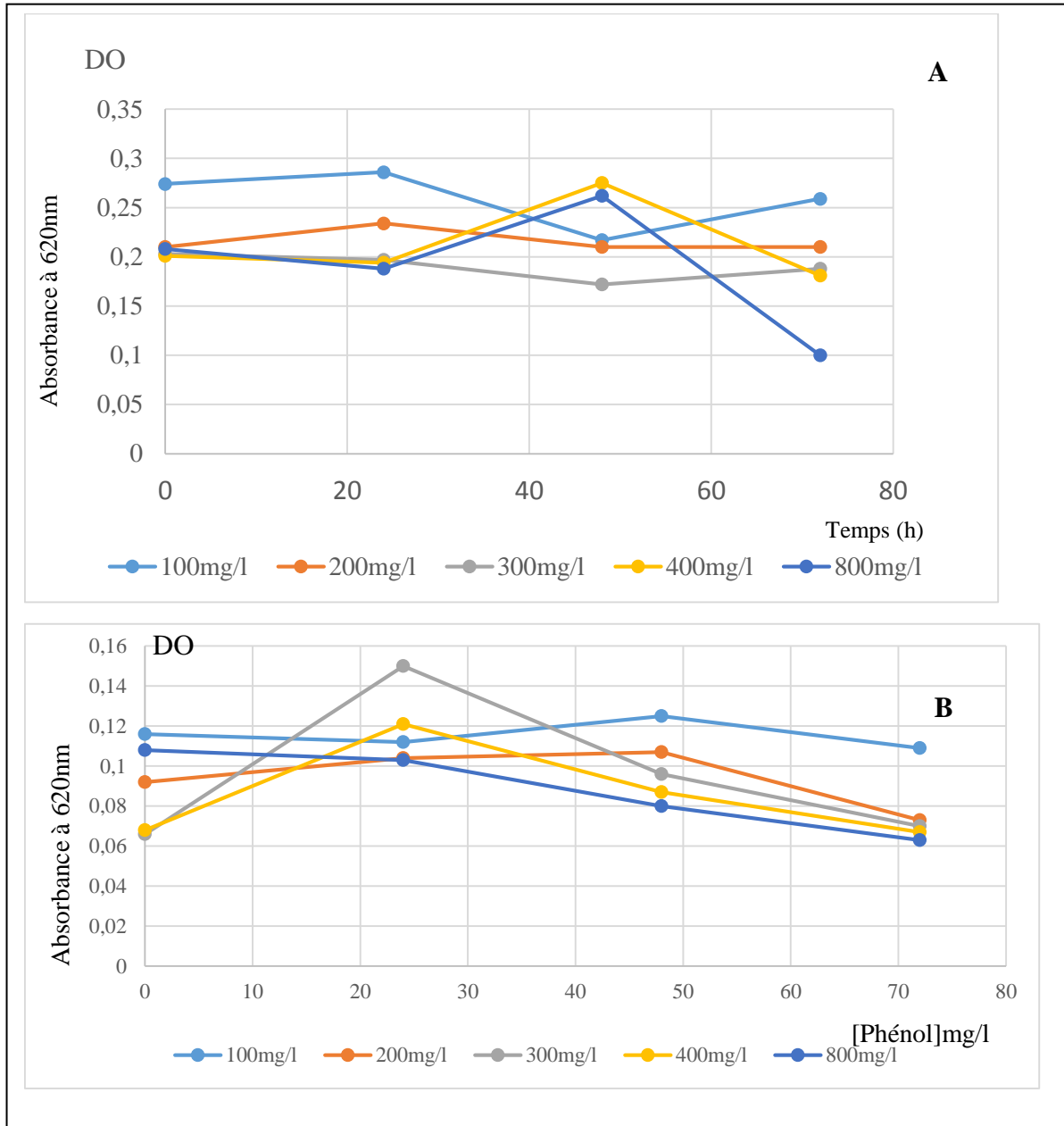


Figure 29 : Cinétique de croissance de la biomasse A : de *C. curvatus* B : de *Y. lipolytica*

Résultats et discussions

Ces cinétiques de croissances représentent des allures différentes selon la concentration du substrat.

Cinétique de croissance de *C.curvatus*, pour les concentrations de 100,200 et 300mg/l, entre 0 et 24h les courbes ont la même allure où on enregistre une augmentation de la biomasse cellulaire suite à la dégradation du substrat, puis après 24h on remarque une diminution suivie d'une stabilisation après 48h probablement due à l'épuisement du substrat. Pour les concentrations de 400 et 800mg/l, entre 0-24h il n'y a pas de croissance (phase d'adaptation à ces fortes concentrations) ce n'est qu'après 24h qu'il y'a une légère croissance, suivie d'une phase déclin après 48h, probablement due à l'effet inhibiteur des fortes concentrations en phénol. On peut dire que cette souche n'est pas tolérantes concentrations supérieures à 400mg/l.

Cinétique de croissance de *Y.lipolytica*, pour les deux concentrations 100 et 200mg/l, nous constatons une augmentation de la biomasse cellulaire après 48heures d'incubation ; après une phase d'adaptation entre 0 et 24h ; ceci est grâce à l'utilisation du substrat phénolique comme source nutritive. Pour les concentrations 300 et 400mg/l, entre 0 et 24h, on note une croissance, et qui diminue après 24h jusqu'à 72h, qui pourrait être due à l'inhibition par le phénol. Pour la concentration de 800mg/l, il n'y a pas de croissance, la courbe est en déclin ; cette concentration inhibe toute croissance.

D'après TUAH (2006), à des niveaux de concentration très élevés, le phénol peut inhiber le métabolisme relié à sa propre biodégradation. Cet auteur, en cultivant des cellules libres de *Candida tropicalis* sur le phénol, a constaté que cette inhibition par le substrat se manifeste par une faible et lente élimination de ce polluant. Comme cela est rapporté dans nos résultats et ceux de CHENet al.(2002).

Selon toujours TUAH (2006), le phénol comme substrat auto-inhibiteur pourrait probablement être responsable d'une inhibition directe en affectant les enzymes clés de sa propre dégradation ou bien d'une inhibition indirecte en perturbant les mécanismes de transduction de l'énergie.

Selon (SIKKEMA *et al.*, 1994), la toxicité des composés aromatiques est souvent attribuée à la destruction des structures membranaires des cellules ceci via des interactions avec la bicouche lipidique, due à la nature lipophile de tels composés.

La toxicité du phénol est aussi souvent associée à la perte de l'intégrité de la membrane cytoplasmique se manifestant par:

Résultats et discussions

- Des perturbations au niveau des mécanismes de transduction de l'énergie ;
- des perturbations de la fonction barrière de la membrane ;
- des inhibitions de la fonction des protéines et une subséquente mort cellulaire

De par leurs propriétés physiques et chimiques, il a été souvent rapporté que les polluants aromatiques ont tendance, chez les cellules microbiennes à diminuer la synthèse de l'ATP (LOFFHAGEN *et al.*, 1995) et à modifier ou dénaturer les biomolécules (TAMARIT *et al.*, 1998). De tels effets perturbent la croissance et réduisent ainsi l'activité de biodégradation qui devient inefficace.

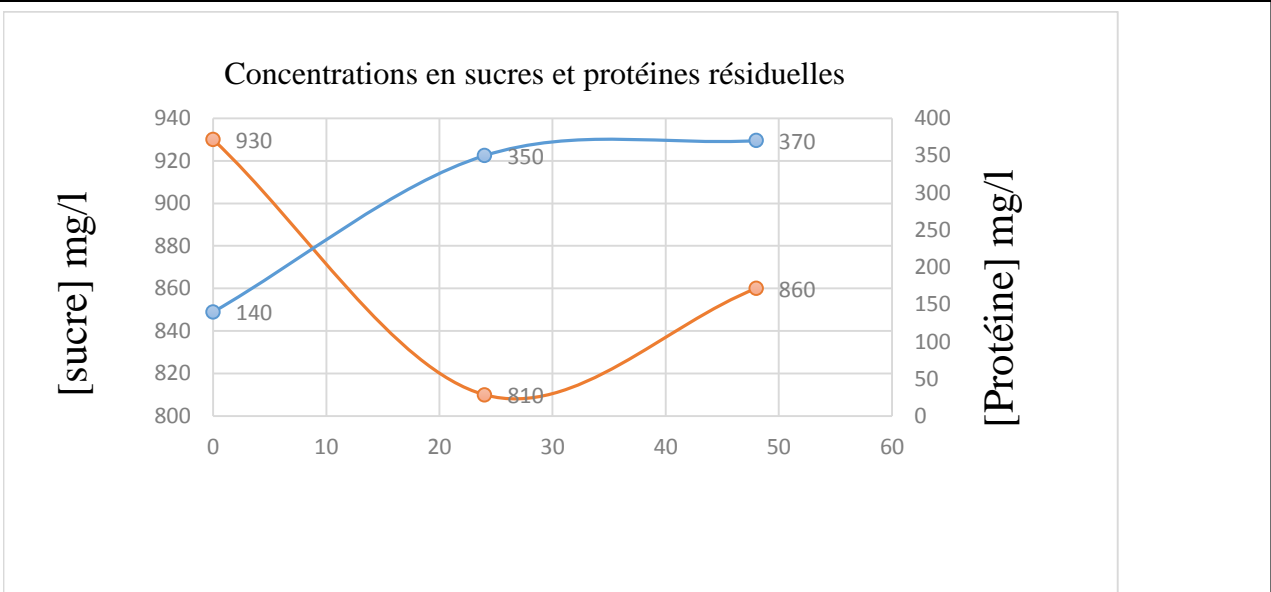
II. Bioconversion du lactosérum dé-protéiné par des levures oléagineuses

- Poids sec et constant de la biomasse (MS : Matières sèches) produite de :
 - *C.curvatus*: 200 mg/l.
 - *Y.lipolytica*: 360 mg/l.

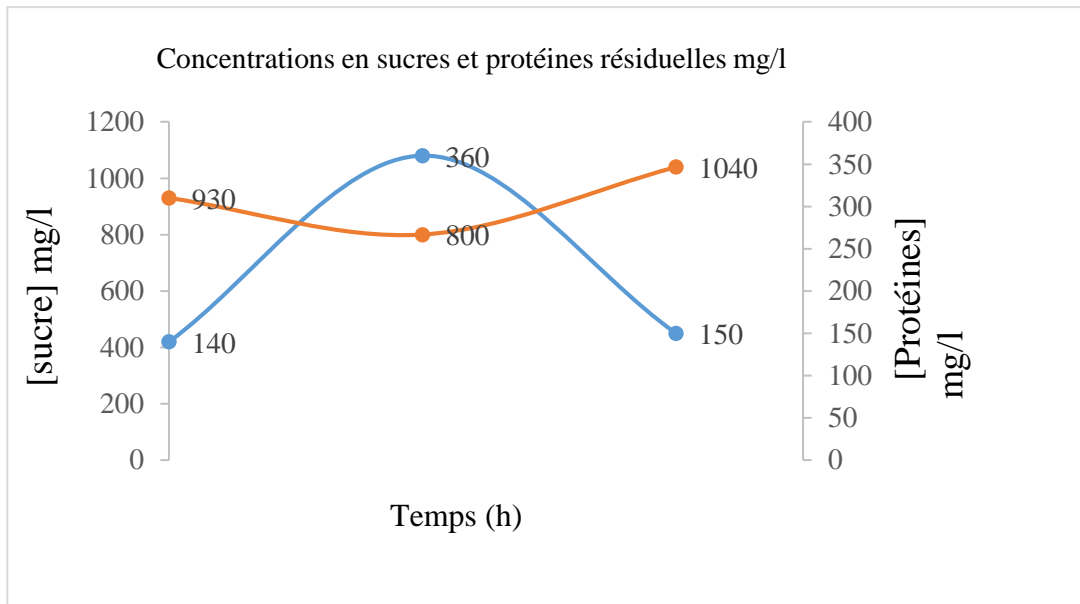
Les deux souches de levures ont poussées en dégradant le substrat présent dans le milieu qui est le lactose et ce par production de lactases, qui permettent la dissociation du lactose en glucose et galactose. Selon les poids obtenus c'est *Y.lipolytica* qui a une meilleure croissance (360mg/l) comparait à *C.curvatus* pour qui le poids sec de la biomasse est de 200mg/l.

Tableau X : Concentration des sucres et des protéines du lactosérum dé protéiné, après culture de de *C.curvatus* et *Y.lipolytica*.

Souches	Temps d'incubation	t0	24h	48h
<i>C .curvatus</i>	Concentration de sucre mg/l	930 ±0,008	810 ±0,005	860 ±0,002
	Concentration protéiques mg/l	140 ±0,002	350 ±0,004	370 ±0,002
<i>Y.lipolytica</i>	concentration de sucres mg/l	0,93 ±0,008	800 ±0,002	1040 ±0,005
	concentration protéiques mg/l	140±0,002	336 ±0,002	150 ±0,001



A.



B.

Figure 30 : Cinétique de dégradation du lactose (—) et de production de protéines(.—) par deux levures : *C.curvatus* (A) et *Y.lipolytica* (B).

Résultats et discussions

Pour *C.curvatus* (A) entre l'intervalle de temps de [0-24h] il y'a une diminution de la concentration en sucres de 930 mg/l jusqu'à 810mg/l et une production de 210 mg/l de protéine, probablement il s'agit d'enzymes nécessaire à la biodégradation de ces sucre. Entre 24h et 48h il y'a une légère augmentation de la concentration en sucre de 50mg/l accompagnée de celle des protéines correspondant à une production des enzymes qui ont servi à bioconvertir le lactose ,préalablement dégradé, en d'autres sucre plus simples et fermentescible, tel que le glucose.

Pour *Y.lipolytica* entre l'intervalle de temps [0-24h] il y'a une diminution de la concentration en sucres et une production enzymatiques qui se traduit par une élévation de la concentration de 220mg/l; puis entre l'intervalle de temps de [24-48h] on remarque une forte augmentation de la concentration en sucres de 240mg/l suivie d'une diminution en concentration enzymatiques de 210mg/l.

L'augmentation de la concentration en sucres peut être expliquée par la libération des deux oses (β -D-glucose et α/β -galactose) du lactose après hydrolyse par la β -galactosidase.

L'activité enzymatique de *C.curvatus* est caractérisée par une évolution croissante mais qui reste toujours faible. Par ailleurs, celle de *Y.lipolytica* est régressive après 24heures d'incubation, ceci peut être dû à plusieurs facteurs affectant cette activité des enzymatique tels que :

- Inhibition des enzymes par l'excès de substrat.
- L'activité de la β -galactosidase est reliée aux conditions physicochimiques (pH, T°C, O₂...etc) du milieu, d'après les travaux de J.FIEDUREK et *al.* (1994) sur la sélection de souches de levures, ayant une aptitude à dégrader le lactose comme seule source de carbone, il a été démontré que leur capacité à métaboliser le lactose est reliée à l'activité de la β -galactosidase (l'enzyme qui scinde le lactose en glucose et galactose) et de ce fait, cette activité enzymatique est directement liée aux conditions physico-chimiques du milieu de culture.
- L'activité des enzymes peut aussi être inhibée par l'appauvrissement du milieu en substrat et l'accumulation des déchets.

Pour pallier ce phénomène et une meilleure production en métabolites (lipides) on peut faire la culture en discontinu en additionnant, et un enrichissement régulier en substrat, de l'aération et agitation.

➤ Poids secs et constant des lipides produits après extraction éthanolique :

- Quantité de lipides produits par *C.curvatus* : 1µg/200mg de MS
- Quantité de lipides produits par *Y.lipolytica* : 1,3µg/360 de MS

Le rendement en produits lipidiques est meilleur pour *Y.lipolytica* et le poids de la biomasse produite est aussi plus intéressant. Donc *Y.lipolytica* a une meilleure activité de bioconversion, et la diminution de son activité enzymatique est probablement due à son inhibition par les métabolites produits et l'excès de déchets engendré après hydrolyse du lactose.

III. Bioconversion de la cellulose du grignon d'olives par trois souches fongiques

III.1. Fermentation sur milieu liquide (dérivés de cellulose) et sur milieu solide (grignon d'olives)

III.1.1. Evaluation de la biomasse mycélienne

Pour la biomasse, le mycélium produit, elle n'est évaluée que visuellement (à l'œil nu), pour chaque souche et sur chaque milieu de culture (Annexe II).

➤ Sur les milieux Solide:

- Sur boîte de Pétri , la croissance et les activités enzymatiques sont révélées avec indicateur de couleur après dégradation de la cellulose, donc leur potentiel cellulolytique est déterminé par les différentes modifications apparentes après dégradation et changement du pH
- Sur le grignon d'olives, la croissance diffère selon le développement et l'envahissement de ce milieu par le mycélium.

➤ Sur les milieux liquides la croissance est visualisée par la formation d'un voile mycélien à la limite liquide/air s'expliquant probablement par l'effet du flottement des spores s'associant ainsi à la région cellulosique la plus proche ou bien la recherche de l'oxygène les cultures n'étant pas agitées.

III.1.2. Fermentation sur milieu liquide des dérivés de cellulose

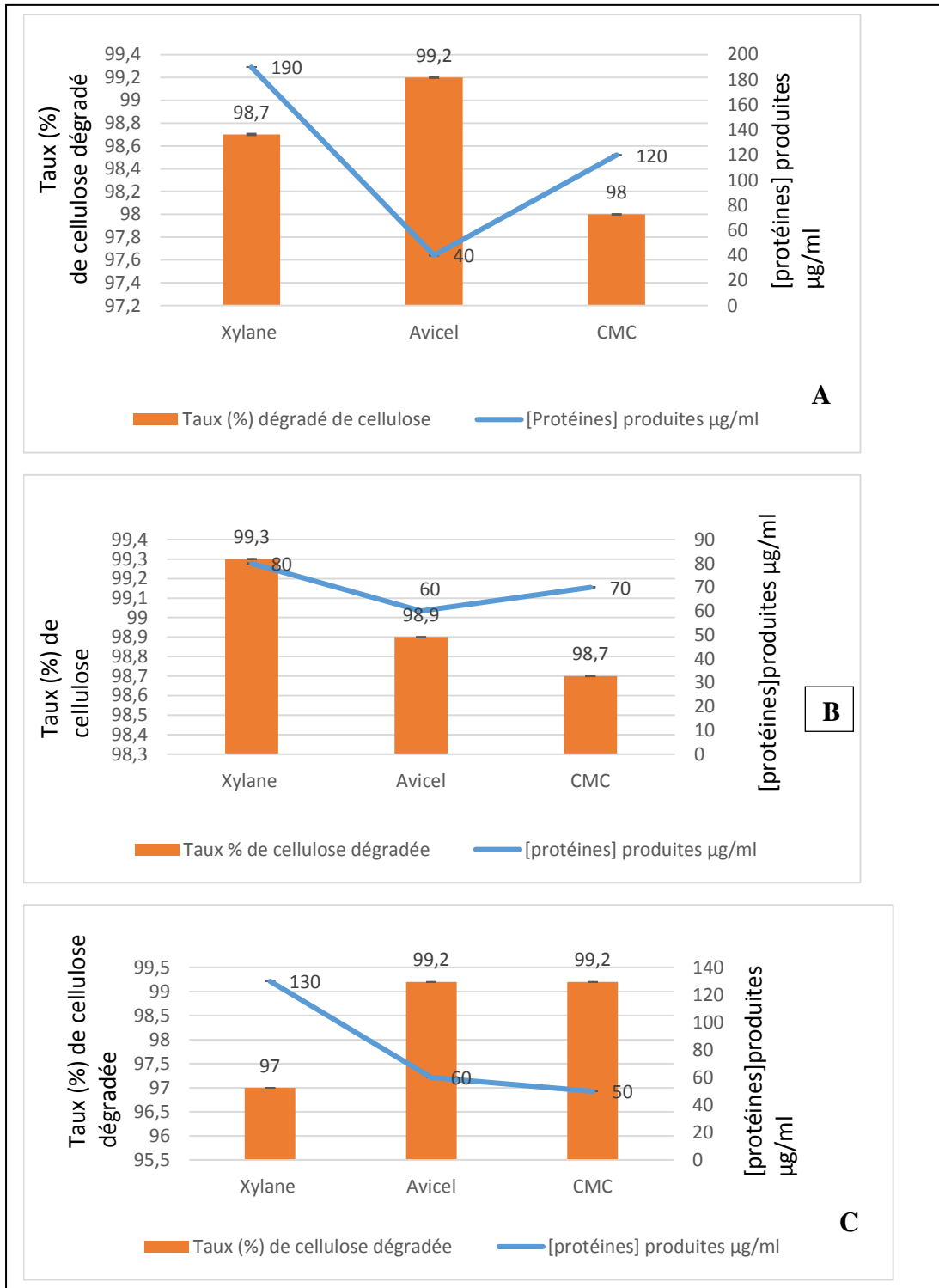


Figure 31 : Activité cellulolytiques d'*Aspergillus niger*.(A) ; *Penicillium sp* (B) ; *Trichoderma reesei*(C) sur trois substrats témoins Xylane, Avicel et CMC.

Résultats et discussions

Dans les trois cas A, B et C on remarque une dégradation dépassant les 90% des dérivés de cellulose (Xylane, Avicel et CMC dont la concentration initiales été de 10g/l, accompagnée d'une production de protéines ($\mu\text{g/ml}$) qui représenterait les enzymes celluloliques nécessaire à la bioconversion ou la dépolymérisation de la cellulose en sucres plus simples.

Pour les résultats de la bioconversion des dérivés (CMC ; avicel et xylane) obtenus par *A.niger*, on remarque que la meilleure activité de biodégradation indiqué par le taux maximal pour le substrat composé d'avicel qui est de 99,2% et qui correspond à la plus basse production en protéines $40 \pm 0 \mu\text{g/ml}$; cette meilleure activité de biodégradation sans une activité enzymatique importante est probablement dû à la composition chimique simple de ce polymère. La biodégradation des deux autres dérivés (CMC et xylane) est moindre que celle effectué sur l'avicel, car elle (la biodégradation) nécessite une production importante en protéines (enzymes celluloliques) vu la polymérisation élevée de ces deux dérivés (figures : 5, 6 et 7)

Pour *Penicillium sp* la meilleure biodégradation des dérivés de cellulose a été obtenu dans le substrat composé de xylane , même s'il est le plus polymérisé par rapport à l'avicel et à la CMC (figures 5 et 7) avec une meilleure production protéiques (enzymes xylanases).

Concernant *T.reesei*, on a enregistré de meilleurs taux de biodégradation et de moindres concentrations en protéines produites ($\mu\text{g/ml}$) par rapport aux deux premières souches sauf dans le cas du xylane où les taux de sa dégradation sont plus élevés

D'après (BARNOUD, 1980; VIDAUD, 1984) la sensibilité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique dépend étroitement de l'état du substrat, et du degré de polymérisation qui varie selon les sources donc la différence de biodégradation au niveau des dérivés, par la même souche, est expliqué par ce degré de polymérisation, d'une sorte que plus le dérivé est polymérisé, de plus on aura une faible biodégradation avec une production protéique élevée.

Ces trois souches présentent une activité cellulolytique considérable, mais d'après ces résultats on peut dire que c'est *T.reesei* qui qu'a le potentiel de biodégradation le plus élevé. Le genre *Trichoderma* est connu parmi les souches fongiques les plus cellulolytiques (PETERSSON *et al*, 1981 ; KUBICEK, 1998) par leur capacité à produire au moins 2 exoglucanases (SHOEMAKER *et al*, 1983 ; CHEN *et al*, 1987), 5 endoglucanases (PENTILLA *et al*, 1987) et 2 β -glucosidases (BARNETT *et al*, 1991 ; TAKASHIMA *et al*, 1999 ; NOGAWA *et al*, 2001).

III.1.3. Fermentation sur milieu solide (sur le grignon d'olives)

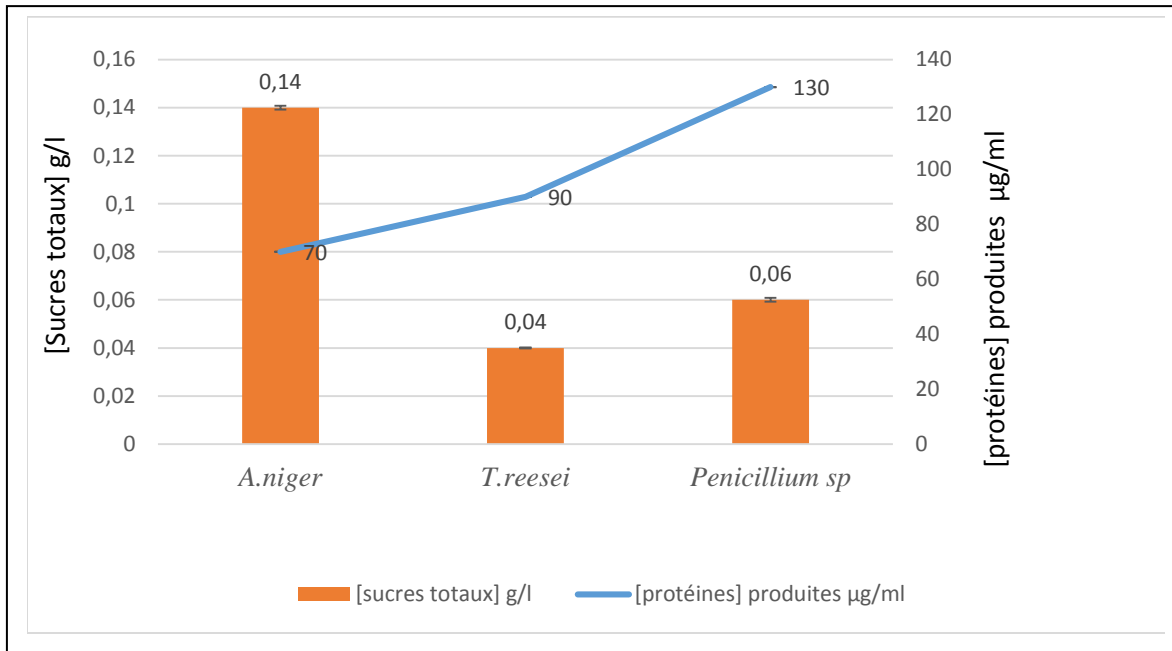


Figure 32 : Concentrations des sucres totaux dégradés et protéines produites après culture des trois souches de champignons sur le grignon d'olives.

Ne connaissant pas les concentrations initiales en cellulose du grignon d'olives on ne peut prendre en considération que les protéines où les enzymes cellulasiques produites nécessaire à la libération et la bioconversion de la cellulose incrustée dans la ligno-cellulose.

Parmi ces trois souches c'est *penicillium sp.* qui a produit le plus d'enzymes, ce qui fait d'elle la souche la plus performante à la dégradation du grignon d'olives. La cellulose étant incrustée dans la ligno-cellulose nécessite un arsenal enzymatique pour sa dégradation, selon (BARNOUD, 1980; VIDAUD, 1984) sa (cellulose) non sensibilité à l'hydrolyse est due à son incrustation par les polymères non cellulosiques tels que la lignine à laquelle la cellulose est généralement liée. *Penicillium* a produit la même quantité d'enzyme nécessaire à la dégradation de 9,87g/l de CMC, probablement si on augmenterait la durée d'incubation la dégradation serait plus importante et aussi si on additionne d'autres sources de carbone (CMC+ grignon d'olives) le rendement de production en enzymes s'améliorerait.

III.2. Fermentation de l'hydrolysats du grignon d'olives par les levures (*C.curvatus* et *Y.lipolytica*)

- Les concentrations en sucre de départ des deux hydrolysats :

-A 30°C : 0,05 ±0 g/l

-A 100°C : 0,198 ±0,005 g/l

D'après ces résultats, la concentration en sucre est meilleure pour l'hydrolysats de 100°C.

Tableau XI : Le taux de sucres totaux dégradés (%) et les concentrations en protéines produites (µg/ml). après culture de *C.curvatus* et de *Y.lipolytica*.

Souches	Type d'hydrolysats	Taux (%) de sucres totaux dégradé	[protéines] µg/ml produites
<i>C.curvatus</i>	A 30°C	66% ±0	20 ±0
	A 100°C	75%±0,002	30 ±0
<i>Y.lipolytica</i>	A 30°C	60% ±0	7 ±0
	A 100°C	64% ±0	10 ±0

Le taux de sucres totaux dégradés et des protéines produites obtenus par *C.curvatus* sont meilleurs que ceux enregistrés par *Y.lipolytica*.

Pour l'activité enzymatique (cellulasiques) des levures restent faible malgré la présence d'une dégradation, d'après (SCRIBAN, 1999) chez les levures, les genres pouvant présenter une activité cellulasique, sont beaucoup plus rares, néanmoins on peut citer le genre *Trichosporon*.

Conclusion

Ce travail a pour objectif de déterminer les souches fongiques ayant le potentiel de biodégradation des substrats phénoliques (toxiques) par leur capacité à synthétiser des complexes enzymatiques, nécessaire à cette dégradation (minéralisation) ; et d'autres souches capables de produire des enzymes cellulolytiques qui permettraient de bioconvertir les sucres polymérisés du grignon d'olives et du lactosérum dé-protéiné, en d'autres sucres plus simples et fermentescibles susceptible de produire du biocarburant.

Les tests de biodégradation du phénol, par deux levures oléagineuses, *Y.lipolytica* et *C.curvatus*, ont révélés que *Y.lipolytica* a une meilleure aptitude à dégrader le phénol, par rapport à *C.curvatus* et cette aptitude augmente en fonction des concentrations du substrat phénolique et cela pour les deux souches. L'adaptation de ces deux souches au substrat phénolique, a rendue *C.curvatus* plus efficace, avec un taux de dégradation de 97% après 72h d'incubation, au niveau du substrat phénolique concentré à 100mg/l. Pour la concentration de 800mg/l on constate l'effet inhibiteur du phénol, sur la croissance de la biomasse. On peut donc dire que *C.curvatus* est une souche apte à dégradé des eaux polluées contenant le phénol à des concentrations allant de 100 à 400 mg/l.

On a aussi pu mettre en évidence l'intérêt de *Y.lipolytica* dans la bioconversion du lactosérum dé-protéiné, avec un rendement en produits lipidiques égal à 1,3µg/360mg de MS.

Aspergillus niger, *Trichoderma reesei* et *Pencillium sp* ; ces souches montrent, une importante activité cellulolytiques, pour une dégradation presque complète des dérivés de cellulose (Xylane, CMC et avicel) et qui varie selon leurs degrés de polymérisations; pour le grignon d'olive, on note que la meilleure production en enzymes cellulasiques est par *Pencillium sp* pour une concentration de 130µg/ml ; à l'estimation visuelle du développement mycélien on note qu'il est positif, par l'envahissement du substrat et cela pour les trois souches utilisées, et pour améliorer leur rendement cellulolytiques pourquoi ne pas prévoir d'allonger la durée d'incubation et aussi une Co-culture, afin d'avantager le phénomène de synergie entre ces champignons ayant les mêmes activités sur les substrats qui est de les dégradés en se développant.

Conclusion

Ces cinq souches fongiques, de collection du LABAB, UMMTO, présentent toutes des activités d'intérêt biotechnologiques souhaitaient évaluer, et qui varient selon le type de substrat utilisé ; elles pourront donc être employées, dans des procédés biotechnologiques et faire objet d'études plus approfondies.

Ces sous-produits d'industrie agro-alimentaire, peuvent être considérés comme des produits de matière première, par leurs richesses en substances organiques et de par leurs métabolites produits après biotransformation ou bioconversion. La dépollution des eaux contaminées, par des substances toxiques (tel le phénol) peut être révolutionnée et cela grâce aux procédés de biodégradation, qui consiste en la minéralisation de ces substances toxiques, par des souches microbienne performantes.

Les procédés biotechnologiques, de biotransformation et biodégradation, sont une solution clef pour les problèmes de pollution engendrés par les industriels ; et surtout une nouvelle source de production énergétique, biocarburant, moins couteuses et plus rentables ; et qui libèrera l'univers de tout ce que l'Homme lui a causé.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

ACOURENE S. et TAIMA M. (2001). Utilisation des dattes de faible valeur marchande. (rebuts de deglet-nour, tinissine et tantboucht) comme substrat pour la fabrication de la levure boulangère. *Revue. Energie.Ren. : production et valorisation–biomasse.* 12 : 1-10.

AGARRY S. E., DUROJAIYE A. O., SOLOMON B.O. (2008). Microbial degradation of phenols: A review. *Int. J. Environ. Pollut.* 32, 12–28.

AILE., ADEME., SOLAGRO., TRAME., ANGERS 011 (2006). ADEME Editions Référence ADEME 7194 ISBN 978 - 2-35838 – 063 – 8 « *La méthanisation à la ferme* », 2p. & 16p. alginate- SiO₂ hybrid gel: stability and preliminary applications in the removal of aqueous AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS and o-chlorophenol from aqueous solutions on to chitosan-calcium alginate blended beads.

ANDRIEU J., DEMARQUILLY C., WEG A., ITRE E. (1981). Tables de prévision de la valeur alimentaire des fourrages. XI^e Journées du Grenier de Theix, in : Prévision de la valeur nutritive des aliments des ruminants, Ed. LN.R.A. Publications, 343-591.

ANNADURAI G., BALAN M. S. and MURUGESAN T. (2000). Design of experiments in the biodegradation of phenol using immobilized *Pseudomonas pictorium* (NICM – 2077) on activated carbon. *Bioprocess Engineering.* 22; 101-107.

ANONYME (1986). Norme AFNOR T90-204. Essai des eaux : effluents aqueuse des raffineries de pétrole-dosage du phénol, Paris. 464-467.

ANONYME (1999). MADRMP/DE (Ministère de l'Agriculture, du Développement rural et des Pêches maritimes, Direction de l'Élevage, Rabat). Secteur avicole au Maroc : Situation et perspective. *Revue. Ecologie.* 161: 34-45.

Références bibliographiques

ANONYME (2003). Etat des lieux et perspectives du recyclage des déchets issus du traitement des plumes et duvets en France. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Direction Industrie, P : 16-26.

ARAI T., MATSUOKA S., CHO H. Y., YUKAWA H., INNUI M., WONG S. L., DOI R. H. (2007). Synthesis of Clostridium cellulovorans minicellulosomes by intercellular complementation. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 104: 1456 – 1460.

ASSAMOI A., DESTAIN J., THONART P. (2008). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*.

ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. Standard ATSDR.1989. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR BROMODICHLOROMETHANE Agency for Toxic Substances and Disease Registry U.S. Public Health Service In collaboration with: U.S. Environmental Protection Agency (EPA).

B

BAI J., WEN J.P., LI H. M. and JIANG Y. (2007). Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and m-cresol using *Alcaligenes faecalis*. Process Biochemistry 42 510-517.

BAKRI Y., JACQUES P. & THONART P. (2003). Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solidstate fermentation. Application. Biochimie. Biotechnologie. 108, 737-748.

BARNOUD F. (1980). La cellulose dans (les polymères végétaux), J. ed par Monties, publication Gauthier-Villars. Paris. p : 66-68.

BARNETT C.C., BERKA R.M., FOWLER T. (1991). Cloning and amplification of the gene encoding an extra cellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. Bio/Technology.9 p: 562-567.

Références bibliographiques

BASSOLS J., BONET S., BELGHAZI M., DACHEUX F., DACHEUX J.L. (2007). Proteomic study of the establishment of boar epididymal cell cultures. *Theriogenology*. 68(1): 76-86.

BAYER E.A., CHANZY H., LAMED R., SHOHAM Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes . *Biol*.8: 548–557.

BCERC COTC Fact Sheet – Phenols, www.bcerc.org/cotc (2007).htm.

Bellon-Maurel V., Orliac O. & Christen P. (2003). Sensors and measurements in solid-state fermentation: a review. *Process Biochemical*. 38, 881-896.

BEN SAID S., LOMET D., CHESNEAU D., LARDIC L., CANEPA S., GUILLAUME D., BRIANT C., FABRE-NYS C., CARATY A. (2007). Differential estradiol requirement for the inductions of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. *Biological. Reproduction*. 76:673-80.

BENZAKOUR M., SAISSI R., Didier G. (2003). Situation actuelle et évolution de la gestion des déchets solides au Maroc/Expérience pilote de la mise en place d'une décharge contrôlée à Essaouira. 3 p.

BERNILLON S. (2005). Stratégie d'étude de produits de l'oxydation de polyphénols par LC/MS : application au jus de pomme. Thèse de doctorat. N° 3069, Université de Rennes I.

BEVILAQUA J.V., CAMMAROTA M.C., FREIRE D.M.G. and SANT'ANNA J.R. G. L. (2002). Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19, 151-158. *Biochemistry* 40, 1233-1239. *Biotechnology and Bioengineering*, 48, 585-591.

Références bibliographiques

BLASCO H., LALMANACH G., GODAT E., MAUREL M.C., CANEPA S., BELGHAZI M., PAINAUD G., DEGENNE D., CHATELUT E., CARTRON G., Le GUELLEC C. (2007). Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum. *J Immunol Methods*. 325(1-2): 127-39.

BOUCHERBA N. (2014). Valorisation des résidus agro-industriels: 2-8.

BOUDJEMA K. (2008). Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum pat *stréptococcus thermophilus*.

BOULAL A., BENALI B., MOULAI M. et TOUZI A. (2010). Transformation des déchets de dattes de la région d'Adrar en bioéthanol. *Revue des énergies renouvelables* 13 (3) : 455-463.

BRAMAUD C. (1995). Optimisation d'un procédé de fractionnement des protéines du lactosérum incluant une précipitation sélective et une séparation par centrifugation ou par membrane, 163p, Thèse de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, n°2190.

BRETAGNE A. et CHAUVIN M. (2003). La réglementation française sur la valorisation agronomique des déchets organiques.

BUSC G., BERARDINELLI S., RESINI C., ARRIGHI L. (2008). Technologies for the removal of phenol from fluid streams

C

CAGLIERO C., MAUREL M.C., CLOECKAERTI A., PAYOT S. (2007). Regulation of the expression of the CmeABC efflux pump in *Campylobacter jejuni*: identification of a point

Références bibliographiques

mutation abolishing the binding of the CmeR repressor in an in vitro-selected multidrug-resistant mutant. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 Feb; 267(1):89-94.

CAI W., LI J. and ZHEN Z. (2007). The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. *J. Hazard. Mater.*, 148, 3842.

CHAILLOU S., COMBRISSE J., (2015). « BIODÉPOLLUTION », *Encyclopædia Universalis* [en ligne], consulté le 27 septembre 2015. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/biodepollution/>

CHANG P., SCIBELLI G. E. (1982). Use of heat coagulated whey protein concentrate as a substitute for gelled egg white. *US Pat.* 4, 362, 761.

CHAVEZ R., BULL P. & EY ZAGUIRRE J. (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *J. Biotechnol.*, 1(2), 64-66.

CHEN C.M., GRITZALI M., STAFFORD D.W. (1987). Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology*.5 p:274-278.

CHEN K. C., LIN Y.H., CHEN W.H. and LIU Y.C. (2002). Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. *Enzym. Microb. Technol.*, 31, 490-497.

CHEROT S. (2007). Rôle de la réaction de maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides. Thèse de doctorat. *F75141 Paris*.

Chimiques. CRC/CL/0011-F version 1.0. SPF Emploi, crc@meta.fgov.be.

COCHET E., LABAS V., DACHEUX J.L. (2007). Optimisation de la cartographie peptidique par addition d'éther couronne 18-C-6. 20ème colloque Biotechnocentre, 25-26 octobre 2007, Domaine de Seillac. Poster.

Références bibliographiques

COLLINS T., GERDAY C. & FELLER G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29, 3-23. Concertation Sociale, Contrôle du Bien-être au Travail, Division du contrôle des risques Contaminated Drinking Water.

CRECCCHIO C., RUGGIERO P. and PIZZIGALLO M.D.R. (1993). Polyphenoloxidasas Immobilized d'évaluation : Phénol. Publ. No de cat. En40-215/45F.

D

DECKER H. and TERWILLIGER N. (2000). Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology* 203, 1777-1782.

DELBEKE R. (1975). La déminéralisation par électrodialyse du lactosérum doux de fromagerie, *Lait*. 541(542), 76-94

DEMARQUILLY C., JARR R. (1981). Panorama des méthodes de prévision de la digestibilité et de la valeur énergétique des fourrages. XI^e Journées du Grenier de Theix, in : Prévision de la valeur nutritive des aliments des ruminants. Ed. LN.R.A. Publications, 41-59.

DENESVRE C., BLONDEAU C., LEMESLE M., Le Vern Y., VAUTHEROT D., ROIGEARD P., VAUTHEROT J.F. (2007). Morphogenesis of a highly replicative.

DOBBINS D. C. THORTON-MANNING J. R., JONES D. D. and FEDERIE T. W. (1987). Mineralization potential for phenol in subsurface soils. *J. Environ. Qual.* V. 16, pp.54-58.

DOI R.H., TAMARU Y. (2001). The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: An enzyme complex with plant cell wall degrading activity. *Chem* .1: 24-32.

Références bibliographiques

DURAND A. (2003). Bioreactor designs for solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13, 113-125.

E

EDWARD L. BAKER M. D. PHILIP J. LANDRIGAN M.D. (1978). Phenol Poisoning Due to Elctrodialysis, ECCE2, 2nd European Congres of Chemical Engineering, Montpellier, 1999, n°091150070.

ELJALIL M. H. (2000). Procédé biotechnologique pour le traitement et le recyclage des fientes de volaille et essai de valorisation dans l'alimentation de la poule pondeuse. Thèse de Doctorat National, Faculté des sciences, Université Ibn Tofaïl, Kénitra, Maroc.

Environnement et Santé Canada (2000). Liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport Erhan, E; Keskinler, B; Akay, G; Algur, O.F. 2002. Removal of phenol from water bymembrane-immobilized enzymes. *Journal of Membrane Science* 206, 361-373.77.

F

FAUQUANT J., (1985). Clarification des lactosérums doux par agrégation thermocalcique de la matière grasse résiduelle, *Lait*, 65, 1-20

FENOLL L.G. RODRIGUEZ-LOPEZ J.N. GARCIA-MOLINA F. GARCIA-CANIVAS F., TUDELA J., MICHAELIS (2002). Constants of mushroom tyrosinase with respect to oxygen in the presence of monophenols and diphenols.. *The international Journal of Biochemistry and Cellbiology.* 34, 332-336.

FEVRIER C. (1977). Lactosérum et sous-produits laitiers dans l'alimentation du porc, *Inst. Tech. Porc.*, 1977, série I.

Références bibliographiques

FIEDURCK J. et SZCZODRAK J. (1994). ‘*Selection of Strain, Culture Conditions for Optimum Production of β galactosidase from *K. fragilis**’, *Art.Microbiologica Polonica*, Vol. 3, n°1, pp. 57-65.

FOX P. F. (1989). *Developments in dairy industry*, New York: Elsevier Applied Sciences.

G

GALLARDO K., FIRNHABER C., ZUBER H., HERICHER D., BELGHAZI M., HENRY C., KUSTER H., THOMPSON R. (2007). A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds: evidence for metabolic specialization of maternal and filial tissues. *Mol Cell Proteomics*. 6(12):2165-79.

GARNIER M., RIOU M., GUEGNARD F., Le VERN Y., KOCH C., KERBOEUF D. (2007). Implication des P-glycoprotéines et des microdomaines lipidiques dans la résistance aux antiparasitaires. Forum de l'Ecole Doctorale "Santé, Sciences et Technologies". Tours (FRA), Université F. Rabelais Tours: 1 p. Session : Science du vivant - Communication courte orale.

GARRY S. E., DUROJAIYE A.O. and SOLOMON B.O. (2008). Microbial degradation of phenols: a review. *Int J. Environ Pollut*. 32:12–28.

GAUTRON J., MURAYAMA E., VIGUAL A., MORISSON M., MCKEE MD., REHAULT S., LABAS V., BELGHAZI M., VIDAL M.L., NYS Y., HINCKE M.T. (2007). Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins (LBP) bactericidal permeability-increasing proteins (BPI), and plunc family proteins. *J Biol Chem*.282(8):5273-86.

Références bibliographiques

GERRARD A. M., JUNIOR J. P., KOSTECKOVA A., PACA J., STIBOROVA M. et SOCCOL C.R. (2006). Simple models for the continuous aerobic biodegradation of phenol in a packed bed reactor. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49, 669–676.

GUILLOU B. F. (2007). Transferrin overexpression alters testicular function in aged mice. *Mol Reprod Dev.* 74(2):197-206.

H

Health and Safety Guide No. 88. 1994. PHENOL HEALTH AND SAFETY GUIDE.

HORCH R., SPILKER G. and STARK G.B. (1994). Phenol burns and intoxications. 45-50.

HORN C., Phénol, www2.gtz.de/uvp/publika/French/Vol363 (1989).htm. *Cadre réglementaire et juridique des activités agricoles de méthanisation et de compostage ; guide pratique* ADEME, mai 2009, 73 p.

I

IKEHATA K., NICELL J.A. (2000). Characterization of tyrosinase for the aqueous phenols. *Bioresource Technology* 74, 191-199. Immobilise sur du charbon actif en grains. Thèse de Doctorat, ENP El Harrach, Alger.in *Organic Gels: Properties and Applications in the Detoxification of Aromatic Compounds.*

IPCS-INCHEM. ISBN 92 4 151088 9 -ISSN 0259-7268.

K

Références bibliographiques

KADEMI A. ISMAILI-ALAOUI M. et HOUDE A. (2003). Des arômes synthétiques...au naturel. Centre de Recherche et de Développement sur les aliments Saint Hyacinthe, Québec.

KHAN A.A., HUSAIN Q. (2007). Decolorization and removal of textile and non-textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent by using potato (*Solanum tuberosum*) soluble and immobilized polyphenoloxidase. *Bioresource Technology* 98, 1012–1019.

KUBICEK C. P., and PENTTILA M. E. (1998). Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In G. E. Harman and C. P. Kubicek (2 ed), p: 49-72.

KULKARNI N. SHENDYE A. & RAO M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 411-456.

L

LAURENT S., BLONDEAU C., BELGHAZI M., REMY S., ESNAULT E., RASSCHAERT P., RASSCHAERT D. (2007). Sequential autoprocessing of Marek's disease herpesvirus protease differs from that of other herpesviruses. *J. Virol.* 81(11) : 6117-21.

LECUREUIL C., STAUB C., FOUCHECOURT S., MAUREL M. C., FONTAINE I., MARTINAT N., GAUTHIER C., DAUDIGNON A., DELALEU B., SOW A., JEGOU, LINDEN G., LORIENT D. (1994). *Biochimie, agro-industrie : valorisation alimentaire de la production agricole*, paris, 392p.

LIKA K. and PAPADAKIS I. A. (2009). Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. *J. Sea Res.* 62, 135–146.

Références bibliographiques

Liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport d'évaluation : Phénol. Publ. No de cat. En40-215/45F. ISBN 0-662-84220-0.

LOFFHAGEN N., HÄRTIG C. and BABEL W. (1995). Fatty acid pattern of *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V indicate sensitivity against xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 526-531.

LUQUET F. M. BOUDIER J. F., VINCENT P. (1980). Note à propos du vieillissement des poudres de lait. Ses manifestations, ses conséquences. 60 (595 596), pp.295-297.

M

MATHOT P. (1996). Modélisation d'un réacteur simplifié pour la fermentation solide de produits et sous-produits agricoles. Valorisation de l'aliment fermenté par le porc. Thèse de doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).

Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, 2012.

MORR C.V. (1976). Whey protein concentrates: an update, *Food Technol.* 30(3), 18-19.

MORTIER M., VANSINA P., GIELENS B. (2004). Phénol. Check-list, SPF Emploi, Travail et MADRMP/DE (Ministère de l'Agriculture, du Développement rural et des Pêches maritimes, Direction de l'Élevage, Rabat) - Secteur avicole au Maroc : Situation et perspective. - *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, N° 161 (1999) 34.

MOULIN G., RATOMAHENINA R., GALZY P., Mille BOZE. (1976). Sélection de levure en vue de la culture sur lactosérum. *Le lait* ; 56 (553 554), pp.135-142. (hal-00928721).

N

Références bibliographiques

NADAVALA S.K., SWAYAMAPUKLA K., BODDU V., ABBURI M. (2009). Biosorption of phenol and o-chlorophenol

NAIR C.I., JAYACHANDRAN K. and SHANKAR S. (2008). Biodegradation of phenol. African Journal of Biotechnology 7 (25), 4951-4958.

NAMANE A. (2006). Adsorption- biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa*. Isolé sur du charbon actif en grains.

NOGAWA M., GOTO M., OKADA H., and MORIKAWA Y. (2001). L-Sorbose induces cellulose gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. Curr. Genet. 38. p:329-334.

NUHOGLU A., YALCIN B. (2005). Modelling of phenol removal in a batch reactor process on siliceous supports. Water Research 37, 436-440.

O

OBOIRIEN B.O., AMIGON B., OJUMU T.V., OGUNKUNLE O. A., ADETUNJI O. A., BETIKU E. and SOLOMON B. O. (2005). Substrate inhibition kinetics of phenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. Biotechnology, 4, (1), 5661.

OPTIMISATION ET MODELE DE PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* SUR LACTOSERUM

Références bibliographiques

ORACZ K., BOUTEAU HEL-M., FARRANT J.M., COOPER K., BELGHAZI M., JOB C., JOB D. (2007). Corbineau F., Bailly C. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormanc alleviation. *Plant J.* 50(3): 452-65.

P

PENTILLA M.E., ANDRE E.L., SALOHEIMO M., LEHTOVAARA P., KNOWLES J.K. (1987). Expression of two *Trichoderma reesei* endo-glucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 3 p:175-785.

PETTERSON G., FARGER S.L., BHIKHABHAI R., LEANDOER K. (1981). In the Ekman-Days. International Symposium on wood and pulping Chemistry, SCPI, Stockholm, 111. p: 39.

Phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *Journal of Hazardous Phenol in wastewater by a thermostable β -tyrosinase. Enzyme and Microbial Technology.*
Phenol with the Use of Tyrosinase of Fungi. *Journal of Water Chemistry and Technology*, 31,
Phenol. *J Chem Technol Biotechnol* 10, 2086-2089.

PICHARD. A. (2005). Phénol. Fiche de données toxicologiques et environnementales des Phénols et Quinones. Cours de chimie générale et organique - G. Dupuis – Lycée.

PIERRE A. & FAUQUANT J. (1986). Principes pour un procédé industriel de fractionnement des protéines du lactosérum. *Lait* 66, 405-419

R

RAPPORT D'ETUDE N° 06 DR 058. 2008. Seuils de toxicité aigue (phenol). INERISDRC-RISK ASSESSMENT. 2002. Phénol. CAS-No.: 108-95-2 .EINECS-No.: 203-632-7.

Références bibliographiques

RIGO E. NINOW J.L. LICCIO M. OLIVEIRA J.V., POLLONI A.E., REMONATTO D., ARBTER F., VARDANEGA R., OLIVEIRA D. et TREICHEL H. (2010). Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *Food Sci. Techn.* 43:1132-1137.

RODAKIEWICZ N. (2000). Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media. *Topics in Catalysis* 11/12, 419-434.

S

SCRIBAN R. (1999). *Biotechnologie*. p :149-156-157. 5^{ème} édition. Technique et documentation -Lavoisier (éd.).

SEETHARAM G.B. SAVILLE B.A. (2003). Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Research* 37, 436-440.

SHAO J. GE H. and YANG Y. (2007). Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-SiO₂ gel for removal of aqueous phenol.

SHIMP R. J. et PFAENDER F.K. (1987). 'Effect of Adaptation to Phenol on Biodegradation of Monosubstituted Phenols by Aquatic Microbial Communities', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, N°7, pp. 1496 – 1499.

SHOEMAKER S., SCHWEICKART V., LADNER M., GELFAND D., KWOK S., MYAMLO K., INNIS M. (1983) .Molecular cloning of exo-cemllobiohydrolase derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *bio/ Technology*. 1.p: 691-695.

SHOURIAN M., NOGHABI K A., ZAHIRI H S., BAGHERI T., KARBALLAEI G., MOLLAEI M., RAD I., AHADI S., RAHEB J. and ABBASI H. (2009). Efficient phenol degradation by a newly characterized *Pseudomonas* sp. SA01 isolated from pharmaceutical

Références bibliographiques

wastewaters. *Desalination*, 246, 577594 SiO₂ gel for removal of aqueous phenol. *Biotechnol Lett.* 29:901-905.

SIKKEMA J., BONT J.A.M. and POOLMAN B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Biol. Chem.*, 269, 8022-8028.

SOTTIEZ P. (1985). Produits dérivés de fabrication fromagères dans_: Laites et produits laitiers, tome 2/éd. Luquet Paris : Lavoisier, (Collection Tech. et Doc.) substances chimiques. INERIS–DRC-01-25590-01DR021. N°2-1.

STOILOVA I., KRASTANOV A., YANAKIEVA I., KRATCHANOVA M. et YEMENDJIEY H. (2007). Biodegradation of mixed phenolic compounds by *Aspergillus awamori* NRRL 3112. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 60, 342–346.

T

TAKASHIMA S., NAKAMURA A., HIDAKA M., MASAKI H., and UOZUMI T.(1999). Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Hemicolla grisea* and *Trichoderma reesei*. *J. Biochem.* 125. p:728-736.

TAMARIT J., CABISCOL E. and ROS J. (1998). Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *Biol. Chem.*, 273, 3027-3032.

Thèse de Doctorat National, (2000). Traitement et le recyclage des fientes de volaille et essai de valorisation dans l'alimentation de la poule pondeuse. Faculté des sciences, Université Ibn Tofaïl, Kénitra, Maroc.

TOXICOLOGICAL PROFILE FOR PHENOL. (2008). ATSDR. Atlanta, Georgia 30333.

Références bibliographiques

TUAH P. M., NOOR A. A. R., SALLEH MADIHAH M.D. (2009). Degradation pathway of phenol through-cleavage by RETL-Cr1 *ortho Candida tropicalis*. *Borneo. Science*, 24, 1-8.

U

UI-HAQ I., IDREES S. et RAJOKA I. (2002). Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. *Proc. Bioch.* 37, 637–641.

V

VIDAUD C. (1984). Contribution à l'étude de l'introduction du système cellulosique de *Trichoderma* sp par utilisation d'analogie de substrat thiosaccharidique. Thèse de 3eme Cycle. Université de Grenoble.

VIOLLEAU V., AIMAR P., ALBET J., ARMAGNE O., MOLINIER J. (1975). Proteins valorisation by Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Wit J.N., Boer R., Procédés de clarification des liquides contenant des protéines de petit lait, Brevet Français. 76, 351–43.

W

WOO A. (2002). La grande diversité du lactosérum. Agriculture et agro-alimentaire, Canada, p3-13.

Références bibliographiques

Y

YAMADA, K., AKIBA Y., SHIBUYA K., KASHIWADA A., MATSUDA K. and HIRATA M. (2005). Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads.

Z

ZALL R. R. (1992). Source and composition of whey and permeate in: Whey and lactose processing/ed. by Zadow J.G., London: Elsevier Applied Science, 1-72.

ZAWISTOWSKI J., BILIADERIS C.G. and ESKIN N.A.M. (1991). Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science), 217-273.

Références bibliographiques

Sites internet

EGFPVP22 recombinant Marek's disease virus (MDV) in cell culture. *J. of Virology*. 81:12348-12359.

ETSC-N0. RAPPORT D'ETUDE N0 06DR058. 2008. Seuils de toxicité aigue (phenol). INERISDRC-

ETSC-N0470218-05DR058.

ETSC-N0470218-05DR058470218-05DR058

http://212.43.237.181/normalisation/Fiche.aspx?chapitre_id=7&fiche_id=62 [1]

http://91.121.55.183/pepra/mydms/pep_caprins/file_4e60d45aced07.pdf

<http://veilleagro.imist.ma/index.php/produits-et-machinisme/ingredients-et-nutrition/605-le-lactoserum-un-sous-produit-de-la-fabrication-du-fromage-a-forte-valeur-ajoutee#top>

<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/9/> , (03.02.08)

<http://www.milkingredients.ca/index-fra.php?id=195>

http://www.ordimip.com/files/Groupe-Organiques/07_Compostage-Methanisation-quel-projet.pdf.pdf

http://www.ordimip.com/files/Groupe-Organiques/07_Compostage-Methanisation-quel-projet.pdf.pdf

https://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9chet_inerte [2]

www.compostage.Info.fr [3]

www.ddaff.oise.agriculture.gouv.fr

www2.gtz.de/uvp/publika/French/Vol363 (1989). htm.

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture et des solutions utilisées

❖ Le milieu de culture PDA

- 100g de pomme de terre cuite dans 100ml d'eau distillée pendant 15min ; puis on l'essor dans une compresse ; et on obtient un filtrat.
- Au filtrat obtenu on ajoute dans une fiole jaugée : 10g de glucose et 10g d'agar ; on complète avec de l'eau distillée à 500ml ; on homogénéise et enfin on l'autoclave.

❖ L'eau physiologique stérile (pH=5)

- 9g de Chlorure de Sodium (NaCl) ;
- 1000ml d'eau distillée.

❖ Le milieu Mendel et Weber (MW) pour 1000ml d'eau distillée

- 0,3g d'urée ; 1,4g de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 2g de K_2HPO_4 ; 0,4g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1g de peptone ; 2ml de Tween 80 ; 5mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

❖ Le milieu MW liquide + dérivés de cellulose (xylane, CMC, C100, avicel)

- Pour un volume de 250ml on lui additionne 25g de l'un des sucres.

❖ Le milieu MW solide + dérivés de cellulose

- Composition du milieu de MW (1000ml) + 20g d'agar ; on le divise dans 4flacons de 250ml puis on leur additionne chacun 25g de l'un des dérivés de cellulose ; on l'homogénéise ; puis on l'autoclave. Au moment de l'utilisation on lui additionne environs 2 ml du rouge Congo pour mettre en évidence de l'activité cellulolytique des champignons.

❖ **Solution de Tween 1% stérile pour le prélèvement des spores**

- 500ml d'eau distillée ;
- 2ml de Tween.

❖ **Solution tampon de citrate (solution stock de pH=4,6)**

- 210g d'acide citrique monohydrate ;
- 750ml d'eau distillée ;
- 50 à 60g de NaOH (jusqu'à obtention d'un pH=4,6).

❖ **Solution de NaOH (4N) :**

- 16g de NaOH ;
- 100ml d'eau distillée.

❖ **Milieu minéral en trace :**

- 1mg de $MnCl_4 \cdot 4H_2O$;
- 0,6mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$;
- 2,6mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$;
- 6mg de $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$.

❖ **Réactifs utilisés pour le dosage du phénol :**

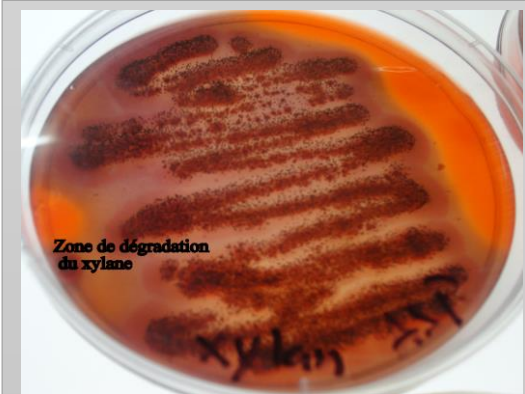


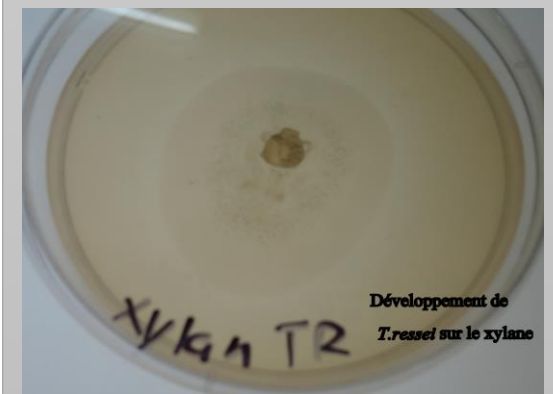
1. Solution stock de phénol 5% :
 - 5g de cristaux de phénol ;
 - 100ml d'eau distillée.
2. Solution 4-Anmino AntiPyrine (4-AAP) à 20g/l conservée à l'abri de la lumière, dans un flacon teinté.
3. Solution de ferricyanure de Potassium à 20g/l
4. Solution Tampon (pH=9,5) :
 - 4g de NH_4Cl ;
 - 200g de tartrate double de Na et K ;
 - 15 ml d'ammoniac concentré ;
 - Compléter à 1l et ajuster le pH à 9,5 au pH mètre avec du NH_3 concentré.

Annexes

Annexes II : Photographies des cultures de champignons et de levures (sur boîtes de Pétri et des monocultures en batch par SmF et SSF)

1. Les cultures sur boîtes de Pétri des trois champignons (Sur les 4 types de dérivés de cellulose additionné ou non de rouge de Congo)

-Après une semaine d'incubation à 28°C.

<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
 <p>Zone de dégradation du xylane</p>  <p>Développement de <i>A.niger</i> sur le xylane</p>	 <p>Zone de dégradation du xylane par <i>T.reesei</i></p>  <p>Développement de <i>T.reesei</i> sur le xylane</p>
<p>Xylane. <i>A.niger</i> est producteur de xylanases=>Décoloration du milieu de culture, il est donc dit xylanasiq.</p>	<p>Xylane. <i>T.reesei</i> est producteur de xylanases=> Formation d'un halo clair autour de la zone de formation du mycélium il est donc dit xylanasiq.</p>

Annexes



CMC : Développement d'*A.niger* indiqué par la décoloration du milieu de culture.

CMC : Développement de *T.reesei* par dégradation de la CMC indiqué par les zones claires autour du mycélium formé.



Avicel : Léger développement du mycélium d'*A.niger* sur l'avicel.

Avicel : Léger développement du mycélium de *T.reesei* sur l'avicel.

Annexes



C100 : L'*A.niger* ne dégrade pas vraiment la C100=> on ne remarque qu'un léger développement du mycélium.



C100 : *T.reesei* se développe faiblement sur ce milieu donc il ne dégrade pas vraiment la C100.

Penicillium.sp



Xylane : Développement de *P.sp* sur le xylane, traduit par la formation d'un halo clair autour de la zone de développement de son mycélium, il est donc dit xylanasiq.

Annexes



C100 : Léger développement du mycélium de *P.sp* sur la C100.

Avicel : Léger développement du mycélium de *P.sp* sur l'avicel.

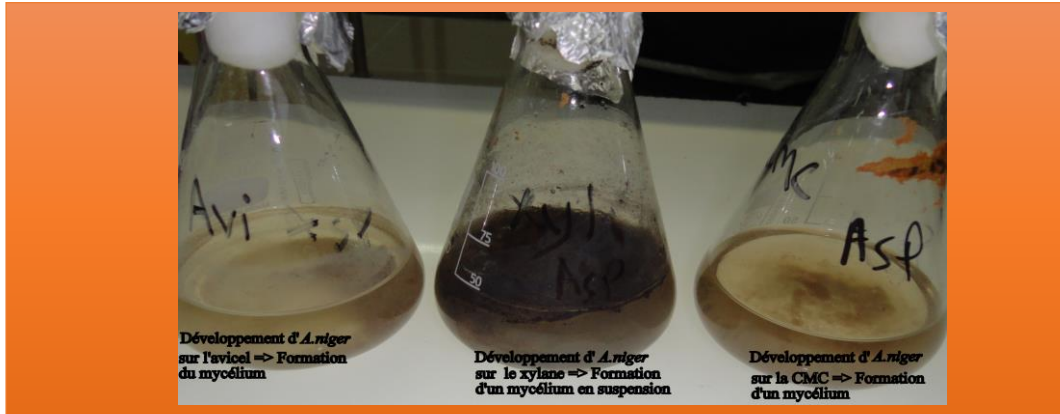


CMC : *P.sp* se développe en dégradant la CMC=> formation d'un mycélium cotonneux et décoloration du milieu dans cette zone.

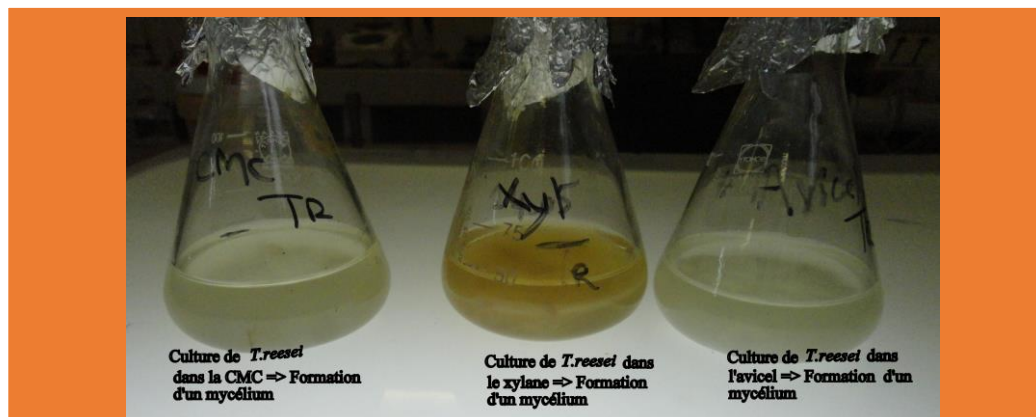
2. Les monocultures en batch par SmF :

- Après une semaine d'incubation à 28°C.

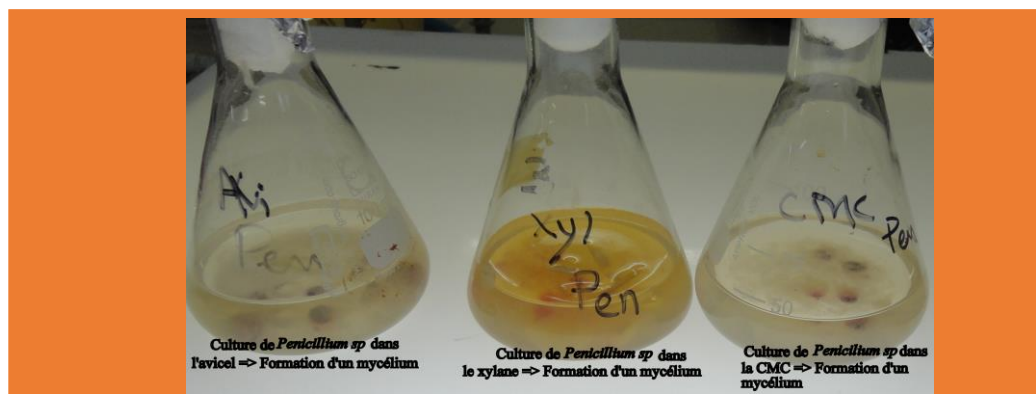
Aspergillus niger



Trichoderma reesei

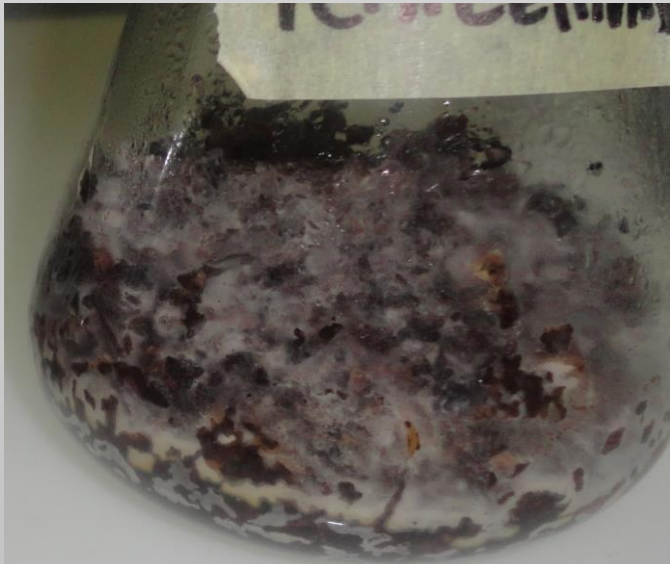


Penicillium sp

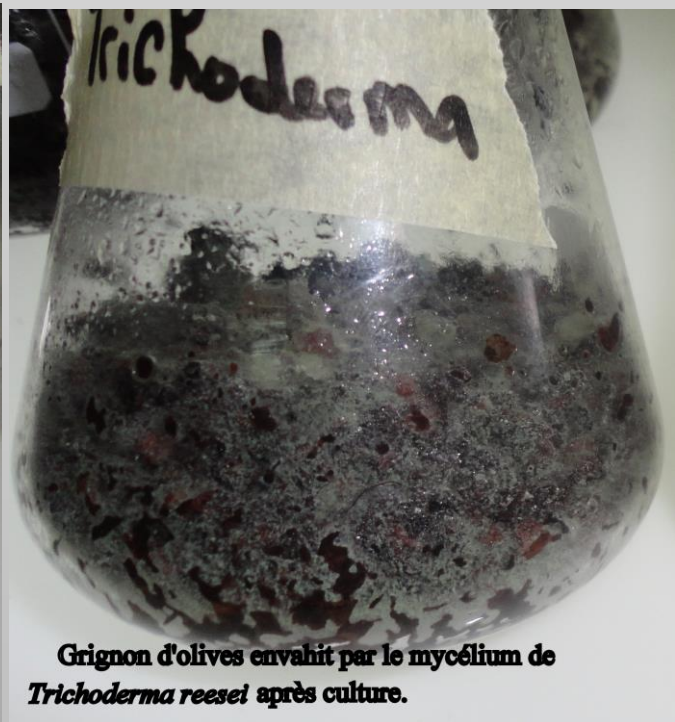


3. Les monocultures en batch par SSF :

- Après une semaine d'incubation à 28°C.



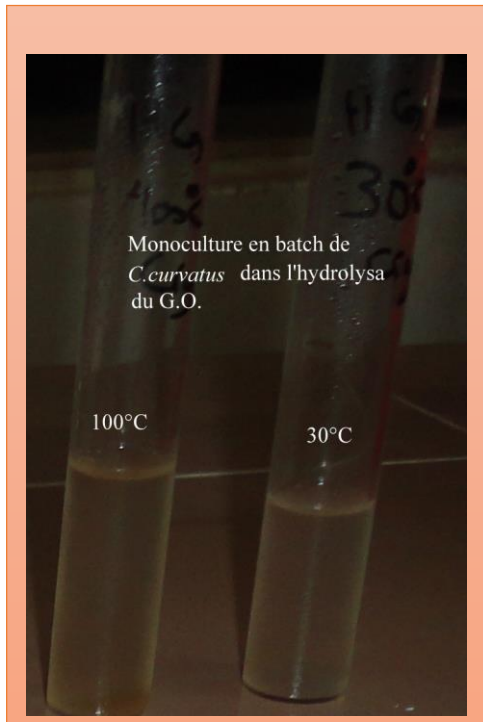
Grignon d'olives envahit par le mycélium de *Penicillium sp* après culture.



Grignon d'olives envahit par le mycélium de *Trichoderma reesei* après culture.



4. Monocultures en batch de *C.curvatus* et de *Y.lipolytica* dans l'hydrolysa du grignon d'olives (SmF)



Il y'a eu développement de *C.curvatus* dans les deux hydrolysas 30 et 100°C traduit par la présence de trouble.



Il y'a eu développement de *Y.lipolytica* dans les deux hydrolysas 30 et 100°C traduit par la présence de trouble.

Annexes

Annexes III : Tableaux des gammes étalon des courbes de dosage et de tous les résultats détaillés obtenus.

➤ Les gammes étalon

1. Gamme étalon du phénol et ses réactifs

N° du tube	1	2	3	4	5	6
Eau distillée (µl)	2000	1980	1960	1940	1920	1900
Phénol (µl)	0	20	40	60	80	100
DO obtenues à 510nm	0	0,120	0,255	0,372	0,498	0,624

2. Gamme étalon du dosage des sucres par le DNS

N° du tube	01	02	03	04	05	06
Solution de glucose (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillé (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Réactif DNS (ml)	2	2	2	2	2	2
DO obtenues à 530nm	0	0,337	0,761	1,171	1,379	1,623

Annexes

3. Gamme étalon pour le dosage colorimétrique de la BSA par la méthode de Bradford

4. N° du tube	1	2	3	4	5	6
[BSA mg/ml]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
V prélevé µl	0	20	40	60	80	100
E.distillée µl	100	80	60	40	20	0
D.O obtenus (595nm)		0,068				
1 ^{er} réactif de Bradford	0		0,1	0,136	0,19	0,24
D.O obtenus (595nm)		0,26				
2 ^{ème} réactif de Bradford	0		0,39	0,62	0,76	/

➤ Résultats obtenus

1. Biodégradation du phénol par les levures *C.curvatus* et *Y.lipolytica*

- 1^{er} essai cellules non adaptées au phénol :

[phénol] mg/l		100	200	300	400	Souches
Absorbance biomasse (620nm)	DO i	0,153	0,13	0,122	0,121	<i>C.curvatus</i>
	DO 48h	0,113	0,128	0,1	0,005	
Phénol dégradé après 48h	[phénol] mg/l	2,9 ±0,4	60,9 ±2,8	130,3±2	227,9±2,8	
	Taux %	2,9%	30,4%	43,3%	56,9%	
Absorbance biomasse (620nm)	DO i	0,085	0,096	0,074	0,078	<i>Y.lipolytica</i>
	DO 48h	0,05	0,041	0,03	0,029	
Phénol dégradé après 48h	[phénol] mg/l	8,5±1,2	73,8 ±0,4	153,7 ±1,2	242,8 ±0,8	
	Taux %	8,5%	36,9%	51,2%	60,7%	

Annexes

- 2ème essai cellules adaptées au phénol:

[phénol] mg/l		100	200	300	400	Souches
Absorbance biomasse (620nm)	DO i	0,096	0,111	0,107	0,112	<i>C. curvatus</i>
	DO 24h	0,05	0,069	0,046	0,016	
	DO 48h	0,42	0,308	0,302	0,27	
Phénol dégradé après 48h	[phénol] mg/l	10,9 ±0,4	68,9 ±1,2	120,2 ±0,8	213,4±0,4	
	Taux %	10,9%	34,4%	40%	53,3%	
Absorbance biomasse (620nm)	DO i	0,25	0,28	0,29	0,27	
	DO 24h	0,09	0,04	0,039	0,03	
	DO 48h	0,18	0,163	0,111	0,106	
Phénol dégradé après 48h	[phénol] mg/l	8,9 ±0,8	30,3 ±0,4	103,7 ±0,4	183,9 ±1,2	
	Taux %	8,9%	15,1%	34,5%	45,9%	

Annexes

• Cinétiques de biodégradation ; derniers résultats :

[phénol] mg/l		100	200	300	400	800	Souches	
Abs à 620nm	DO i	0,274	0,21	0,203	0,201	0,208	<i>C. curvatus</i>	
	DO 24h	0,286	0,234	0,197	0,194	0,188		
Phénol dégradé après 24h	[phénol] mg/l	76,6±0,8	97,8±0,4	89,9±1,6	6,7±0,4	77,5 ±0,8		
	Taux %	76,6%	48,9%	29,9%	1,6%	9,6%		
Abs à 620nm	DO 48h	0,217	0,21	0,172	0,275	0,262		
Phénol dégradé après 48h	[phénol] mg/l	96±0,8	109,8 ±0,4	227,9 ±0,8	202,8±0,8	502,1 ±1,2		
	Taux %	96%	54,9%	75,7%	50,7%	62,7%		
Abs à 620nm	DO 72h	0,259	0,21	0,188	0,181	0,1		
Phénol dégradé après 72h	[phénol] mg/l	97,2±0,4	135,5±0,4	233,9±0,4	222,4±1,2	638,1 ±0,8		
	Taux %	97,2%	67,7%	77,9%	55,6%	79,7%		
Absorbance à 620nm	DO i	0,116	0,092	0,066	0,068	0,108		<i>Y. lipolytica</i>
	DO 24h	0,112	0,104	0,15	0,121	0,103		
Phénol dégradé après 24h	[phénol] mg/l	8,6 ±0,4	30,4±0,4	59,9±0,4	70,5±0,8	55,9 ±0,8		
	Taux %	8,6%	15,2%	19,9%	17,6%	6,9%		
Abs à 620nm	DO 48h	0,125	0,107	0,096	0,087	0,08		
Phénol dégradé après 48h	[phénol] mg/l	11,4±0,4	55,3±0,4	61,5±0,4	78,9±0,4	76,7 ±0,8		
	Taux %	11,4%	27,6%	20,5%	19,7%	9,5%		
Abs à 620nm	DO 72h	0,109	0,073	0,07	0,067	0,063		
Phénol dégradé après 72h	[phénol] mg/l	26,7 ±1,2	77,4 ±0,8	81,9±0,8	90,1±0,4	157,7 ±0,8		
	Taux %	26,7%	38,7%	27,3%	22,5%	197,7%		

Annexes

2. Bioconversion du grignon d'olives

Résultats obtenus après dosage, correspondant concentrations dégradées et aux taux de cellulose dégradée ; et les moyennes en concentrations produites en protéines ($\mu\text{g/ml}$).

Substrats de culture	Type de dosage		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichoderma reesei</i>		<i>Penicillium sp</i>	
Pour le Xylane	[xylane]g/l dégradée	Taux %	9,87 $\pm 0,008$	98,7%	9,7 ± 0	97%	9,93 \pm 0,001	99,3%
	[xylanase] $\mu\text{g/ml}$ produites		190 ± 0		130 ± 0		80 ± 0	
Pour la CMC	[CMC] g/l	Taux %	9,8 $\pm 0,008$	98%	9,92 $\pm 0,0$ 01	3,5%	9,87 \pm 0,001	98,7%
	[protéines] $\mu\text{g/ml}$ produites		120 ± 0		50 ± 0		70 ± 0	
Pour l'Avicel	[Avicel] g/l résiduelle	Taux %	9,92 0,08 ± 0	99,2%	9,93 $\pm 0,001$	2,8%	9,89 \pm 0,001	98,9%
	[protéines] $\mu\text{g/ml}$ produites		40 ± 0		60 ± 0		60 ± 0	
Grignon d'olive	[sucres] g/l contenu dans le G.O		0,14 ± 0		0,04 ± 0		0,06 ± 0	
	[protéine] $\mu\text{g/ml}$ produites		75 ± 0		90 ± 0		130 ± 0	