



Ecole Nationale Polytechnique  
Département Génie Chimique  
Laboratoire Valorisation des Energies Fossiles

**LAVALEF**

## **Thèse de Doctorat en Sciences**

Option : Génie chimique

### **Etude de la Valorisation de la biomasse algale dans une filère de production de bioalcool**

Présentée par

**Amina ALLOUACHE Eps KETTOU**

Magister en Energies Renouvelables, option Bioénergie

Sous la direction de M. Toudert AHMED- ZAÏD Professeur ENP

Et Majda AZIZA DR CDER Bouzaréah

Présentée et soutenue publiquement le (15/12/2022)

#### **Composition du Jury :**

|                       |                            |               |
|-----------------------|----------------------------|---------------|
| Président             | M. BOUARAB Rabah,          | Pr ENP        |
| Rapporteur/ Promoteur | Mme AZIZA Majda,           | DR ( CDER)    |
|                       | M. AHMED ZAÏD Toudert,     | Pr ENP        |
| Examineurs            | Mme KIES Fairouz,          | MCA ENP       |
|                       | Mme AMOKRANE-NIBOU Samira, | Pr USTHB      |
|                       | Mme ZERMANE Faiza,         | Pr USDB/Blida |

**ENP 2022**





Ecole Nationale Polytechnique  
Département Génie Chimique  
Laboratoire Valorisation des énergies fossiles

**LAVALEF**

## Thèse de Doctorat en Sciences

Option : Génie chimique

### Etude de la Valorisation de la biomasse algale dans une filière de production de bioalcool

Présentée par

**Amina ALLOUACHE Eps KETTOU**

Magister en Energies Renouvelables, option Bioénergie

Sous la direction de M. Toudert AHMED- ZAÏD Professeur ENP

Et Majda AZIZA DR CDER Bouzaréah

Présentée et soutenue publiquement le (15/12/2022)

#### Composition du Jury :

|                       |                            |               |
|-----------------------|----------------------------|---------------|
| Président             | M. BOUARAB Rabah,          | Pr ENP        |
| Rapporteur/ Promoteur | Mme AZIZA Majda,           | DR ( CDER)    |
| Examineurs            | M. AHMED ZAÏD Toudert,     | Pr ENP        |
|                       | Mme KIES Fairouz,          | MCA ENP       |
|                       | Mme AMOKRANE-NIBOU Samira, | Pr USTHB      |
|                       | Mme ZERMANE Faiza,         | Pr USDB/Blida |

**ENP 2022**

## ملخص

إن مشاكل الطاقة والبيئة الحالية بسبب استنفاد احتياطات الوقود الأحفوري والاحتباس الحراري تزداد سوءاً يوماً بعد يوم، ويبرز التحول إلى الطاقات النظيفة والمتجددة كبديل ممتاز للتغلب على هذه المشاكل. أدى الجدل حول استخدام المنتجات الغذائية لإنتاج الجيل الأول من الوقود الحيوي والتحصن التي تسببها الجيل الثاني إلى الانتقال إلى الجيل الثالث الذي يتمتع بميزة تجنب استخدام الأراضي الصالحة للزراعة والمنتجات الغذائية وحماية التنوع البيولوجي. يعتمد هذا الجيل على تجميع طاقة الطحالب البحرية وطحالب المياه العذبة التي تتميز بكونها وفيرة، وحتى اجتياحيه، سهولة الاستزراع مع مخزون طاقي هائل

تقدم هذه الأطروحة توصيفاً لنوع من الطحالب البحرية الكبيرة المحلية التي تم جمعها في بوهارون على الساحل الغربي للجزائر العاصمة أولفا لاكتوكا بالإضافة إلى تقييم لإنتاج الإيثانول الحيوي من الأخير بتقنية ت م (تحلل وتخمر منفصلان)، مسبقاً بمعالجة حرارية بالحمض تحت درجة حرارة 120 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة

تم إجراء التحلل الأنزيمي باستخدام سلولاز تجاري (سلوكلاست 1.5 لتر) من جهة ولمحلول إنزيمي طاقي لزراعة فطر تريكوديرما معزول من التربة في مركز تطوير الطاقات المتجددة ببوزريعة من جهة أخرى

أظهرت النتائج إمكانات طاقة ممتازة لأولفا لاكتوكا، خاصة في الكربوهيدرات: 9,57% سليلوز، 6,9% هيميسليلوز ومعدل منخفض من اللجنين بنسبة 5,11%. بلغ معدل تحرير الجلوكوز 52,12% باستخدام الطافي الفطري و85,01% باستخدام الإنزيم التجاري. تم إنتاج حوالي 3,52 غرام / لتر من الإيثانول باستخدام سلوكلاست، 1,18 غرام / لتر باستخدام الطاف الإنزيمي الفطري، بعد 48 ساعة من التخمر تحت درجة حرارة 30 درجة مئوية ودرجة حموضة 5، مما أدى إلى إنتاج إيثانول قدره 0,41 غرام من الإيثانول / غرام من الجلوكوز مع الإنزيم التجاري و0,26 غرام من الإيثانول / غرام من الجلوكوز باستخدام المستخلص الأنزيمي الفطري. تبدو نتائج الإيثانول في هذه الدراسة واعدة بشكل خاص عند مقارنتها بنتائج المراجع الدارسة لنفس الموضوع.

، الكلمات الرئيسية: *ulva lactuca*، *trichoderma sp*، السيلولاز، الفطريات، SHF، الإيثانول الحيوي،

## Abstract

*The current energy and environmental issues due to the depletion of fossil fuels and global warming are getting worse day by day. The transition to clean and renewable energies is emerging as a response to overcome these problems. The controversy around the use of food substrates caused by first generation biofuels production and the deforestation caused by the second generation have forced the transition to the third generation which has the advantage of avoiding the use of arable land, edible products and threats to biodiversity. This generation is based on the use of marine and freshwater algae; which have the advantage of being abundant, invasive, easy to cultivate with good energy potential.*

*This thesis presents a characterization of Ulva Lactuca; a local marine macroalgae collected in Bouharoun on the west coast of Algiers as well as the evaluation of its bioethanol production potential in SHF mode (separate hydrolysis and fermentation), preceded by an acid thermal pretreatment with at 120°C for 15 min. Enzymatic hydrolysis was carried out using both a commercial cellulase (celluclast 1,5 L) and an enzymatic supernatant from a fungal culture of Trichoderma sp, a fungus isolated at CDER from the rhizosphere. The results showed an excellent energy potential of the macroalgae ulva lactuca, particularly in carbohydrates: 9,57% cellulose, 6,9% hemicellulose and a low lignin rate of 5,11%. The saccharification rate reached 52,12% using the fungal supernatant and 85,01% using the commercial enzyme. About 3,52 g/l of ethanol were produced using cellulast, and 1,18 g/l using the fungal supernatant, after 48 h of fermentation using Saccharomyces cerevisiae at 30°C and pH 5, leading to ethanol yields of 0,41 g of ethanol/g of glucose with the commercial enzyme and 0,26 g of ethanol/g of glucose with the fungal supernatant. The ethanol yields of the present study appear particularly promising when compared to the yields reported in the literature.*

**Keywords:** bioethanol, SHF, cellulase, fungus, ulva lactuca, Trichoderma sp,

## Résumé

*Les problèmes énergétiques et environnementaux actuels dus à l'épuisement des réserves de combustibles fossiles et au réchauffement climatique s'accroissent d'année en année, le passage vers des énergies propres et renouvelables s'impose comme solution pour pallier à ces problèmes. La polémique autour de l'utilisation des substrats alimentaires pour la production des biocarburants de première génération et la déforestation causée par ceux de la deuxième génération ont forcé le passage à la troisième génération qui présente l'avantage d'éviter l'utilisation des terres arables, des produits comestibles et des menaces qui pèsent sur la biodiversité. Cette génération est basée sur la valorisation énergétique des algues marines et d'eau douce ; ces dernières ont l'avantage d'être abondantes voire envahissantes, faciles à cultiver avec un bon potentiel énergétique.*

*Cette thèse porte sur la caractérisation de Ulva Lactuca, une macroalgue marine locale collectée à Bouharoun sur la côte ouest d'Alger ainsi que sur l'évaluation de son potentiel de production de bioéthanol en mode SHF (hydrolyse et fermentation séparées), précédée d'un prétraitement thermique à l'acide à 120°C pendant 15 min. L'hydrolyse enzymatique a été réalisée à l'aide d'une cellulase commerciale (celluclast 1,5 L) dans un premier temps, puis, dans un deuxième temps, à l'aide d'un surnageant enzymatique de culture fongique de Trichoderma sp, un champignon isolé au CDER à partir de la rhizosphère. Les résultats ont montré un excellent potentiel énergétique de la macroalgue ulva lactuca, notamment en glucides : 9,57% de cellulose, 6,9% d'hémicellulose et un faible taux en lignine de 5,11 %. Le taux de saccharification a atteint un taux de 52,12 % utilisant le surnageant fongique et 85,01% utilisant l'enzyme commerciale. Environ 3,52 g/l d'éthanol ont été produits utilisant la cellulast, et 1,18 g/l utilisant le surnageant fongique et ce après 48 h de fermentation utilisant Saccharomyces cerevisiae à 30°C et pH 5, conduisant à des rendements en éthanol de 0,41 g d'éthanol/g de glucose avec l'enzyme commerciale et 0,26 g d'éthanol/g de glucose avec le surnageant fongique. Les rendements en éthanol de la présente étude apparaissent particulièrement prometteurs comparé aux rendements rapportés dans la littérature.*

**Mots clés :** bioéthanol, SHF, cellulase, champignon, ulva lactuca, Trichoderma sp.

## *Dédicace*

*A la mémoire de ma mère qui aimait tant la science*

*A Mon cher papa, qui m'a montré le chemin à suivre*

*A mon cher mari, pour son soutien et son réconfort qui m'ont donné  
confiance et courage*

*A mes chers frères et sœurs, pour leur dévouement et leur serviabilité,  
merci d'avoir été à mes côtés*

*A mes chers enfants que j'aime tendrement*

*A mes chers beaux-parents et toute ma belle-famille, pour leurs  
encouragements et leur soutien*

*A Toute l'équipe de la division Bioénergie et environnement du CDER*

*A Toute l'équipe du département de Génie chimique de l'ENP*

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Madame La directrice de recherche **Majda AZIZA** pour sa grande disponibilité durant ces années depuis l'école doctorale, le magister et puis le doctorat, vous étiez non seulement disponible pour me guider et me conseiller, mais aussi vous étiez un soutien énorme sans lequel je n'aurai su continuer le travail. Merci pour avoir cru en moi.

Et Monsieur le professeur **AHMED ZAID Toudert**, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour son apport scientifique et son encadrement tout au long de l'élaboration de ma thèse, pour ses précieux conseils, pour ses qualités humaines Je vous serai toujours reconnaissante.

Je tiens particulièrement à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux. Un grand merci au Professeur **BOUARAB Rabah**, d'avoir accepté de présider le Jury. Ma reconnaissance va également à mesdames **AMOKRANE-NIBOU Samira**, Mme **ZERMANE Faiza** et Mme **Kies Fairouz**, d'avoir accepté d'examiner cette thèse, pour le temps qu'ils vont passer à lire et examiner le manuscrit afin d'améliorer la qualité du mémoire de thèse.

J'adresse ma plus profonde gratitude à la directrice du **CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas)**, Mme **BALESTROS Mercedes** ainsi qu'à tous les chercheurs du centre, de m'avoir accueilli dans leur laboratoire et pour toutes les connaissances acquises durant le stage.

J'exprime aussi toute ma gratitude et reconnaissance à M **AMOURI Mohammed** du **Laboratoire de Bioénergie et Environnement** du **CDER**, pour son aide notamment dans la rédaction du manuscrit.

J'exprime ma **gratitude** Mme **BOUZID Ourdia** du **Laboratoire de Bioénergie et Environnement** du **CDER**, pour son aide au laboratoire notamment pour la partie isolement de champignons cellulolytiques.

A la fin, je tiens à présenter toutes ma gratitude et reconnaissance à tous ceux et à toutes celles qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

## TABLE DES MATIÈRES

|  |    |
|--|----|
| Nomenclature   |    |
| Liste des tableaux   |    |
| Liste des figures  |    |
| Introduction générale.....   | 15 |
| <i>Chapitre 1</i> .....  | 18 |
| Etude bibliographique .....  | 19 |
| 1.1. Les biocarburants .....   | 19 |
| 1.2. Les biocarburants pour remplacer les carburants fossiles .....                        | 19 |
| 1.3. Potentiel local pour la production des biocarburants en Algérie.....                  | 20 |
| 1.4. Bilan énergétique.....  | 21 |
| 1.5. Bilan environnemental .....   | 22 |
| <i>Chapitre 2</i> .....  | 25 |
| 2.1 Propriétés du bioéthanol.....  | 26 |
| 2.2 Substrats de production du bioéthanol .....  | 27 |
| 2.3 Structure et composition de la biomasse lignocellulosique.....                         | 28 |
| 2.4 Mécanisme de dégradation de la lignocellulose .....                                    | 29 |
| 2.5 Source microbienne des cellulases .....  | 30 |
| 2.6 Production du bioéthanol à partir de la lignocellulose .....                           | 31 |
| 2.6.1 Le Prétraitement .....   | 31 |
| 2.6.2 La Saccharification.....   | 32 |
| 2.6.3 La Fermentation .....  | 34 |
| 2.6.4 Distillation.....  | 36 |
| <i>Chapitre 3</i> .....  | 37 |
| 3.1. Bioéthanol de 3 <sup>ème</sup> génération.....  | 38 |
| 3.2. Potentiel des Macroalgues pour la production du bioéthanol.....                       | 39 |
| 3.3. Potentiel de l'Algérie en biomasse marine à fort potentiel énergétique.....           | 40 |
| 3.4. Potentiel de la macroalgue <i>ulva lactuca</i> .....                                  | 41 |
| <i>Chapitre 4</i> .....  | 43 |
| MATERIELS ET METHODES .....  | 44 |
| 4.1 MATERIEL.....  | 44 |
| 4.2 METHODES .....   | 44 |
| 4.2.1 IDENTIFICATION ET ETUDE DE LA COMPOSITION DE LA MACROALGUE <i>ULVA LACTUCA</i> ..... | 44 |
| 4.2.2 ETUDE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES D'ENZYMES COMMERCIALES.....                         | 55 |
| 4.2.3 ISOLEMENT DE CHAMPIGNONS CELLULOLYTIQUES .....                                       | 59 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 4.2.4     | PRODUCTION DE BIOETHANOL A PARTIR DE LA MACROALGUE <i>ULVA LACTUCA</i> .....                                    | 61 |
| 4.2.4.1   | Production de bioéthanol utilisant une enzyme commerciale .....   | 61 |
| 4.2.4.1.1 | Prétraitement .....   | 62 |
| 4.2.4.1.2 | Saccharification .....  | 63 |
| 4.2.4.1.3 | Fermentation en mode SHF ( Separated Hydrolysis and Fermentation).....  | 64 |
| 4.2.4.2   | Production du bioéthanol utilisant un surnageant de culture fongique.....                                       | 65 |
| 4.2.4.2.1 | Obtention des surnageants de culture de <i>Trichoderma sp</i> souche (N°=5).....                                | 66 |
| 4.2.4.2.2 | Culture de la souche N°=5 en milieu liquide et obtention des surnageants.....                                   | 66 |
| 4.2.4.2.3 | Etude de l'activité enzymatique .....   | 66 |
| 4.2.4.3   | Calcul du rendement en éthanol par rapport à la matière sèche initiale .....                                    | 67 |
|           | <i>Chapitre 5</i> .....   | 68 |
| 5.1.      | CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DE LA MACROALGUE <i>ULVA LACTUCA</i> .....                                    | 69 |
| 5.1.1.    | Identification .....  | 69 |
| 5.1.2.    | Caractérisation de la macroalgue <i>ulva lactuca</i> .....  | 71 |
| 5.1.2.1.  | Détermination des composés algaux extractibles (solubles) dans l'eau et dans l'éthanol.....                     | 71 |
| 5.1.2.2.  | Détermination des carbohydrates de structure et de la lignine dans la poudre d' <i>ulva lactuca</i> .....       | 74 |
| 5.1.2.3.  | Détermination du taux d'azote dans les extraits de <i>ulva lactuca</i> .....                                    | 76 |
| 5.2.      | ETUDES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DE QUELQUES ENZYMES COMMERCIALES .....  | 78 |
| 5.2.1.    | Activité de la celluclast .....   | 78 |
| 5.2.1.    | Activité de la Novozym EG1 (endoglucanase 1) .....  | 80 |
| 5.2.2.    | Activité de $\beta$ -glucosidase et de la $\beta$ -xylosidase.....  | 81 |
| 5.3.      | ISOLEMENT DE CHAMPIGNONS CELLULOLYTIQUES .....  | 83 |
| 5.3.1.    | Résultats de l'isolement des champignons à partir de la rhizosphère et des racines .....                        | 83 |
| 5.3.2.    | Taux de croissance des souches .....  | 85 |
| 5.3.3.    | Sélection des meilleures souches cellulolytiques en se basant sur un milieu de culture sélectif.....            | 86 |
| 5.3.4.    | Identification de la souche cellulolytique sélectionnée .....   | 87 |
| 5.3.4.1.  | Identification macroscopique .....  | 88 |
| 5.3.4.2.  | Identification microscopique .....  | 88 |
| 5.4.      | PRODUCTION DE BIOETHANOL A PARTIR DES HYDROLYSATS DE <i>ULVA LACTUCA</i> .....                                  | 91 |
| 5.4.1.    | Production de bioéthanol à partir des hydrolysats de <i>ulva lactuca</i> utilisant une enzyme commerciale ..... | 91 |
| 5.4.1.1.  | Saccharification .....  | 91 |
| 5.4.1.2.  | Fermentation.....   | 94 |



|  |     |
|--|-----|
| 5.4.2. Production du bioéthanol à partir des hydrolysats de <i>ulva lactuca</i> utilisant des surnageants de culture fongique..... | 97  |
| 5.4.2.1. Fermentation.....   | 100 |
| 5.4.3. Productivité du bioéthanol de <i>ulva lactuca</i> par rapport à la biomasse initiale .....                                  | 103 |
| CONCLUSION GENERALE .....  | 106 |
| Références bibliographiques .....  | 108 |
| ANNEXES.....   | 116 |

## Nomenclature

|               |  |
|---------------|--|
| <b>Abs</b>    | Absorbance   |
| <b>ACV</b>    | Analyse de cycle de vie  |
| <b>ATB</b>    | Antibiotique   |
| <b>BG</b>     | Beta-glucosidase   |
| <b>BX</b>     | Beta-xylosidase  |
| <b>C5</b>     | Sucre à 5 atomes de carbones   |
| <b>C6</b>     | Sucre à 6 atomes de carbones   |
| <b>CBH</b>    | Cellobiohydrolase  |
| <b>CDER</b>   | De Centre de développement des énergies renouvelables                  |
| <b>CIEMAT</b> | Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas |
| <b>CMC</b>    | Cellulose microcristalline   |
| <b>DNS</b>    | Acide 3,5-dinitrosalicylique   |
| <b>EG</b>     | Endoglucanase  |
| <b>Fpase</b>  | Filter paper activity  |
| <b>GES</b>    | Gaz à effet de serre   |
| <b>GIEC</b>   | Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat         |
| <b>IEA</b>    | International Energy Agency  |
| <b>LAP</b>    | Laboratory Analytical Procedure  |
| <b>MEA</b>    | Malt Extract Agar  |
| <b>NREL</b>   | National Renewable Energy Laboratory                                   |
| <b>OCDE</b>   | Organisation de coopération et de développement économiques            |
| <b>PDA</b>    | Potato dextrose Agar   |

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>Pnp</b>       | Paranitrophenol                                |
| <b>Pnp-glc-p</b> | p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside      |
| <b>Pnp-xyl-p</b> | p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside       |
| <b>SHF</b>       | Separated hydrolysis and fermentation          |
| <b>SSF</b>       | Simultaneous Saccharification and fermentation |
| <b>USD</b>       | United States dollar                           |
| <b>YMA</b>       | Yeast Malt Agar                                |

## LISTE DE TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1</b> : Propriétés da bioéthanol.....   | 26 |
| <b>Tableau 2</b> : microorganismes producteurs de cellulases.....  | 31 |
| <b>Tableau 3</b> : principales méthodes de prétraitement de la biomasse lignocellulosique.....                 | 32 |
| <b>Tableau 4</b> : Types d'hydrolyse appliquée aux macroalgues. ....   | 38 |
| <b>Tableau 5</b> : Taux de glucides de quelques espèces de macroalgues .....                                   | 40 |
| <b>Tableau 6</b> : Courbe d'étalonnage du glucose.....   | 55 |
| <b>Tableau 7</b> : Taux d'extraction de la poudre d' <i>ulva lactuca</i> à l'eau.....                          | 71 |
| <b>Tableau 8</b> : Composition des extraits d' <i>ulva lactuca</i> à l'eau après prétraitement acide.....      | 72 |
| <b>Tableau 9</b> : taux d'extraction de <i>ulva lactuca</i> dans l'éthanol.....                                | 73 |
| <b>Tableau 10</b> : Composition de <i>Ulva lactuca</i> en sucres monomères.....                                | 74 |
| <b>Tableau 11</b> : composition de <i>ulva lactuca</i> en sucres complexe, lignine, et cendre.....             | 75 |
| <b>Tableau 12</b> : Taux d'azote dans les extraits de <i>ulva lactuca</i> par la méthode Kjeldahl.....         | 76 |
| <b>Tableau 13</b> : Taux de protéines de <i>Ulva lactuca</i> comparé à d'autres travaux.....                   | 77 |
| <b>Tableau 14</b> : Activités Fpase de la Celluclast.....  | 69 |
| <b>Tableau 15</b> : Activité CMC ase de la Novozym EG1.....  | 80 |
| <b>Tableau 16</b> : Activité de la $\beta$ glucosidase sur le pnp-glc-p.....                                   | 82 |
| <b>Tableau 17</b> : activité de la $\beta$ -xylosidase sur le pnp-xyl-p.....                                   | 82 |
| <b>Tableau 18</b> : Clés d'identification de <i>trichoderma sp</i> .....                                       | 90 |
| <b>Tableau 19</b> : données du spectre HPLC du 4 <sup>ème</sup> jour de saccharification.....                  | 92 |
| <b>Tableau 20</b> : Taux de glucose libéré durant la saccharification enzymatique de <i>ulva lactuca</i> ..... | 93 |
| <b>Tableau 21</b> : données du spectre HPLC du 1 <sup>er</sup> jour de fermentation.....                       | 95 |
| <b>Tableau 22</b> : données du spectre HPLC du 6 <sup>ème</sup> jour de saccharification.....                  | 99 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 23</b> : saccharification des hydrolysats de <i>ulva lactuca</i> utilisant un surnageant de <i>trichoderma sp.</i> .....                  | 100 |
| <b>Tableau 24</b> : données du spectre HPLC du 1 <sup>er</sup> jour de fermentation utilisant un surnageant enzymatique .....                        | 102 |
| <b>Tableau 25</b> : production (g/L) et taux (%) d'éthanol lors du procédé de saccharification et fermentation séparées de <i>ulva lactuca</i> ..... | 103 |
| <b>Tableau 26</b> : Volume d'éthanol produit par rapport à la biomasse sèche initiale.....   | 104 |
| <b>Tableau 27</b> : biomasse sèche nécessaire pour la production d'un litre de bioéthanol selon le type de biomasse.....                             | 105 |

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1 :</b> Emissions de GES selon la Matière première et type d'énergie utilisée.....   | 23 |
| <b>Figure 2 :</b> structure moléculaire de la cellulose.....   | 28 |
| <b>Figure 3:</b> structure moléculaire de l'hémicellulose.....   | 29 |
| <b>Figure 4 :</b> structure moléculaire de la lignine.....   | 29 |
| <b>Figure 5:</b> libération de la cellulose sous l'effet du prétraitement de la biomasse lignocellulosique.....  | 30 |
| <b>Figure 6 :</b> Mécanisme d'action des enzymes cellulolytiques.....  | 33 |
| <b>Figure 7:</b> Mécanisme de la fermentation alcoolique par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 34 |
| <b>Figure 8:</b> Photo de <i>Ulva lactuca</i> récolté (a, b) au port de la madrague, (c, d) sur les côtes de Bouharoun .....                             | 41 |
| <b>Figure 9:</b> Récolte des algues à Bouharoun (Tipaza).....  | 45 |
| <b>Figure 10:</b> Sechage des macroalgues (a) à l'air libre et (b) sur des clés de séchage (séchoir solaire).....  | 45 |
| <b>Figure 11 :</b> Photo de <i>Ulva lactuca</i> (a) après 24 h de séchage et (b) après broyage.....  | 45 |
| <b>Figure 12:</b> Montage de l'extraction de la poudre d'algue dans un soxhlet.....  | 47 |
| <b>Figure 13:</b> Rota-évaporation des extraits algaux .....   | 48 |
| <b>Figure 14 :</b> Filtration des hydrolysats d'algues. ....   | 49 |
| <b>Figure 15 :</b> Etapes de la digestion de la biomasse algale pour la détermination du taux d'azote par la méthode Kjeldahl.....                       | 53 |
| <b>Figure 16 :</b> Distillation de la biomasse algale digérée pour la détermination du taux d'azote par la méthode Kjeldahl.....                         | 54 |
| <b>Figure 17 :</b> (a) Spectrophotomètre à microplaques à 96 puits (marque ZENYTH anthos 200 rt), (b) arrangements des échantillons sur microplaque..... | 56 |
| <b>Figure18 :</b> Procédé d'isolement des champignons cellulolytiques à partir du sol.....   | 60 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 19</b> : Etapes de production du bioéthanol algal utilisant une enzyme commerciale.....  | 62 |
| <b>Figure 20</b> : Mécanisme de prétraitement de la biomasse algale et libération de la cellulose, hémicellulose et de la lignine.....   | 63 |
| <b>Figure 21</b> : Mécanisme de dégradation de la cellulose en glucose.....  | 64 |
| <b>Figure 22</b> : Etapes de production du bioéthanol algal utilisant un surnageant enzymatique...   | 65 |
| <b>Figure 23</b> : Aspect de la macroalgue <i>ulva lactuca</i> ( <b>a</b> : Aspect morphologique du thalle, <b>b</b> : Vue de surface sous microscope, <b>c</b> : Coupe transversale du thalle).....                                 | 69 |
| <b>Figure 24</b> : Morphologie et vue de surface sous microscope (× 40) de <i>ulva compressa</i> , <i>ulva fasciata</i> , <i>ulva lactuca</i> , et <i>ulva linzea</i> .....  | 70 |
| <b>Figure 25</b> : Courbe d'étalonnage du glucose à pH=5.....  | 78 |
| <b>Figure 26</b> : Courbe d'étalonnage du PNP (p-nitrophénol) à pH=5.....  | 81 |
| <b>Figure 27</b> : Souches fongiques développées à partir d'échantillons de sol et de racine sur milieu PDA+ATB ( <b>a</b> : sol non enrichi en cellulose, <b>b</b> et <b>c</b> : sol enrichi en cellulose, <b>d</b> : racines)..... | 83 |
| <b>Figure 28</b> : Souches (1 à 12) à j+4 de champignons isolées du sol cultivées sur milieu (a) czapek glucose, (b) czapek cellulose.....   | 84 |
| <b>Figure 29</b> : Courbes de croissance des souches fongiques S1 à S12 sur milieu czapek-CMC pendant 8 jours.....   | 85 |
| <b>Figures 30</b> : Taux de croissances des souches S5, S6, et S9 sur milieu (a) czapek son de blé, (b) czapek marc de café et (c) czapek amidon.....  | 87 |
| <b>Figure 31</b> : Souche N°=5ensemencée en (a) culture centrale et (b) en stries après 7 jours de culture.....  | 88 |
| <b>Figure 32</b> : Mycélium de la souche N°=5 colorée au rouge Congo, vu au microscope photonique ×40.....   | 89 |
| <b>Figure 33</b> : Spectre HPLC de la concentration maximale du glucose libéré enregistré au 4 <sup>ème</sup> jour de saccharification.....  | 92 |
| <b>Figure 34</b> : Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose par HPLC.....   | 93 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 35 :</b> Spectre HPLC de la concentration du glucose et de l'éthanol enregistré après 24h de fermentation.....                                    | 94  |
| <b>Figure 36:</b> Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'éthanol par HPLC.....   | 96  |
| <b>Figure 37 :</b> Saccharification et fermentation des hydrolysats de <i>ulva lactuca</i> .....  | 96  |
| <b>Figure 38 :</b> Activité FPase du surnageant de la souche N°=5 (fpu / ml min).....   | 97  |
| <b>Figure 39 :</b> Spectre HPLC de la concentration du glucose enregistré après 6 jours de saccharification utilisant un surnageant enzymatique.....        | 98  |
| <b>Figure 40:</b> Spectre HPLC de la concentration du glucose et de l'éthanol enregistré après 24h de fermentation utilisant un surnageant enzymatique..... | 101 |



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

La préoccupation croissante autour de l'épuisement et la dépendance aux combustibles fossiles a déclenché des efforts mondiaux pour les remplacer par des énergies plus respectueuses de l'environnement, ces efforts ont été intensifiés où de nombreuses alternatives aux combustibles fossiles ont été suggérées ; le biodiesel, l'hydrogène, l'énergie éolienne, l'énergie solaire, et les biocarburants ont été présentés au protocole de Kyoto comme des types d'énergie respectueuses de l'environnement. (Demirbas, 2007) Cependant, il est clair qu'aucune de ces énergies n'est capable à elle seule de se substituer parfaitement aux énergies fossiles, l'utilisation de toutes ces technologies pour fournir de l'énergie serait plus que nécessaire pour réduire l'utilisation des combustibles fossiles, et limiter leurs impact sur l'environnement et l'économie mondiale qui se sont considérablement accéléré au cours du siècle dernier, avec une croissance rapide de la population et une diminution concomitante des ressources naturelles (Khelil, 2017)

Dans cette perspective, L'Algérie a élaboré un plan d'action gouvernemental pour la mise en œuvre d'un programme ambitieux de production d'énergies renouvelables devenu plus que nécessaire vu la situation économique du pays, qui a jusqu'ici reposé sur une ressource non renouvelable et fortement assujettie aux fluctuations qu'impose le monde extérieur.

Dans son plan d'exécution de 2015 le programme national d'énergies renouvelables et d'efficacité énergétique (PNEREE) vise une production de 22000 MW dont 1000 MW à partir de la biomasse à l'horizon 2030, avec 12000 MW destiné au marché local (CEREFÉ, 2020)<sup>a</sup> dont les besoins énergétiques ne cessent d'augmenter. Ces derniers ont été estimés à 65 MTep en 2018 dont 15,3 MTep pour le secteur des transports représentant (32 %) de la consommation énergétique totale. Ceci permet d'ordonner les priorités quant aux orientations à suivre en matière de transition énergétique. Il y a en effet lieu d'aller droit au but et focaliser l'intérêt en premier lieu sur le secteur des transports en Algérie qui utilise exclusivement les combustibles fossiles liquides (Essence, Gasoil...), pour un parc national automobile en constante hausse et qui a atteint 6418212 unités en 2018, dont 65 % de roulant à l'essence et 35 % au diesel (CEREFÉ, 2020)<sup>b</sup>

Dans ces conditions un changement profond des moyens de production et de consommation dans ce secteur s'impose, pour tendre vers un mix énergétique (carburant/biocarburant) ou encore électrique (installation de la première borne de recharge de voitures électriques) de

sorte à développer des carburants propres, durables et à empreinte environnementale acceptable.

A cet égard, la piste des biocarburants se présente comme une alternative de choix au gasoil et à l'essence, elle doit être considérée avec le plus grand soin car elle répond aux enjeux de La transition énergétique en termes de sécurité des approvisionnements, et de protection du climat ainsi que de la santé publique.

Le protocole de Kyoto définit les biocarburants comme gaz ou combustibles liquides fabriqués à partir de matières végétales (biomasse) ou de déchets. Le bioéthanol a beaucoup attiré l'attention depuis de nombreuses années et la production d'éthanol à partir de saccharose et d'amidon est déjà un processus bien établi. La majeure partie de la production de bioéthanol est assurée par les États-Unis et le Brésil. (USDA, 2021). Il en existe une variété de rapports de mélange y compris : le E5 (contenant 5 % d'éthanol et 95 % d'essence), le E10 (contenant 10 % d'éthanol et 90 % d'essence), le E85 (contenant 15 % d'éthanol et 85 % d'essence) et le E100 (100 % d'éthanol) (Walker, 2010)<sup>a</sup>. Il existe essentiellement trois générations classées selon le type de matières premières : la première génération : à base de céréales ; maïs, blé, riz sucre (betteraves et canne, etc.), la deuxième génération : à base de lignocellulose ; et la troisième génération : à base d'algue. (Walker, 2010)<sup>b</sup>.

Les macro algues ont attiré une attention croissante en tant que matière première renouvelable pour la production durable de biocarburants. (Wyman & bin, 2009) En effet, quel que soit leur nature, verte, brune ou rouge, les macroalgues sont connues pour avoir une teneur en cellulose pouvant aller jusqu'à 70 % du poids sec. (Trivedi et al., 2015) Par ailleurs, les algues se caractérisent par l'absence de lignine (parfois, des traces), ce qui permet d'alléger ou d'éliminer le prétraitement énergivore dans le cycle de production du bioéthanol, (Baldan et al., 2001) et ce, contrairement aux plantes terrestres, où la cellulose est liée à la lignine, les hémicelluloses et la pectine, nécessitant un apport d'énergie supplémentaire pour les éliminer. De plus, les algues ont une productivité de surface très élevée, et peuvent être cultivées sur des terres non arables évitant d'entrer en concurrence avec les productions alimentaires, ce sont surtout des organismes photosynthétiques qui fixent le CO<sub>2</sub>, offrant des avantages en matière d'atténuation des gaz à effet de serre. (Li-Beisson & Peltier, 2013)

L'objet du travail de recherche présenté dans cette thèse se focalise sur la biomasse algale avec une étude de caractérisation détaillée de ses composants notamment les glucides de la

macroalgue locale *ulva lactuca* et ce afin de démontrer son potentiel pour la production du bioéthanol.

Cette thèse vise également à approfondir les connaissances en termes de maîtrise du processus de production du bioéthanol de nouvelle génération en s'appuyant sur des protocoles expérimentaux détaillés élaborés à partir de recherches approfondies, cherchant à déterminer les conditions optimales de chaque étape du cycle de production du bioéthanol permettant une meilleure compréhension et une reproductibilité des protocoles expérimentaux de production du bioéthanol, à partir d'une biomasse cellulosique algale.

Ce document s'articule de la façon suivante :

- Une première partie présentant les données bibliographiques, divisée en trois chapitres :
  - *Le premier chapitre* qui présente les données concernant les biocarburants dans le monde et en Algérie ainsi que les avantages économiques et écologiques qu'ils présentent.
  - *Le deuxième chapitre* est dédié aux propriétés et technologies de production du bioéthanol : prétraitements, saccharification, fermentation, ainsi que les techniques de production à partir de la cellulose utilisant les enzymes.
  - *Le troisième chapitre* met en avant les atouts des algues pour la production du bioéthanol de troisième génération ainsi que le potentiel algérien en biomasse algale.
- La deuxième partie présente les matériels et méthodes utilisées.
- La troisième partie est consacrée à la description et à la discussion des résultats obtenus.
- La quatrième partie aborde la conclusion et donne quelques perspectives pour poursuivre le travail.

# *Chapitre 1*

## *Généralités Sur Les Biocarburants*

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. Les biocarburants

Les biocarburants représentent une source d'énergie alternative dérivée de matériel biologique fournissant un potentiel énergétique renouvelable offrant l'avantage d'atténuer les émissions du dioxyde de carbone dans l'atmosphère. ([Hamelinck et al., 2004](#); [Chum & Overend, 2001](#))

Les biocarburants peuvent être solides (biomasse, déchets), liquides (bioéthanol, biodiesel, bio butanol, bio méthanol) ou gazeux (méthane, hydrogène).

Selon la matière première à partir de laquelle ils sont fabriqués ils peuvent être de première, deuxième ou de troisième génération. ([Cockroft & Kelly, 2006](#))

La première génération de biocarburants est issue de produits alimentaires (blé, maïs, betteraves, colza) via des processus techniques simples à partir des plantes oléifères ou à partir des plantes à sucre. La deuxième génération est issue de la lignocellulose contenue dans les substrats végétaux non alimentaires (plantes, arbres, déchets...) quant à la troisième génération elle utilise les sucres et les lipides contenues dans les algues pour les transformer en bioéthanol, biodiesel ou encore en bio méthane. ([Scragg, 2009](#))<sup>a</sup>

Cette classification distingue les carburants fabriquées à partir de substrats alimentaires des carburants issus de la lignocellulose (bois, feuilles, paille, etc.). Une autre interprétation l'utilise pour faire la distinction entre les biocarburants produits à partir de processus techniques simples (première génération) et ceux produits par des techniques avancées (deuxième et troisième génération). ([Allouache & Aziza, 2012](#))

### 1.2. Les biocarburants pour remplacer les carburants fossiles

Les émissions mondiales des gaz à effet de serre dûes aux transports ont augmenté de 0,5 % en 2019 (contre 1,9 % par an depuis 2000) en raison de l'amélioration de l'efficacité énergétique due à une plus grande utilisation des biocarburants. Néanmoins, le transport est toujours responsable de 24 % des émissions directes de CO<sub>2</sub> provenant de la combustion des carburants fossiles, générant des émissions de gaz à effet de serre qui continuent d'augmenter, soulignant la nécessité d'une plus grande focalisation des politiques internationales pour encourager la production et l'utilisation des biocarburants. ([IEA, 2020](#))

Différentes sources et technologies d'énergie alternatives ont été envisagées pour le transport, tels que les biocarburants, l'hydrogène, le gaz naturel et l'électricité afin d'établir un environnement économique propice pour promouvoir la croissance du marché des véhicules à carburant alternatif. Ces biocarburants sont produits à partir de matières organiques renouvelables ayant le potentiel de réduire les émissions de polluants et de gaz à effet de serre (GES). (Mutezo & Mulopo, 2021)

Les biocarburants sont des sources d'énergie dérivées de matériaux biologiques et sont donc renouvelables. Leur nature biologique les distingue des autres sources d'énergie renouvelables telles que l'énergie éolienne, et solaire. Ils sont produits à partir de cultures ou de déchets, ce qui permet une diversification agricole, et une valorisation des déchets et des co-produits. (Scragg, 2009)<sup>b</sup>

Les biocarburants conventionnels tels que l'éthanol ou le biodiesel, et leurs divers mélanges avec des combustibles fossiles, ont l'avantage que leur mise en œuvre à grande échelle soit un processus déjà bien établi et maîtrisé, le succès futur repose donc sur l'amélioration de l'efficacité énergétique et la réduction des coûts de production dans la conversion de la biomasse en biocarburants (Hamelinck et al., 2004 )

Le remplacement *total* des carburants fossiles par des biocarburants, n'est pour le moment pas envisageable, il faudrait plusieurs types d'énergie associés et d'autres progrès technologiques notamment celles de la deuxième et troisième génération pour espérer remplacer les énergies fossiles en totalité.

Le développement des technologies de production des biocarburants est en constant progrès notamment les technologies de production à partir de la cellulose et l'utilisation des hydrolyses enzymatiques impliquant le passage à la seconde et surtout la troisième génération.

On peut conclure que le remplacement des carburants fossiles par les biocarburants pourrait être assuré en partie si les conditions nécessaires à ce scénario sont réunies à savoir la maîtrise du procédé, la disponibilité d'une biomasse peu coûteuse à fort potentiel énergétique et un cycle de production peu consommateur en énergie. (Sorensen, 2004)

### **1.3. Potentiel local pour la production des biocarburants en Algérie**

L'Algérie étant un pays producteur de gaz et de pétrole, son économie dépend des fluctuations du prix du baril de pétrole à l'échelle mondiale. Toutefois, la signature des

accords de Kyoto par l'Algérie et l'apparition des changements climatiques l'ont incité à mettre en place un programme national des énergies renouvelables, d'ici vingt ans, l'Algérie espère produire autant d'électricité à partir des énergies renouvelables qu'elle en produit actuellement à partir du gaz naturel. Le potentiel de la biomasse en Algérie est relativement fort et riche.

Le couvert végétal n'est pas très important, et représente à peine 10% de la superficie totale du pays. L'exploitation durable de cette ressource vise surtout les sous-produits et résidus. Beaucoup de pistes restent à exploiter comme le bois résiduels des oliviers estimé à 548140,349 t/ha ou encore les déchets des palmiers estimés à 166900 t/ha, ou encore le bois résiduels des agrumes estimés à 75838,17 t/ha ou encore les tonnes de déchets maritimes regroupant les algues et plantes aquatiques qui s'échouent sur les côtes. Il y a donc un large choix de substrats pouvant servir à la production du bioéthanol, biodiesel ou le biogaz dans le but de réduire la dépendance aux carburants fossiles et les émissions de gaz à effet de serre. (Naili & Messaoudi, 2017)

Pour le moment, l'expérience de l'Algérie se résume en des études d'inventaires des substrats à fort potentiel énergétique pouvant servir de base pour la production de biocarburants et plus particulièrement ceux qui n'entrent pas en concurrence avec les productions alimentaire. Le développement des technologies de production des biocarburants en Algérie est au stade des essais sur la biomasse brute, et de l'optimisation des processus, à petite échelle, toutes générations confondues y compris la troisième. Des analyses de cycles de vie de production depuis l'approvisionnement en biomasse à la livraison aux pompes à essence avec étude des bilans environnementaux et bilans énergétiques ont aussi été entreprises. (Amouri et al., 2016)

#### 1.4. Bilan énergétique

Les plantes captent et convertissent l'énergie solaire en glucides, protéines, huiles et lignocellulose. Ces sources d'énergie renouvelables peuvent être converties en biocarburants pouvant se substituer aux combustibles fossiles. Les biocarburants idéaux seraient proches de la neutralité carbone et fourniraient un bilan énergétique net très positif. Ces carburants seraient produits de manière durable, ne conduiraient pas à la déforestation et n'entreraient pas en concurrence avec la production alimentaire. Les principaux biocarburants d'origine végétale sont l'éthanol de grain, le biodiesel et la biomasse.

Depuis l'aube de la civilisation, les alcools sont fabriqués par fermentation d'amidon végétal et de sucre. A notre époque, le marché de l'éthanol mélangé à l'essence a été stimulé par les pénuries de carburant. Dans les années 1970, le Brésil est devenu un leader mondial dans la

production efficace d'éthanol à partir de la canne à sucre et produit aujourd'hui plus de 6 milliards de gallons américains par an. (FAPESP., 2007) La production américaine d'alcool à base de maïs s'est accélérée rapidement pour atteindre 9 milliards de gallons par an en réponse aux mandats et aux subventions des carburants renouvelables. Une controverse a surgi au sujet de l'utilisation de graines pour l'éthanol qui, autrement, serait entré dans la chaîne alimentaire. Aujourd'hui, l'Union européenne est le plus grand marché du biodiesel. Depuis 150 ans, le biodiesel est produit à partir d'huiles végétales et d'autres lipides par un processus de trans-estérification. Comme le biodiesel est généralement dérivé de graines, les coûts des matières premières sont élevés et l'industrie est vulnérable aux problèmes litigieux entre aliments et carburant.

Le bioéthanol produit à partir des parties végétales cellulosiques non alimentaires telles que les tiges et les branches, présente le bilan énergétique positif. L'éthanol cellulosique est produit en décomposant les chaînes de cellulose en sucres simples à l'aide de cellulases et d'autres enzymes, et en faisant fermenter ces sucres en éthanol. De récentes ACV de son cycle de production affirment que le rendement de la biomasse est essentiel pour obtenir un bilan énergétique positif. (Barr et al., 2021)

L'énergie nécessaire pour produire de l'éthanol a considérablement diminué grâce à l'amélioration des techniques agricoles, et l'utilisation des résidus et des algues qui ne nécessitent pas de terre agricole et qui offrent un haut rendement et une conversion plus efficace sur le plan énergétique.

Pour toutes ces raisons, l'éthanol notamment cellulosique présente un bilan énergétique positif - c'est-à-dire que la teneur énergétique de l'éthanol est supérieure à l'énergie utilisée pour le produire, cet équilibre s'améliore constamment avec les nouvelles technologies, qui peuvent fournir jusqu'à dix fois plus d'énergie nécessaires à la fabrication du bioéthanol cellulosique. (EERE, 2022)

### **1.5. Bilan environnemental**

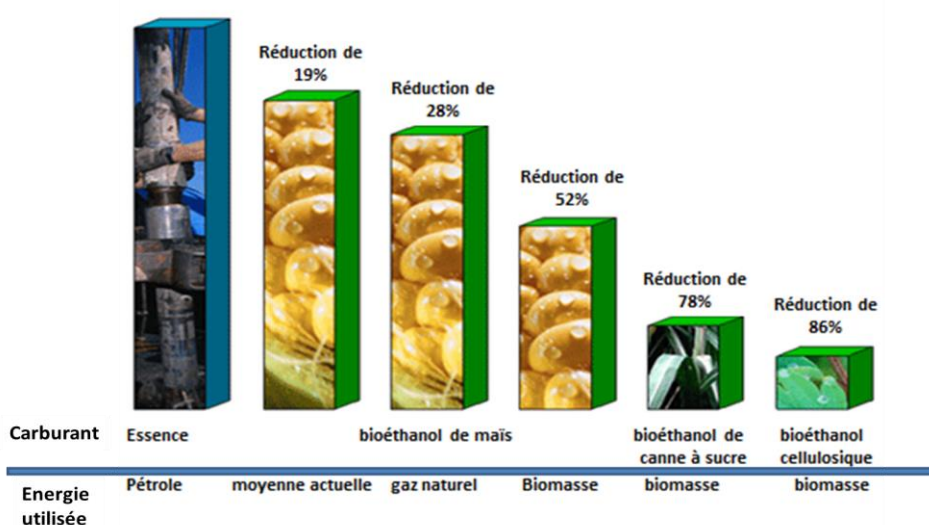
Les émissions de GES du secteur des transports ont atteint 7.56 gigatonnes de dioxyde de carbone (GtCO<sub>2</sub>) en 2021, 77.51 % de ces émissions ont été émis par le secteur du transport routier, estimée à 5,86 Gt de CO<sub>2</sub> (IEA, 2021).



L'activité des transports a connu un rebond qui a entraîné une augmentation de 8 % des émissions de CO<sub>2</sub> des transports en 2021 par rapport à l'année précédente. Les émissions des transports ont augmenté à un taux annuel moyen de près de 1,7 % de 1990 à 2021, plus rapidement que tout autre secteur d'utilisation finale. Pour se mettre sur la bonne voie avec le scénario Net Zero Emissions d'ici 2050, les émissions de CO<sub>2</sub> du secteur doivent diminuer d'environ 3 % par an jusqu'en 2030. Le remplacement des carburants conventionnels par les biocarburants sera nécessaire pour atteindre ces réductions d'émissions. (IEA, 2022)

Le bilan carbone des biocarburants est pratiquement neutre car les glucides utilisés pour fabriquer ces carburants proviennent du carbone atmosphérique fixé par photosynthèse. Néanmoins, les économies de GES varient considérablement à travers les biocarburants. Par exemple, sur l'ensemble de son cycle bio industriel, le bioéthanol produits à partir de blé, ou de betterave sucrière permettent rarement de réduire les émissions de GES de plus de 30 à 60 %, tandis que l'éthanol issu du maïs (maïs) permet généralement des économies inférieures à 30 %. (Hansen et al., 2010)

En revanche, l'éthanol produit à partir de la cellulose (plantes, résidus, algue) peut réduire les émissions de GES jusqu'à 86 % ou plus par rapport aux émissions de combustibles fossiles (Figure 1). Ces différences peuvent être attribuées en partie à des attributs spécifiques aux substrats tels que la possibilité de réabsorption du CO<sub>2</sub> (algues) et la teneur en sucre, et en partie aux apports de combustibles fossiles consommés durant le cycle de fabrication. (Wang et al., 2007)



**Figure 1 :** Emissions de GES selon la Matière première et type d'énergie utilisée (Wang et al., 2007)

La production du bioéthanol peut engendrer les émissions de certains polluants atmosphériques car l'énergie fossile est utilisée pendant la phase de culture de la biomasse et pendant la production du biocarburant. Ces émissions peuvent être réduites grâce à l'utilisation d'énergies renouvelables et de méthodes agricoles améliorées.

Certains substrats comme les résidus et les algues sont particulièrement prometteurs car ils ne nécessitent pas de sol, l'énergie utilisée pour la culture est économisée et offre un meilleur bilan carbone. (EERE, 2022)

La production de biocarburants est une industrie en croissance rapide dans de nombreuses régions du monde. Jusqu'à présent, l'éthanol et le biodiesel sont les principales alternatives aux carburants fossiles. D'autres biocarburants tels que le bio-butanol, et l'hydrogène à plus long terme sont actuellement à l'étude, et peuvent être considérés comme des carburants de nouvelle génération. (Ambaye et al., 2021)

De nombreux problèmes associés aux biocarburants de première génération pourront être résolus lorsque les procédés de fabrication de biocarburants de deuxième et troisième génération obtenus à partir de résidus (forestiers, agricoles, agroindustriels), cultures non alimentaires ou encore à partir d'algues, seront rentables à l'échelle commerciale. (Khan et al., 2022) Il reste encore d'importants défis écologiques, économiques, sociologiques et politiques à relever notamment :

- Eviter toute concurrence avec les produits alimentaires ;
- Promouvoir la deuxième génération qui offre de meilleurs bilans énergétiques et carbone.
- Améliorer les technologies de transformation de la lignocellulose ;
- Eviter l'utilisation des terrains agricoles fertiles ;
- Réduire les coûts de production
- Réduire la consommation en eau.
- Réduire la consommation des énergies fossiles durant le cycle de production.

# *Chapitre 2*

*La production de bioéthanol à partir de  
substrats complexes*

### 2.1 Propriétés du bioéthanol

Le bioéthanol est un alcool de fermentation de formule moléculaire  $C_2H_5OH$ . Autrement dit, il se réfère à l'alcool éthylique produit par un processus de fermentation microbienne, par opposition à l'essence produit synthétiquement à partir du pétrole. Il est produit par distillation du moût de fermentation des sucres contenus dans la biomasse. Il peut être utilisé comme carburant liquide dans les moteurs à combustion interne, pur ou en mélange avec l'essence.

Le bioéthanol possède les propriétés suivantes :

**Tableau 1** : Propriétés du bioéthanol (Walker, 2010)

|   | <b>éthanol</b>               | <b>Essence Auto</b><br>(issu de la distillation du pétrole) |
|---|------------------------------|---|
| <b>Formule chimique</b>                           | <b><math>C_2H_5OH</math></b> | <b><math>C_7H_{16}</math></b>                               |
| <b>Rapport H/C</b>                                | 3                            | 2,29  |
| <b>Masse molaire (g/mol)</b>                      | 46,07                        | 102,5   |
| <b>Densité (kg/m<sup>3</sup>)</b>                 | 794                          | 735-760   |
| <b>indice d'octane</b>                            | 99                           | 88  |
| <b>PCI (pouvoir calorifique inférieur) (kJ/L)</b> | 21 090                       | 42690   |

Comme le montre le **tableau 1**, l'éthanol a un indice d'octane élevé (99), qui est une mesure de la résistance d'un carburant à l'auto-inflammation, ce qui signifie que les moteurs à combustion interne utilisant de l'éthanol peuvent fonctionner avec un taux de compression élevé donnant une puissance de sortie plus élevée par cycle. L'heptane a un indice d'octane moyen de 88. (Walker, 2010)<sup>a</sup>

Le rapport H/C du bioéthanol est plus important que celui des carburants issus de la distillation du pétrole, lui permettant de réduire les émissions de  $CO_2$  (plus le rapport H/C est important, plus les émissions de  $CO_2$  sont faibles)

Mais, les véhicules roulant au bioéthanol pur parcourent une distance 10 à 20 % inférieure par rapport à ceux roulant à l'essence par litre (kilomètre / litre consommé) sans perte de performances du moteur. (Walker, 2010)<sup>a</sup>

Le bioéthanol est un exemple de biocarburant dans le secteur du transport, il présente les avantages suivants :

- Réduction de la dépendance au pétrole ;
- Permet la diversification agricole ;
- Combustion propre.
- Bilan CO<sub>2</sub> proche de la neutralité ;
- Point d'éclair plus élevé (meilleure sécurité incendie) ;
- Meilleure biodégradabilité ;
- Faibles émissions de GES (~65 % de moins que l'essence)

Néanmoins, le bioéthanol présente quelques inconvénients qui sont :

- Carburant de 1<sup>ère</sup> génération (concurrence le secteur alimentaire) ;
- Exploitation non durable de certaines sources de biomasse ;
- Des bilans énergétiques non satisfaisants ;
- Consommation plus élevée que celle de l'essence ;
- Certains résidus de combustion et émissions peuvent être nocifs.

Ces inconvénients concernent pour la, plus part la filière de première génération, ils peuvent être rectifiés avec le passage à la deuxième et troisième génération qui sont plus durables et ne posent plus le problème d'éthique par rapport à la concurrence avec les produits alimentaires et l'utilisation de terres arables. (Haji Esmaeili et al., 2020)

## 2.2 Substrats de production du bioéthanol

Actuellement, les deux principaux substrats qui sont utilisés à grande échelle pour produire l'éthanol sont le saccharose et l'amidon. Il y a eu un bon nombre de problèmes avec ces deux substrats en termes de capacité des cultures (canne à sucre, betteraves sucrière, maïs) à fournir suffisamment d'éthanol sans compromettre l'approvisionnement en cultures vivrières. Il existe d'autres substrats non alimentaires comme la lignocellulose qui a l'avantage d'être abondante et peu coûteuse, avec un immense potentiel énergétique.

La lignocellulose est la source potentielle la plus abondante pour la production de bioéthanol, avec un rendement potentiel de 442 milliards de litres (Balat et al., 2008). Pour les pays où les cultures énergétiques sont difficiles à cultiver à cause de la forte concurrence avec les cultures vivrières ou par manque de terres ou d'eau, la lignocellulose est une option intéressante.

La lignocellulose peut être obtenue à partir d'arbres ou de plantes terrestres ou aquatiques (Miscanthus, panic raide, sorgho, alpiste, roseau, macroalgues (*ulva*, *gelidium*, *laminaria*)) de résidus de bois (copeaux et sciure, résidus de construction), ou de déchets (boues d'épuration, tiges de maïs, pailles de blé ou de riz, bagasse ou résidus de papeterie ou encore de papier recyclé).

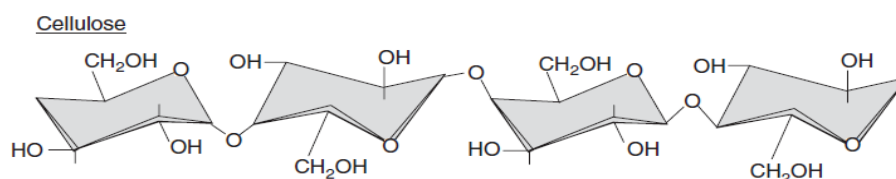
Malheureusement, il n'y a pas de levures productrices d'éthanol, capables de métaboliser la lignocellulose. Cette dernière doit être prétraitée pour éliminer la lignine puis hydrolysée en sucres simples pour être assimilés puis convertis en éthanol par les levures. (Kucharska et al., 2018)

### 2.3 Structure et composition de la biomasse lignocellulosique

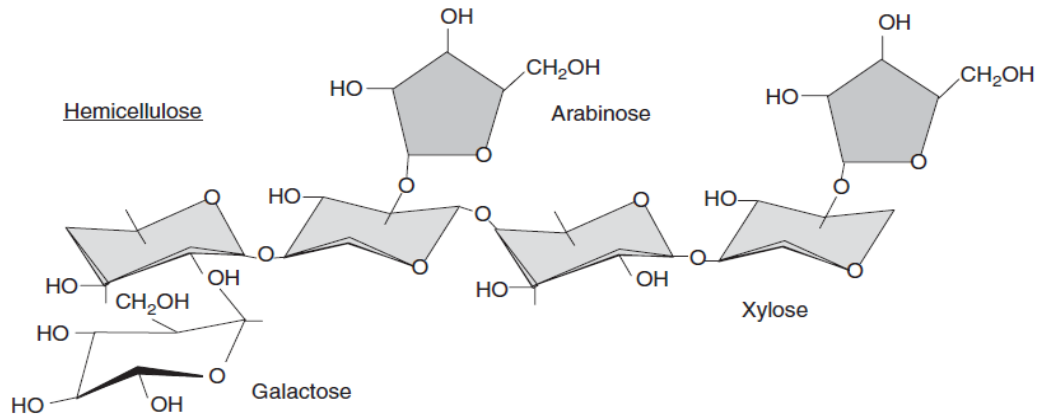
La lignocellulose se compose de trois types de polymères, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine, qui sont les principaux constituants des parois cellulaires végétales.

La paroi cellulaire primaire se compose de fibres de cellulose noyées dans une matrice polysaccharidique d'hémicellulose et de pectine. La cellulose est le composé végétal le plus abondant sur terre, devant la lignine, deuxième composé le plus abondant, cette dernière fournit un soutien mécanique et une protection aux plantes.

La cellulose est un polymère de plusieurs molécules de glucose liées entre elles par des liaisons 1,4-glycosidiques (**figure 2**). L'hémicellulose est un polymère hétérogène avec un squelette de xylose lié en 1,4 mais il contient de courtes chaînes latérales contenant d'autres sucres tels que le galactose, l'arabinose et le mannose (**figure 3**). Le xylose est le sucre prédominant dans les végétaux à bois dur et l'arabinose dans les résidus agricoles. (Scragg, 2009)<sup>b</sup>

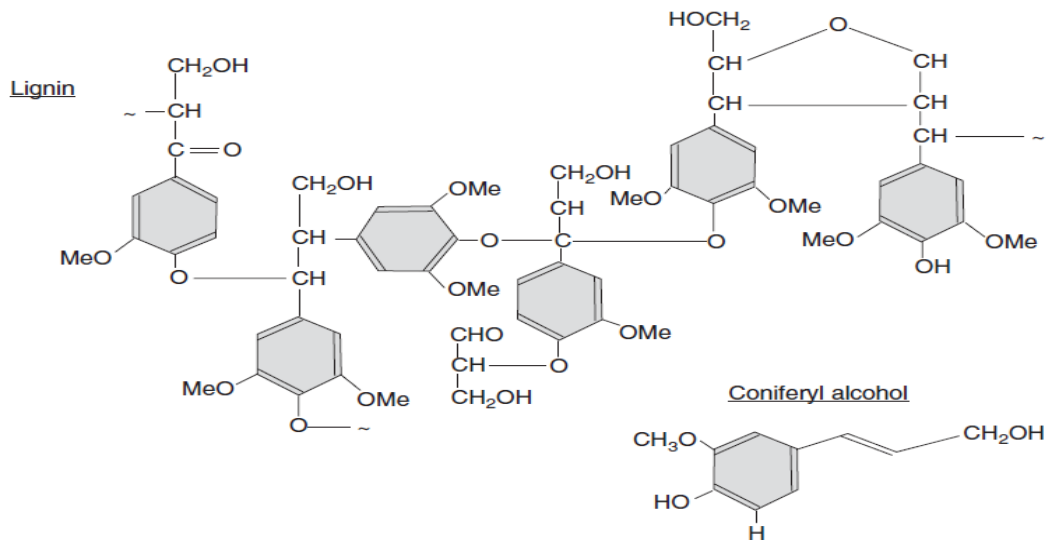


**Figure 2 :** structure moléculaire de la cellulose (Scragg, 2009)<sup>b</sup>



**Figure 3:** structure moléculaire de l'hémicellulose (Scragg, 2009)<sup>b</sup>

La lignine est un polymère hautement ramifié de groupes phényl-propanoïdes tels que le coniféryl d'alcool. (**Figure 4**)

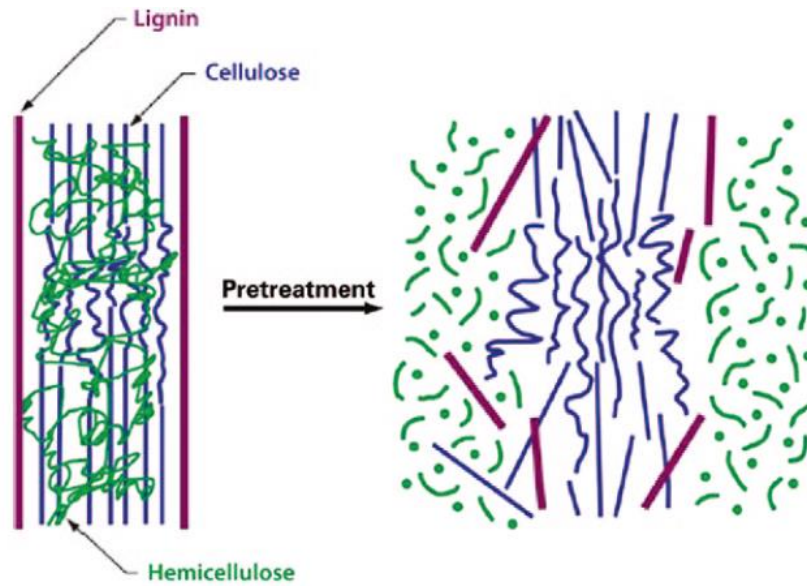


**Figure 4 :** structure moléculaire de la lignine (Scragg, 2009)<sup>b</sup>

#### 2.4 Mécanisme de dégradation de la lignocellulose

Bien que la lignocellulose soit abondante, elle ne peut pas être métabolisée par les levures et doit donc être décomposée en sucres simples avant de pouvoir être utilisée. La lignocellulose est difficile à décomposer en sucres, mais un certain nombre de technologies sont à l'étude, y

compris les enzymes, mais, comme le montre la **figure 5** un prétraitement est nécessaire pour libérer la cellulose et la rendre accessible aux enzymes cellulolytiques. (Mosier et al., 2005),



**Figure 5:** libération de la cellulose sous l'effet du prétraitement de la biomasse lignocellulosique (Mosier et al., 2005)

Après prétraitement, la cellulose est prête à l'hydrolyse enzymatique qui utilise un consortium d'enzymes cellulolytiques, qui fonctionnent dans des conditions à pH 4,8 et une température de 45–50°C et dont le but est de libérer les unités de glucose. (Reis et al., 2023)

L'hydrolyse enzymatique ou saccharification présente le meilleur rendement en sucre parmi les autres méthodes (hydrolyse acide, alcaline) elle a l'avantage d'être très spécifique et de ne pas générer d'inhibiteurs mais reste très onéreuse, elle coûterait environ 4 à 6 cents par litre d'éthanol contre seulement 0.5 à 1 cent par litre d'éthanol pour les amylases utilisées dans la production du bioéthanol à partir de l'amidon. (Bajpai, 2013)<sup>a</sup>

## 2.5 Source microbienne des cellulases

Les cellulases sont un groupe d'enzymes responsables de la dégradation de la cellulose dans la nature. Les cellulases sont produites principalement par des microorganismes (bactéries et champignons) (Lynd et al., 2002), mais aussi par des organismes représentant le règne animal, y compris des insectes, des mollusques, des nématodes et des protozoaires

Les champignons appartenant au genre *trichoderma* sont considérés comme les meilleurs producteurs de cellulases. (Watanabe & Tokuda, 2001)

Les principaux microorganismes producteurs de cellulases sont présentés dans le **tableau 2:**



Tableau 2 : microorganismes producteurs de cellulases (Singhania, 2009)

|                    | Genre               | Espèce  |
|--------------------|---------------------|---|
| <b>Champignons</b> | <i>trichoderma</i>  | <i>T. reesei</i><br><i>T. harzianum</i><br><i>T. longibrachiatum</i>  |
|                    | <i>aspergillus</i>  | <i>A. niger</i><br><i>A. nidulans</i><br><i>A. oryzae</i><br><i>A. aculeatus</i>  |
|                    | <i>fusarium</i>     | <i>Fusarium</i><br><i>F. solani</i><br><i>F. fusosporium</i>  |
|                    | <i>Penicillium</i>  | <i>P. brasilianum</i><br><i>P. occitanis</i><br><i>P. decumbans</i><br><i>P. purpurogenum</i><br><i>P. janthinellum</i> |
| <b>Bactéries</b>   | <i>Acidothermus</i> | <i>A. cellulolyticus</i>  |
|                    | <i>Clostridium</i>  | <i>C. thermocellum</i><br><i>C. acitobutylicum</i><br><i>C. cellulovorans</i>   |
|                    | <i>Bacillus</i>     | <i>B. subtilis</i><br><i>B. megaterium</i>  |
|                    | <i>Pseudomonas</i>  | <i>P. cellulose</i>   |
|                    | <i>Cellulomonas</i> | <i>C. fimi</i><br><i>C. uda</i>   |

## 2.6 Production du bioéthanol à partir de la lignocellulose

La bioconversion des substrats lignocellulosiques en éthanol consiste en quatre grandes opérations unitaires : le prétraitement, la saccharification, la fermentation et la distillation.

### 2.6.1 Le Prétraitement

Le prétraitement est l'étape primordiale pour l'hydrolyse de toute biomasse contenant de la lignocellulose, il permet de modifier la taille macroscopique de la biomasse et sa structure ainsi que sa composition chimique de sorte que la saccharification de la fraction glucidique en sucres monomères puisse être réalisée plus rapidement et avec de meilleurs rendements. (Mosier et al. 2005; Sun & Cheng, 2002)

Les principales méthodes utilisées pour prétraiter la biomasse lignocellulosique sont résumées dans le **tableau 3**.

**Tableau 3** : Principales méthodes de prétraitement de la biomasse lignocellulosique (Scraag, 2009)<sup>c</sup>

| Méthode                     | Principe   |
|-----------------------------|--|
| <b>Explosion de vapeur</b>  | -La biomasse est traitée avec de la vapeur à haute température et à haute pression, avec de préférence un ajout de faible quantité d'acide sulfurique à faible concentration.<br>-Le rendement en sucre libéré est bon<br>- Cette méthode est moyennement énergivore |
| <b>broyage mécanique</b>    | - broyage des matériaux lignocellulosiques en petites particules afin d'augmenter la surface et améliorer l'efficacité du traitement enzymatique ultérieur<br>- très énergivore.<br>-moins efficace que les autres méthodes.   |
| <b>Explosion d'ammoniac</b> | -La lignocellulose est broyée et placée dans un récipient contenant de l'ammoniac (1 à 2 kg/kg de biomasse) à des pressions de 12 atmosphères pendant 30 min rendant la cellulose très accessible aux enzymes.   |
| <b>Traitement acide</b>     | -Le traitement acide (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCL) convertit l'hémicellulose en sucre (xylose) (80–95 %) et augmente la digestibilité de la cellulose.  |
| <b>Traitement alcalin</b>   | - Le traitement alcalin réduit la teneur en lignine et en hémicellulose<br>- augmente également la surface de la biomasse.   |

### 2.6.2 La Saccharification

La saccharification est un processus qui a pour but la destruction de la cellulose en unités de glucose, pour pouvoir être assimilée par la levure durant la fermentation alcoolique. (Bajpai, 2013)<sup>b</sup>

- **Saccharification à l'acide concentré**

L'hydrolyse acide concentrée de la cellulose donne une conversion rapide et complète en glucose en utilisant de l'acide sulfurique à 70 % pendant 2 à 4 h. Les problèmes sont liés aux difficultés de la manipulation de l'acide sulfurique concentré et au coût de l'acide, qui nécessite récupération et réutilisation pour être économique. (Scaag, 2009)<sup>d</sup>

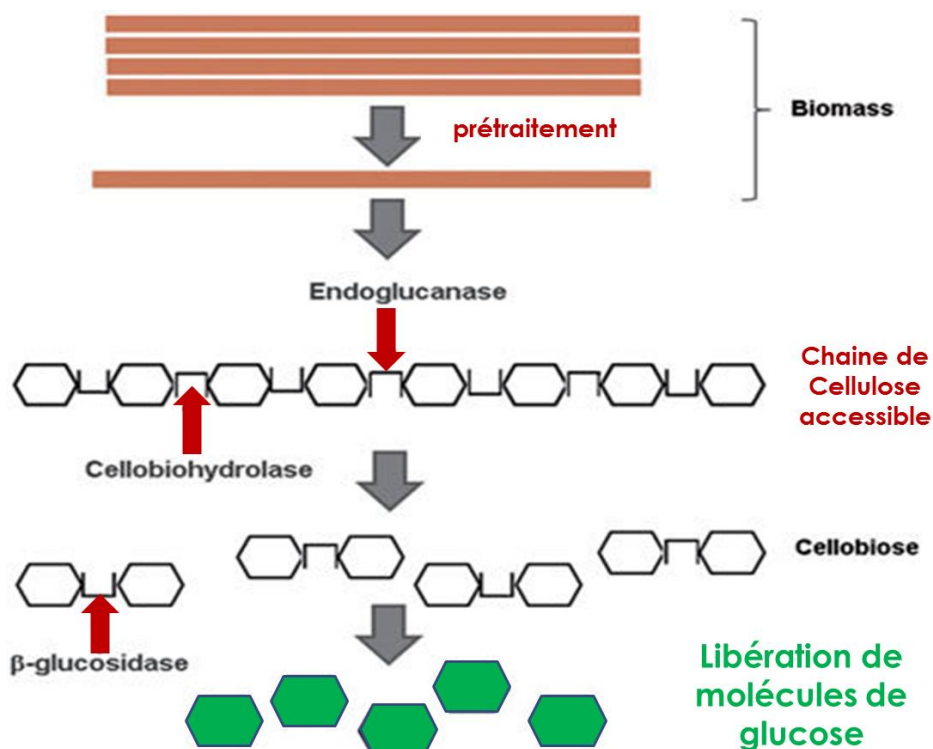
- **Saccharification à l'acide diluée**

La cellulose est décomposée par un acide dilué dans une réaction complexe à une température élevée, cette méthode présente facilite la digestion de la cellulose mais présente l'inconvénient de dénaturer quelque sucres ce qui diminue de son efficacité, le taux de saccharification est d'environ 50 %. (Sun & Cheng, 2002)

- **Saccharification enzymatique**

Durant la saccharification enzymatique ce sont les enzymes qui hydrolysent les liaisons osidiques de la cellulose pour libérer les molécules de glucose, cette saccharification est menée à un pH de 4,8 et une température de 45–50°C.

Ces enzymes sont généralement obtenues à partir de champignons tels que *Trichoderma reesei*.



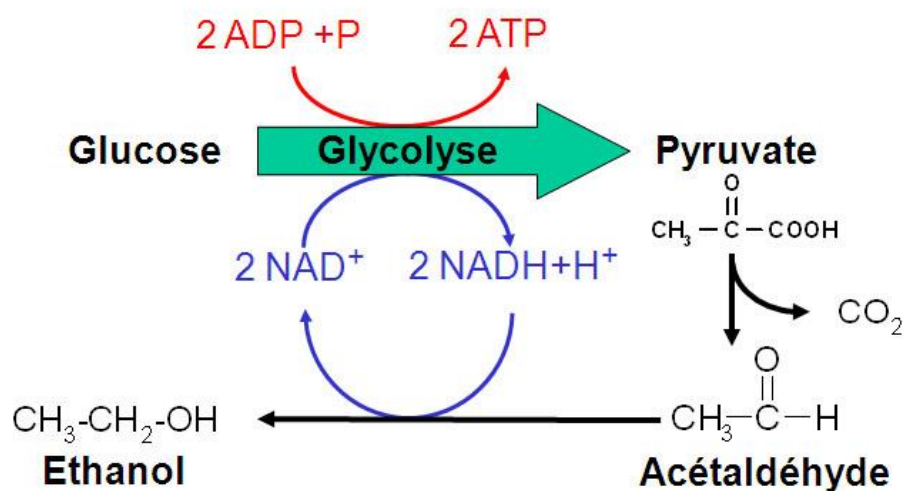
**Figure 6** : Mécanisme d'action des enzymes cellulolytiques

Trois enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse (**Figure 6**): les **endo-1,4- $\beta$ -glucanases** (endoglucanases), les **cellobiohydrolases** (exoglucanases) et les  **$\beta$ -glucosidases**. Les endoglucanases clivent la chaîne cellulosique aléatoirement, les exoglucanases hydrolysent la chaîne cellulosique en libérant du glucose et du cellobiose tandis que les  $\beta$ -glucosidases catalysent la conversion du cellobiose en glucose.

L'hydrolyse enzymatique a l'avantage d'être spécifique, d'avoir un excellent taux de saccharification et de ne pas générer d'inhibiteurs, le seul inconvénient reste le coût élevé de ces enzymes. (Bajpai, 2013)<sup>a</sup>

### 2.6.3 La Fermentation

*Saccharomyces cerevisiae* est de loin le microorganisme le plus couramment utilisé pour la production du bioéthanol à partir de matières premières à base de sucre et d'amidon ou de lignocellulose. Elle produit de l'éthanol avec de bons rendements et tolère un large éventail d'inhibiteurs et de pression osmotique. *Zymomonas mobilis* a été également considéré comme le futur microorganisme producteur d'éthanol grâce à sa haute tolérance à l'éthanol (jusqu'à 14 % v/v), son efficacité énergétique, et sa productivité élevée en éthanol.



**Figure 7:** Mécanisme de la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae*

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* la fermentation alcoolique commence par l'étape de la glycolyse durant laquelle une molécule de D-glucose donne deux molécules

de pyruvate. *S. cerevisiae* fabrique deux molécules d'ATP à partir de deux molécules d'ADP et de deux radicaux phosphate ( $P_i$ ) par phosphorylation. (**Figure 7**)

De chaque molécule de pyruvate, une molécule  $CO_2$  est libérée par l'enzyme décarboxylase du pyruvate. L'acétaldéhyde produit lors de cette étape subit une réduction pour produire de l'éthanol par l'enzyme alcool déshydrogénase. Cette production a lieu dans le cytoplasme de la levure. (Valera et al., 2020)

Pour être économiquement viable, la production du bioéthanol notamment lignocellulosique se doit d'utiliser des microorganismes fermenteurs à haut rendement en éthanol, tolérants aux inhibiteurs et de préférence capables de fermenter les hexoses et les pentoses (Vatankhah Barenji et al., 2014)

L'utilisation complète du substrat est une condition préalable à la compétitivité économique des procédés de fermentation lignocellulosique. *S. cerevisiae* est capable de fermenter uniquement des hexoses et ne peut pas utiliser des pentoses comme le xylose, qui est le composant principal de la fraction hémicellulosique de la lignocellulose, et peut contribuer jusqu'à 30 % de la biomasse totale.

La fermentation de la biomasse prétraitée peut s'effectuer selon trois différents processus :

- Hydrolyse et fermentation séparées (SHF).
- Saccharification et fermentation simultanées (SSF).
- Saccharification et co-fermentation simultanées (SSCF).
- ***Hydrolyse et fermentation séparées (SHF)***

L'hydrolyse enzymatique effectuée séparément de l'étape de fermentation est désignée par l'abréviation anglaise SHF (hydrolyse et fermentation séparées) (Wingren et al., 2003). La séparation de l'hydrolyse et de la fermentation offre divers avantages de traitement et d'opportunités. Il permet aux enzymes de fonctionner à une température plus élevée pour augmenter les performances des organismes de fermentation, et optimiser l'utilisation des sucres.

- ***Saccharification et fermentation simultanées (SSF)***

L'un des progrès les plus importants dans la production d'éthanol a été le développement de la saccharification et fermentation simultanées (SSF). Dans ce système, la levure fait fermenter

le glucose produit à l'aide de cellulases dans la même enceinte et en même temps. Les enzymes ne subissent donc pas de rétro-inhibition de leurs produits, le glucose est consommé au fur et à mesure qu'il est produit durant la fermentation. Cela a pour effet d'augmenter le taux d'hydrolyse, de réduire les quantités d'enzymes utilisées, et de raccourcir le temps de traitement. Les inconvénients de ce système est la différence des conditions optimales pour les enzymes et les levures. La cellulase normalement opère à 40–50°C, tandis que la fermentation des levures est effectuée à 30°C. La meilleure solution pour éviter cet inconvénient est d'utiliser des levures *saccharomyces cerevisia* ou *Kluyveromyces marxianus* thermo-tolérantes.

Les microorganismes les plus utilisés en SSF sont souvent *T. reesei* qui fournit les enzymes et *S. cerevisiae* pour la fermentation, à une température de 38°C. Cette température est un compromis entre la température optimum de la fermentation, de 30°C et celle de la saccharification à 45–50°C. (Scaag, 2009)<sup>c</sup>

- **Saccharification et co-fermentation simultanées (SSCF)**

Dans ce processus, la saccharification et la fermentation se font également dans la même enceinte et en même temps, la différence avec la SSF est que la fermentation concerne les hexoses (glucose) et des pentoses (xylose). Peu de microorganismes sont capables de faire cette co-fermentation, comme *Pichia stipitis* et *Brettanomyces clausenii* et dans d'autres cas, des micro-organismes recombinants ont été utilisés comme *E. coli* K011, *Klebsiella oxytoca*, and *Zymomonas mobilis*. (Irfan et al., 2014)

#### 2.6.4 Distillation

La distillation est une étape nécessaire pour concentrer le mélange en fin de fermentation qui ne contient que 10% d'éthanol. Le biocarburant doit contenir au moins 95% d'éthanol pour pouvoir être utilisé en mélange. La distillation se fait par le chauffage des solutions fermentées contenant 10% d'éthanol, une concentration enrichie à 95,6% d'éthanol peut être obtenue.

Pour produire de l'éthanol anhydre une distillation supplémentaire est nécessaire en présence de benzène ; on obtient alors de l'éthanol pur, le benzène peut être récupéré et réutilisé. (Cardona & Sanchez, 2007)

# *Chapitre 3*

*Les Algues Pour Produire Le Bioéthanol De  
3<sup>eme</sup> Génération*

### 3.1. Bioéthanol de 3<sup>ème</sup> génération

L'éthanol de troisième génération est produit à partir d'algues (Horn et al., 2000). Les Extraits algaux sont fermentés en éthanol par conversion de la cellulose, de l'hémicellulose, du mannitol et des laminarines. Les espèces de macroalgues les plus connues pour la production du bioéthanol sont *Ulva lactuca*, *ulva pertusa*, *ulva fasciata* (algues vertes), *Kappaphycus alvarezii*, *Gelidium amansii*, *Gelidium elegans*, *Gracilaria salicornia* (algues rouges), *Laminaria japonica*, *Laminaria hyperborean*, *Saccharina latissima*, *Sargassum fulvellum*, *Undaria pinnatifida*, *Alaria crassifolia* (algues brunes). (Daroch et al., 2013)

Le bioéthanol de troisième génération peut également être produit à partir de l'amidon contenu dans certaines microalgues comme *Chlorococcum infusionum*, *Chlamydomonas reinhardtii*, et *Chlorella vulgaris*.

**Tableau 4 :** Types d'hydrolyse appliquée aux macroalgues.

| Espèce de macroalgue          | Type d'hydrolyse  | Microorganisme de fermentation  | Rendement (g éthanol/g glucose) | Rendement en éthanol / rendement théorique maximal (%) | références               |
|-------------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|--|--------------------------|
| <i>Eucheuma cottonii</i> ,    | Acide<br>(5% d'acide sulfurique<br>25 % g/v d'algue,<br>autoclavage à 100°C,<br>2h) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,046                           | 9,01   | (Candra, 2011)           |
| <i>Undaria pinnatifida</i>    | Acide<br>(90mM d'acide sulfurique, 8 % g/v d'algue, autoclavage à 120°C, 45 min)    | <i>Pichia angophorae</i>        | <b>0,330</b>                    | 64,70  | (Cho, et al.,2013)       |
| <i>Gelidium amansii</i>       | Acide<br>(75mM d'acide sulfurique, 13 % g/v d'algue, autoclavage à 120°C, 1h)       | <i>Brettanomyces custersii</i>  | <b>0,380</b>                    | 74,50  | (Cho et al., 2014)       |
| <i>Gracilaria salicornia</i>  | Enzymatique<br>(15 FPU/g d'algue,<br>45°C, 96h)                                     | <i>Eschericia coli</i>          | 0,079                           | 15,49  | (Yang et al., 2015)      |
| <i>Gracilaria verrucosa</i> , | Enzymatique<br>(15 FPU/g d'algue,<br>45°C, 96h)                                     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <b>0,430</b>                    | 84,31  | (Kumar et al., 2013)     |
| <i>Ulva fasciata</i>          | Enzymatique<br>(15 FPU/g d'algue,<br>45°C, 96h)                                     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <b>0,450</b>                    | 88,23  | (Trivedi et al.,2015)    |
| <i>Ulva lactuca</i>           | Enzymatique<br>(20 FPU/g d'algue,<br>45°C, 96h)                                     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <b>0,41</b>                     | 80,39  | (Allouache et al., 2021) |



Le processus le plus suivi pour la production du bioéthanol à partir des macroalgues utilise un prétraitement classique à l'acide dilué (autoclavage d'une solution contenant 13 % (g/v) de poudre d'algue et 1 mL d'acide sulfurique), ensuite une hydrolyse enzymatique utilisant un cocktail enzymatique de cellulases, puis une fermentation en mode SHF ou SSF utilisant *saccharomyces cerevisiae*.

Des protocoles différents peuvent être appliqués comme l'utilisation d'une hydrolyse acide à l'acide sulfurique à la place des enzymes, ou l'utilisation d'autres microorganismes de fermentation comme *Brettanomyces custersii*, *Pichia angophorae*, ou encore *Zymomonas mobilis*.

D'après le **tableau 4** ci-dessus, le meilleur processus de production du bioéthanol à partir des macroalgues comprend l'application d'une hydrolyse enzymatique avec une fermentation utilisant *Saccharomyces cerevisiae*, montrant ainsi un bon rendement d'éthanol par rapport au sucre consommé proche du rendement théorique maximal pouvant être obtenue et qui est de 0,51 g d'éthanol/g de glucose. (Chin & Hng, 2013)

### 3.2. Potentiel des Macroalgues pour la production du bioéthanol

L'émergence du bioéthanol de troisième génération apporte plus avantages par rapport à la première et à la deuxième génération. Le bioéthanol de troisième génération est axé sur l'utilisation des organismes marins tels que les algues (Carriquiry et al., 2011). La capacité des algues à fournir de la biomasse pour la production de bioéthanol est positive car elle limite la concurrence avec les matières premières alimentaires et les terres agricoles, en plus de l'immense rendement qu'elles peuvent avoir allant jusqu'à 365 tonnes de biomasse sèche par hectare et par an pouvant donner plus de 3300 litres de bioéthanol. (Schenk et al., 2008)

Les algues représentent une matière première prometteuse grâce à sa haute teneur en glucides et sa culture relativement facile dans une grande variété d'environnements aquatiques, en plus de leur capacité à absorber le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) (Singh et al., 2011).

Du point de vue composition, les macroalgues contiennent de fortes teneurs en glucides (**Tableau 5**)

**Tableau 5** : Taux de glucides de quelques espèces de macroalgues (Dragone et al., 2010)

| Espèce de macroalgue         | Taux de glucides ((%)/masse sèche) |
|------------------------------|------------------------------------|
| <i>Eucheuma cottonii</i>     | 26                                 |
| <i>Gelidium amansii</i>      | 66                                 |
| <i>Laminaria japonica</i>    | 51                                 |
| <i>Sargassum ilicifolium</i> | 32–33                              |
| <i>Ulva lactuca</i>          | 59                                 |
| <i>Undaria pinnatifida</i>   | 43                                 |

La forte teneur des algues en glucides rend le rendement en bioéthanol excellent d'autant plus que la biomasse algale est plus facile à prétraiter à cause de son faible taux de lignine faisant d'elle une excellente matière première pour la production du bioéthanol algal.

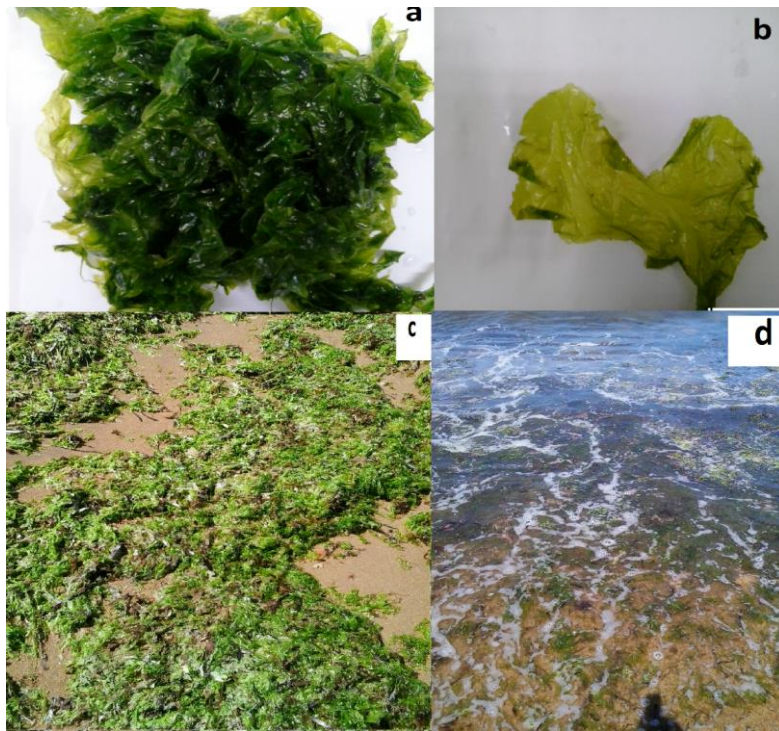
### 3.3. Potentiel de l'Algérie en biomasse marine à fort potentiel énergétique

L'Algérie est un pays avec une face maritime qui s'étend sur 1600 Km. Plusieurs travaux ont été réalisés dans le but d'inventorier la totalité de cette flore algale marine (Tebbal, 2011). Les premières études remontent à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle auxquelles se sont ajoutées celles de Boudouresque et Séridi (1989). Plus de 468 taxons ont été inventoriés à partir de tous les travaux regroupés, divisés entre macroalgues vertes, brunes et rouges. Selon (Séridi, 2007), la flore algale de l'Algérie reste peu étudiée. En adoptant la méthode phytosociologique, cet auteur signale que le nombre d'algues a légèrement augmenté (497espèces). Cependant, ces travaux algologiques sont essentiellement de type inventaire floristique. Par ailleurs, des contributions d'ordre chimique ont porté sur l'extraction et la purification des alginates chez *Cystoseira* sp. des côtes algériennes (Benchabanne, 2006) et sur la détermination des stérols d'une algue rouge (El Hattab-Bouzidi, 2003).

La valorisation de la biomasse algale est classée parmi les programmes internationaux les plus intéressants dans l'exploitation du milieu marin. En outre, c'est devenu une application de routine dans certains pays en tant que substrat énergétique pour la production des biocarburants, plus particulièrement le bioéthanol. (Chynoweth, 2002)

### 3.4. Potentiel de la macroalgue *ulva lactuca*

Parmi les algues vertes *Ulva lactuca*, est l'une des plus abondantes. C'est une algue verte marine, avec un thalle aux feuilles irrégulières, de couleur allant du vert foncé au vert ou jaune clair (**Figure 8**). Sa taille varie généralement entre 20 et 60 cm de long et peut atteindre un mètre dans les eaux riches en matière organique. (Yang & Wyman, 2009). La laitue de mer pousse généralement sur l'étage supralittoral, mais peut pousser jusqu'à 10 m de profondeur, sur des rochers, des coquillages et même sur d'autres algues. Cette algue se retrouve souvent sur le rivage des plages car elle est arrachée par les courants et se dépose dessus. (Gayral, 1975 )



**Figure 8:** Photo de *Ulva lactuca* récolté (a, b) au port de la madrague, (c, d) sur les côtes de Bouharoun

En Algérie, elle est présente presque sur tout le long du littoral. D'une durée de vie de quelques mois mais peut être trouvée toute l'année, car elle se renouvelle au printemps et en été. (Yaich et al., 2011) *Ulva lactuca* recèle jusqu'à 60 à 65 % de glucides (proportions comparables à celles rencontrées dans le blé ou le maïs) et 4 à 5 % de lipides. En outre, elle a un faible taux de lignine et affiche un taux de croissance élevé, une adaptabilité à différents

climats, un rendement élevé en biomasse et un besoin négligeable en eau douce, ce qui en fait un excellent substrat pour la production de bioéthanol. (Bobin-Dubigeon et al., 1997)

Le potentiel des macroalgues comme matière première pour la production du bioéthanol gagne de l'intérêt de jour en jour, cependant, des défis restent encore à relever avant que ces sources puissent être économiquement viables. (G. del Río et al., 2020) Bien que les algues représentent déjà une part importante de ressource économique la production commerciale de macroalgues reste une activité mineure. Le potentiel de production de biomasse algale est loin d'être réalisé, malgré la disponibilité potentielle de ressources terrestres, côtières et océaniques pour leur fabrication. Le potentiel de culture d'algues comme matière première énergétique se compare favorablement avec d'autres ressources végétales terrestres pour la production du bioéthanol. (Baghel et al., 2021)

Les défis les plus importants pour l'utilisation des algues comme source d'énergie renouvelable alternative sont : la culture d'algues à grande échelle avec la disponibilité de l'eau, de CO<sub>2</sub>, et des ressources nutritives appropriées, la réduction de la consommation en énergie fossile durant le cycle de production, pour assurer des bilans carbone et énergie favorables, la sélection de microorganismes cellulolytiques ou encore de microorganismes capables de fermenter les C5 pour augmenter le taux d'éthanol. (Baghel et al., 2017)

# *Chapitre 4*

## **Matériels et Méthodes**

---

## MATERIELS ET METHODES

### 4.1 MATERIEL

#### 4.1.1 Matière première pour la production du bioéthanol

La biomasse utilisée pour produire le bioéthanol est une macroalgue de l'espèce *ulva lactuca*, elle a été collectée à Bouharoun (Tipaza-Algérie), qui se trouve à une cinquantaine de kilomètres à l'ouest de la capitale Alger.

#### 4.1.2 Levure de fermentation

La levure utilisée pour fermenter les hydrolysats de macroalgues est *saccharomyces cerevisiae* (levure de boulanger).

#### 4.1.3 Milieux de culture

Différents milieux de cultures ont été utilisés pour isoler et /ou cultiver les souches de champignons ou les levures de fermentation, ces milieux de cultures sont : milieu PDA (Potato Dextrose Agar), milieu czapek glucose, milieu czapek cellulose (CMC), Milieu czapek cellulose (papier), milieu MEA (Malt Extract Agar), milieu MYA (Malt yeast Agar)

#### 4.1.4 Enzymes

Deux types d'enzymes ont été utilisés : des enzymes commerciales comme la Celluclast, la Novozyme, et la  $\beta$  glucosidase et un surnageant enzymatique obtenu de la culture de *Trichoderma sp*, un champignon isolé au laboratoire Bioénergies et Environnement du CDER.

### 4.2 METHODES

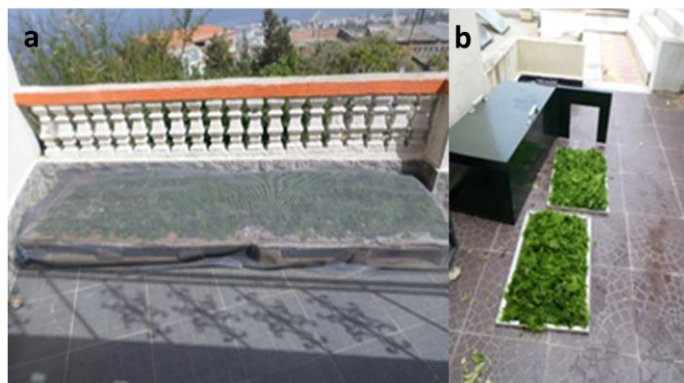
#### 4.2.1 IDENTIFICATION ET ETUDE DE LA COMPOSITION DE LA MACROALGUE *ULVA LACTUCA*

##### 4.2.1.1 Récolte et conservation de la macroalgue *ulva lactuca*

Des échantillons d'*ulva lactuca* ont été collectés à Bouharoun (**Figure 9**) (Tipaza-Algérie), qui se trouve à une cinquantaine de kilomètres à l'ouest de la capitale Alger. Les échantillons ont été transportés, lavés, trempés dans de l'eau pour éliminer le sel, séchés (**Figure 10**) et broyés (**Figure 11**).

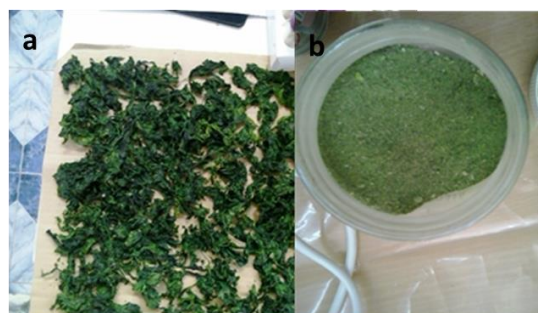


**Figure 9:** Récolte des algues à Bouharoun (Tipaza)



**Figure 10:** Sechage des macroalgues (a) à l'air libre et (b) sur des clés de séchage (séchoir solaire)

La poudre obtenue a une taille comprise entre 180  $\mu\text{m}$  et 850  $\mu\text{m}$  (la fraction utilisée passait au travers d'un tamis de 850  $\mu\text{m}$  et était retenue par un tamis de 180  $\mu\text{m}$ ), cette fraction était conservée pour des expériences ultérieures.



**Figure 11 :** Photo de *Ulva lactuca* (a) après 24 h de séchage et (b) après broyage

#### 4.2.1.2 Identification de la macroalgue

L'algue récoltée a fait l'objet d'une étude d'identification macroscopique, ou l'aspect a été étudié (longueur, largeur, couleur, épaisseur, aspect des bordures), puis une identification microscopique avec observation de l'aspect des cellules et des chloroplastes de la macroalgues sous microscope ( $\times 40$ ).

Un coupe transversale a été réalisée pour observer l'alignement des cellules.

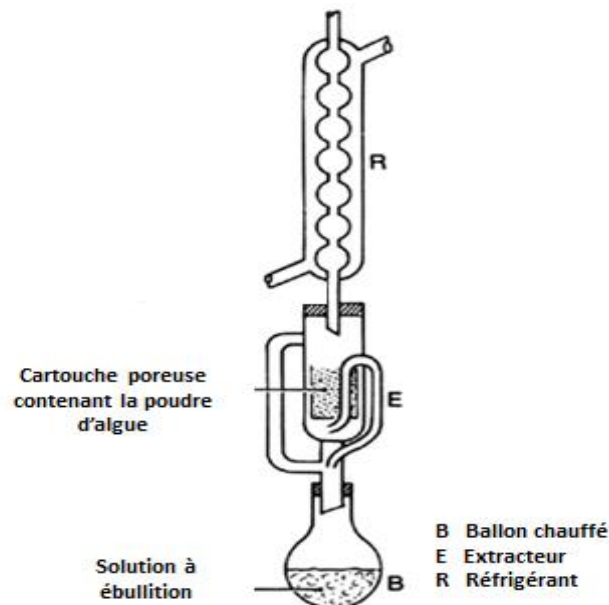
#### 4.2.1.3 Etude de la composition de *ulva lactuca* en polysaccharides

La composition de *ulva lactuca* a été déterminée selon 2 méthodes d'analyse standard de la biomasse (LAP) *Laboratory Analytical Procedure* développée par le *National Renewable Energy Laboratory* américain (NREL), la première vise à déterminer les composés extractibles *Determination of Extractives in Biomass* et la deuxième à déterminer le taux de lignine et de sucres *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. Ces deux méthodes standardisées sont très suivies pour la détermination des composés extractibles, carbohydrates de structure et de la lignine contenues dans la biomasse lignocellulosique. (Sluiter et al., 2011) (Sluiter et al., 2005)

##### 4.2.1.3.1 Procédure de détermination des composés extractibles (solubles) dans l'eau et dans l'éthanol

Pour la détermination des composés extractibles de la poudre d'algue ; 4 ballons de 500ml, ont été lavés et séchés dans une étuve à  $105 \pm 5^\circ\text{C}$  durant 12h, ils ont été pesés et remplis avec  $190 \pm 5$  ml d'eau (ou éthanol) puis placés dans le soxhlet (**Figure 12**). D'un autre côté, 4 cartouches de cellulose (100 mm  $\times$  33mm) dont la porosité est de 5  $\mu\text{m}$  contenant chacune 5g de poudre d'algue ont été placées dans un soxhlet. (Sluiter et al., 2011)





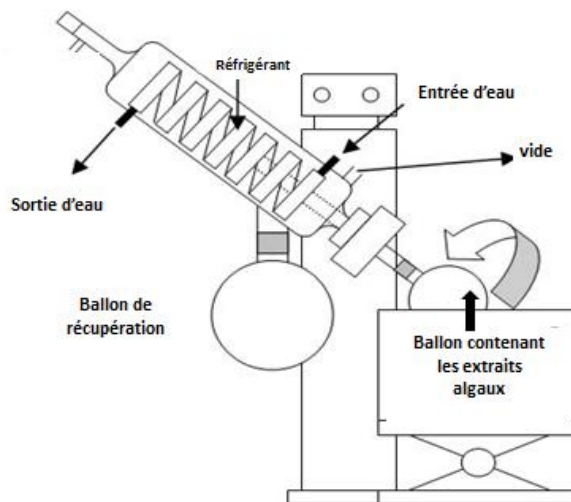
**Figure 12:** Montage de l'extraction de la poudre d'algue dans un soxhlet

L'extraction est arrêtée quand la couleur du solvant (eau ou éthanol) autour de la cartouche de cellulose devient transparente, elle est le seul indicateur du passage de tous les composants solubles dans le ballon et de la fin du processus d'extraction.

En fin d'extraction les ballons ont été récupérés, et le volume est mesuré, le taux de sucre a été mesuré par HPLC avec et sans prétraitement acide (ajout de 1 ml d'acide sulfurique 72%), sous les conditions suivantes :

- Volume d'injection: 10-50  $\mu\text{L}$ .
- Phase mobile: eau grade HPLC, 0.2  $\mu\text{m}$  filtrée et degazée.
- Débit : 0,6 mL /minute.
- Température de la colonne: 80-85°C.
- Température du détecteur : 80 °C.
- Durée de l'analyse : 35 min.

Les ballons contenant l'extrait d'algues ont été mis dans un évaporateur rotatif (**Figure 13**) à tour de rôle jusqu'à ce le solvant (eau ou éthanol) soit totalement évaporé. (Sluiter et al., 2011)



**Figure 13:** Rota-évaporation des extraits algaux

Après évaporation des solvants (eau et ethanol ) les ballons ont été séchés à l'étuve à 105°C. (Sluiter et al., 2011)

#### 4.2.1.3.2 Procédure de détermination des carbohydrates de structure et de la lignine dans la poudre d'*ulva lactuca*

Les cartouches de cellulose ont été récupérées, les algues qu'elles contiennent ont été récupérées, séchées, pour subir un prétraitement préalable pour analyse des sucres contenus dans la poudre d'algue.

De cette poudre d'algue séchée, 3g ont été mis dans des tubes en verre avec ajout de 3ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 72%.

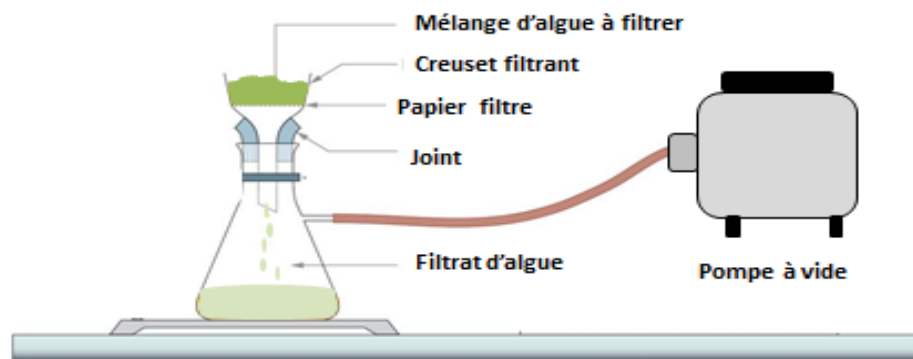
Les tubes ont été mis dans un bain à 30°C pendant 1h, c'est cette étape qu'on désigne par prétraitement à basse température

Une fois les tubes retirés du bain, 84 mL d'eau ont été ajoutés dans chaque tube qui ont subi un autoclavage pendant 1h à 120°C puis un refroidissement dans un bain d'eau glacée. (Sluiter et al., 2011)

Les solutions contenues dans les tubes ont été filtrées à l'aide d'un creuset filtrant muni d'un papier filtre. (Figure 14).

Les premières gouttes sont récupérées pour être analysées par HPLC sous les conditions suivantes :

- Volume d'injection: 10-50  $\mu\text{L}$ .
- Phase mobile: HPLC grade water, 0.2  $\mu\text{m}$  filtered and degassed
- Debit : 0,6 mL /minute.
- Température de la colonne: 80-85°C.
- Température du détecteur : 80 °C.
- Durée de l'analyse : 35 min.



**Figure 14 :** Filtration des hydrolysats d'algues.

Les algues récupérées sur le creuset (résidus) ont été séchées à 105°C pendant 12h puis mises dans un four à moufle à 575°C pendant 4h pour le calcul du taux de cendres.

- **Méthodes de calcul :**

- **Calcul du taux d'extraction**

Le taux d'extraction est calculé selon la formule (1) (Sluiter et al., 2011)

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = \frac{\text{Poids du résidu} \times \text{Volume extrait}}{\text{Volume perdu} \times \text{Poids sec}} \times 100 \quad (1)$$

Le pourcentage en sucre a été calculé à partir de la concentration des monosaccharides obtenue par analyse HPLC en g/L suivant les équations (2) et (3) (Sluiter et al., 2011)

$$\text{taux de sucres (\%)} = \frac{(\% \text{ SUCRE ss comps extrt} \times (100 - (\% \text{ d'extraction})))}{100} \quad (2)$$

$$\text{taux de SUCRES ss comps extrt (\%)} = \frac{C_{\text{HPLC}} \times V_f}{P_s} \times 100 \quad (3)$$

% sucre<sub>ss comps extrt</sub> = fraction de sucre sans les composés extractibles dans l'eau ou l'éthanol

C<sub>HPLC</sub> = concentration des sucres déterminée par HPLC en g/L.

V<sub>f</sub> = volume du filtrat (L).

P<sub>s</sub> = poids sec (g)

La composition en polysaccharides a été déterminée selon les équations (4), (5) et (6) : (Sluiter et al., 2011)

- **Calcul du taux de sucres**
  - **Taux de cellulose**

$$\text{Taux de Cellulose (\%)} = \text{taux de glucanes totale} - \text{taux d'amidon} \quad (4)$$

$$\text{taux de glucane total (\%)} = \frac{\text{taux de glucose}}{1.1} \quad (5)$$

○ **Taux d'hémicellulose**

$$\text{Taux d'hémicellulose (\%)} = \left( \frac{\text{taux de xylose}}{1.13} \right) + \left( \frac{\text{taux de galactose}}{1.1} \right) + \left( \frac{\text{taux de mannose}}{1.1} \right) + \left( \frac{\text{taux d'arabinose}}{1.13} \right) \quad (6)$$

• **Taux de cendre**

La taux de cendre a été calculé selon l'équation (7) : (Sluiter et al., 2005)

$$\text{taux de cendres (\%)} = \left( \frac{P_{c+cn} - P_c}{P_s} \right) \times 100 \quad (7)$$

$P_{c+cn}$  = poid du creuset + cendre (g)

$P_c$  = Poid du creuset (g)

$P_s$  = poid sec (g)

• **Taux de lignine**

La lignine totale se compose de deux fractions : la lignine soluble et la lignine insoluble dans l'acide. La lignine totale a été calculée selon l'équation (8) (Sluiter et al., 2005)

$$\% \text{ lignine}_T = \% \text{ lignine}_{SA} + \% \text{ lignine}_{IA} \quad (8)$$

Lignine<sub>SA</sub> = lignine soluble dans l'acide.

Lignine<sub>IA</sub> = lignine insoluble dans l'acide.

Pour mesurer la teneur en lignine, la solution préalablement hydrolysée préparée pour la détermination des glucides a été refroidie et filtrée à travers un creuset filtrant. Pour déterminer la lignine insoluble dans l'acide, le creuset a été séché à  $105 \pm 3$  °C jusqu'à obtention d'un poids sec constant, puis refroidi et placé dans un four à moufle à  $575 \pm 25$  °C pendant  $24 \pm 6$  heures (pour le calcul du taux de cendre essentiel pour le calcul du taux de lignine). Après avoir été refroidi, le poids du creuset a été enregistré puis remis dans le four jusqu'à un poids constant. (Sluiter et al., 2011)

Le taux de lignine insoluble dans l'acide a été calculé selon l'équation (9) (Sluiter et al., 2011)

$$\text{taux de lignine IS (\%)} = \left( \frac{(P_c + bs - P_c) - (P_c + cndr - P_c)}{P_s} \right) \times 100 \quad (9)$$

$P_c + bs$  = poids du creuset + biomasse apres séchage à 105°C (g)

$P_c$  = Poid du creuset (g)

$P_{c+cndr}$  = Poid du creuset + cendre (g)

$P_s$  = Poid sec (g)

La teneur en lignine soluble dans l'acide a été réalisée en mesurant l'absorbance de la solution préalablement hydrolysée (pour mesurer la teneur en glucides), sur un spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 205 nm, avec un facteur de dilution de 40 pour amener l'absorbance dans la gamme de 0,2 –0.7. (TAPPI et al., 2002)

Le taux de lignine soluble dans l'acide a été calculé selon l'équation (10) :

$$\% \text{ lignine }_{SA} = (UV \text{ abs} \times Vf \times D) / (\epsilon \times Ps) \times Ec \times 100 \quad (10)$$

UV abs = absorbance a 205 nm

$V_f$  = volume du filtrat (0,087 L)

$D$  = dilution (40)

$P_s$  = Poids sec (g)

$\epsilon$  = coefficient d'extinction = 110 (L. g<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>) pour les absorbances entre 0,2 et 0,7 à 205 nm) (TAPPI, 2002)

$E_c$  = Epaisseur de la cuve du spectrophotomètre (1 cm)

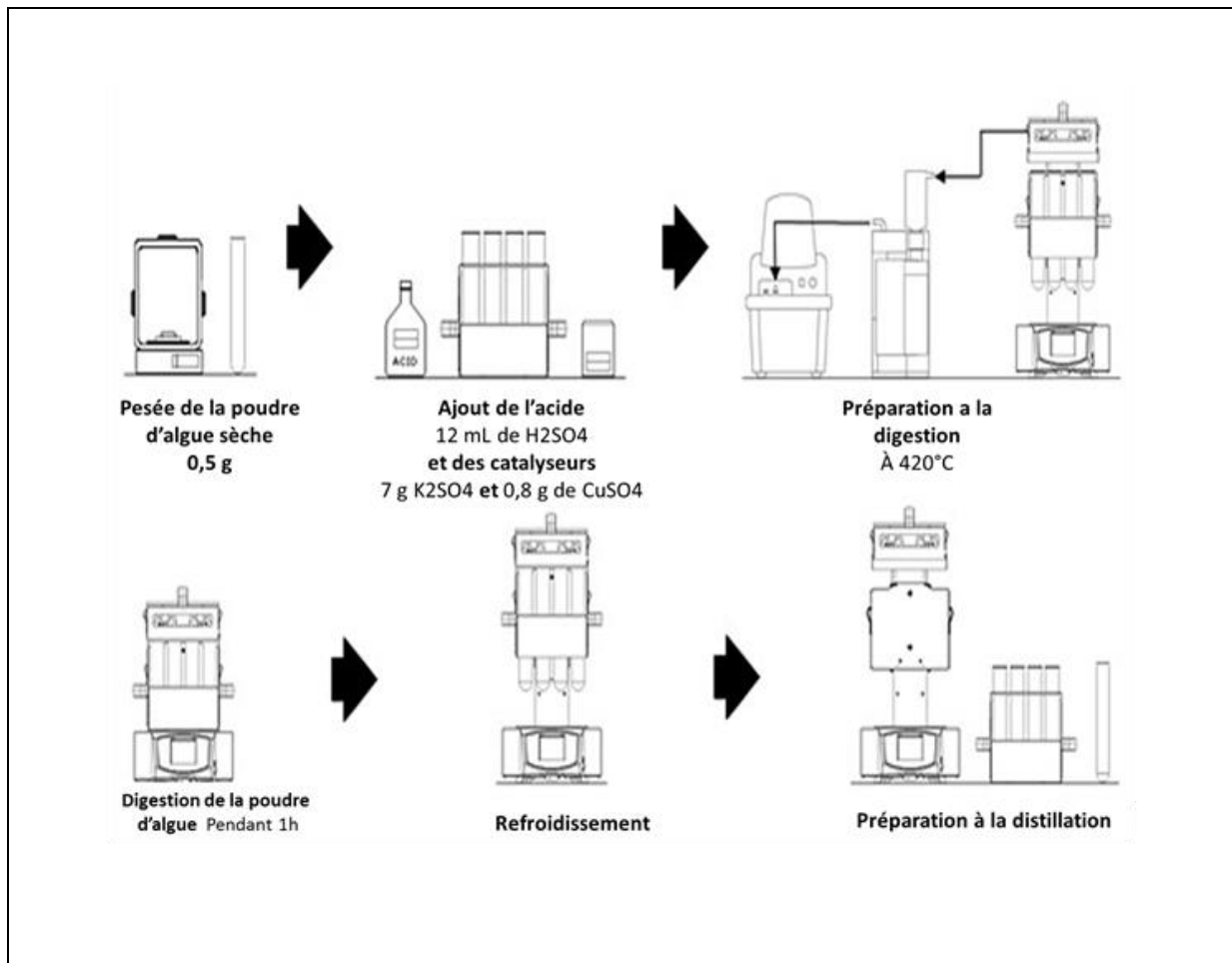
#### 4.2.1.4 Détermination du taux d'azote

La biomasse utilisée comme matière première pour la conversion en carburants peut contenir des protéines ou autres matières contenant de l'azote. Ces constituants sont mesurés dans le

cadre d'une analyse complète de la biomasse. Les protéines dans la biomasse sont difficiles à mesurer directement. Dans de nombreux cas, la teneur en azote de l'échantillon de biomasse est mesurée par la combustion ou les méthodes de Kjeldahl et la teneur en protéines est estimée à l'aide d'un facteur d'azote (Fa) approprié. La plupart des méthodes publiées recommandent un Fa de 6,25 pour tous les types de biomasse. (Godin, 2013)

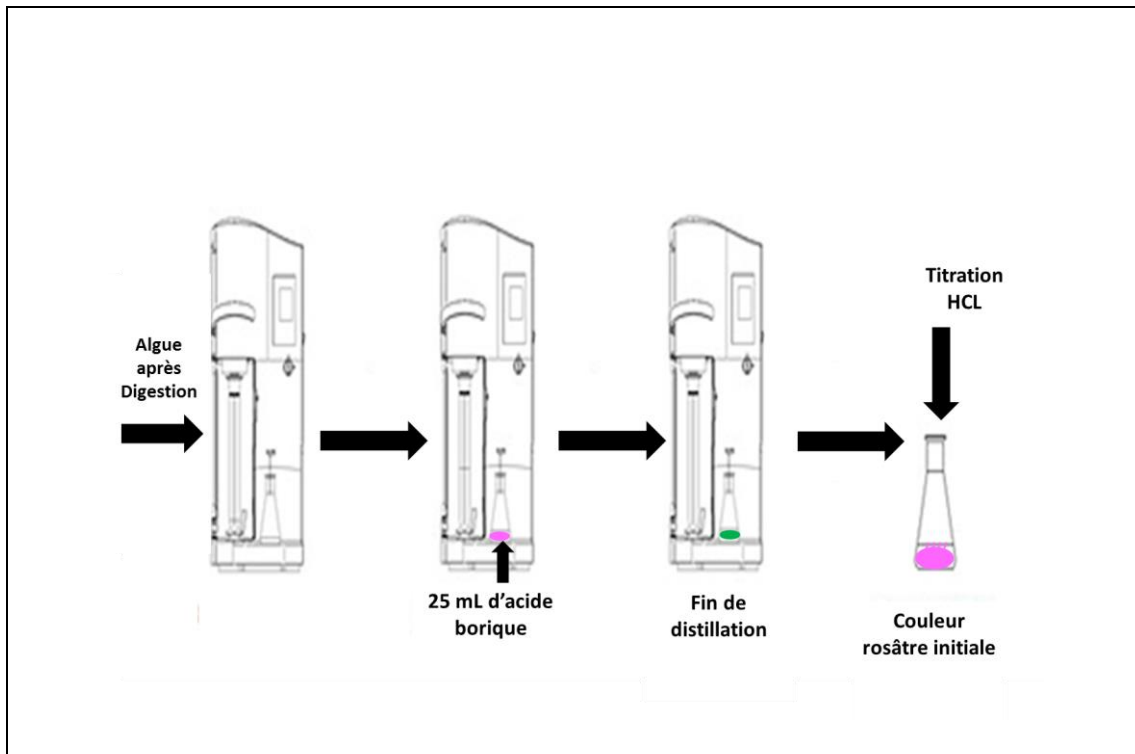
- **Protocole**

0.5g de biomasse sèche ont été mélangés aux catalyseurs (7 g  $K_2SO_4$  et 0,8 g de  $CuSO_4$ ) dans les tubes de l'unité de digestion (**Figure 15**), 12 mL de  $H_2SO_4$  ont été ajoutés lorsque la température à atteint les  $420^\circ C$ . La digestion de la biomasse a duré à cette température. (Hames et al., 2008)



**Figure 15** : Etapes de la digestion de la biomasse algale pour la détermination du taux d'azote par la méthode Kjeldahl

Une fois la digestion terminée, les tubes sont retirés de l'unité de digestion et placés dans l'unité de distillation avec un erlenmeyer contenant 25 ml d'acide borique. (**Figure 16**)



**Figure 16 :** Distillation de la biomasse algale digérée pour la détermination du taux d'azote par la méthode Kjeldahl

L'acide borique de couleur initiale rosâtre a pris une couleur verdâtre en fin de distillation (**Figure 16**), il a été titré avec du HCL (12 N) jusqu'à ce qu'il reprenne sa couleur rosâtre initiale. Le volume d'HCL nécessaire à la titration a été noté. (Hames et al., 2008)

- **Méthode de calcul du taux d'azote**

Le taux de protéines est calculé avec un taux d'azote multiplié par un facteur Fa=6,25.

Le taux d'azote est calculé par l'équation (11) :

$$\text{taux d'azote } N (\%) = \left( \frac{Vt \times N (HCL) \times 14.0007}{Ps} \right) \times 100 \quad (11)$$

**Vt** : volume de titration de l'échantillon (L)

**N** : normalité du HCL (mol/L)

**Ps** : poids sec (g)

Masse molaire de l'azote =14,0007 (g/ mol)



## 4.2.2 ETUDE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES D'ENZYMES COMMERCIALES

### 4.2.2.1 Activité de La celluclast

Il s'agit de l'étude de l'activité enzymatique Fpase (filter paper activity) c'est-à-dire le taux de digestion d'un papier filtre par la (Celluclast® 1,5 L), qui est une cellulase commerciale extraite du champignon *Trichoderma reesei*. Pour cela des disques de 5,5mm de diamètre de papier filtre *Whatman* ont été mis dans des micro-tubes avec 40  $\mu$ L de tampon citrate 50mM à pH=5 et 20  $\mu$ L d'enzyme diluée (2 dilutions ont été préparées 1/1500 et 1/2000). Après incubation à 50°C pendant 60 min, 120  $\mu$ L de DNS ont été ajoutés, les solutions ont été incubées pendant 5 min à 100°C puis refroidies dans un bain glacé à 10°C. (Demuez, 2014)

- **Courbe d'étalonnage :**

Une solution mère de 10mg/mL a été préparée et à partir de laquelle les concentrations suivantes ont été préparées: (**Tableau 6**)

**Tableau 6 :** Courbe d'étalonnage du glucose

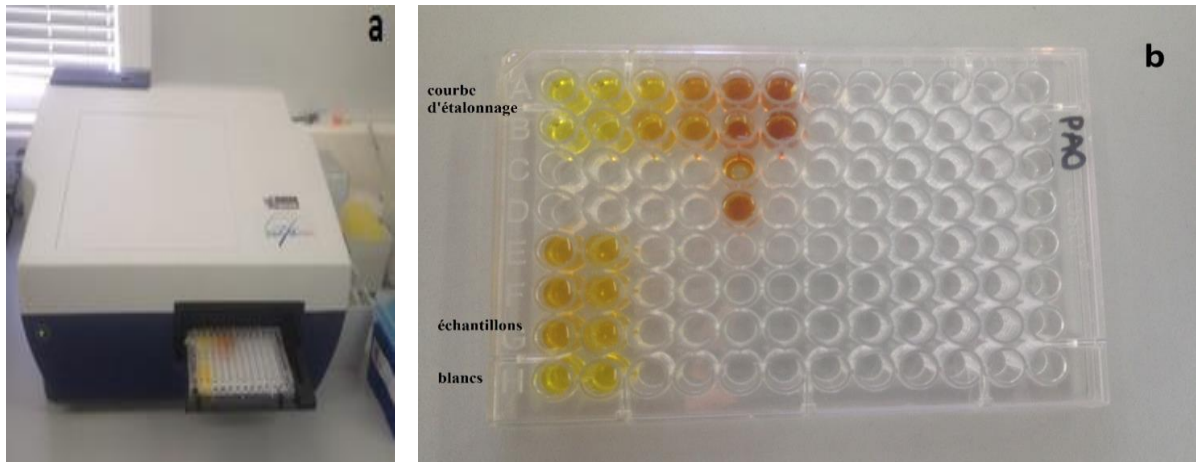
| Volume de la solution mère de glucose ( $\mu$ L) | Volume d'eau H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L) | Concentration finale en glucose (mg/mL) | Absorbance à 540 nm |
|--|--|---|---------------------|
| 0  | 1000                                     | 0,0                                     | 0,055               |
| 50   | 950                                      | 0,5                                     | 0,111               |
| 100  | 900                                      | 1,0                                     | 0,258               |
| 200  | 800                                      | 2,0                                     | 0,482               |
| 400  | 600                                      | 4,0                                     | 0,98                |

De chaque concentration, 20  $\mu$ L ont été prélevés et ajoutés à 40  $\mu$ L de tampon citrate à pH=5 et 120  $\mu$ L de DNS. Les solutions ont été incubées pendant 5 min à 100°C puis refroidies dans un bain glacé à 10°C.

- **Lecture au spectrophotomètre sur microplaque**

De chaque échantillon, 36  $\mu$ L ont été prélevés et transférés dans les puits de la microplaque du spectrophotomètre avec 160  $\mu$ L d'eau, l'absorbance a été lue à 540 nm.

Les échantillons de l'activité enzymatique sont situés sur la même microplaque que la courbe d'étalonnage, en bas verticalement en commençant par les blancs (**Figure 17 b**).



**Figure 17 :** (a) Spectrophotomètre à microplaques à 96 puits (marque ZENYTH anthos 200 rt), (b) arrangements des échantillons sur microplaque.

- **Méthode de calcul :**

L'activité enzymatique est calculée selon l'équation suivante (12) :

$$FP\ ase\ (FPU/ml) = Glc_L \times D \times 5.55\ (\mu mol/mg) / t_s / V_E \quad (12) \text{ (Xiao et al., 2004)}$$

Avec :

- **FP ase :** filter paper activity exprimée en ( $\mu\text{ mol mL}^{-1}\text{ min}^{-1}$ ) ou en unite (U) de papier filter FP liberée par mL (FPU/ml)
- **Glc<sub>L</sub> :** glucose liberé (mg)
- **D:** facteur de dilution
- **V<sub>E</sub> :** volume de l'enzyme (0,02 mL)
- **t<sub>s</sub> :** temps de saccharification (60min)
- **5.55  $\mu\text{mole/ mg}$  :** représente le nombre de  $\mu\text{moles}$  de glucose dans 1 mg

$$FP\ ase\ (FPU/ml) = Glc_L \times D \times 5,55 / 60 / 0,02$$

L'équation (12) devient :

$$FP\ ase\ (FPU/ml) = Glc_L \times D \times 4,629 \quad (12) \text{ (Xiao et al., 2004)}$$

#### 4.2.2.2 Activité de la Novozym EG1

Il s'agit d'étudier l'activité de la cellulase commerciale Novozym sur un substrat cellulosique, la cmc carboxymethyl cellulose.

##### Protocole

Le substrat a été préparé avec 2g de cmc (carboxymethyl cellulose) dans 100 mL de tampon sodium citrate 0,05M pH=5.

L'activité de l'enzyme a été étudiée avec 2 dilutions (1/25 et 1/50), pour cela 30  $\mu$ L d'enzyme diluée a été mélangés à 30  $\mu$ L de substrat (2% cmc) dans des micro-tubes et incubés à 50°C pendant 5 min.

Après ajout de 120 $\mu$ L de DNS et ébullition à 100°C pendant 5min, les échantillons sont transférés dans une microplaque pour lecture des absorbances à 540 nm. (Demuez, 2014)

- **Courbe d'étalonnage.**

La même courbe d'étalonnage que celle de la FPase activité a été utilisée pour cette enzymes.

- **Méthode de calcul :**

La formule (13) a été utilisée (Xiao et al., 2004)

$$\text{Activité CMC ase (U/ml)} = \text{Glc}_L \times D \times 5.55 (\mu\text{mol/mg}) / t_s / V_E$$

Avec :

- **CMA ase** : carboxymethylcellulose activity exprimée en ( $\mu$  mol mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) ou en unite (U) par mL (FPU/ml)
- **Glc<sub>L</sub>** : glucose libéré (mg)
- **D**: facteur de dilution
- **V<sub>E</sub>** : volume de l'enzyme (0,03 mL)
- **t<sub>s</sub>** : temps de saccharification (5 min)
- **5.55  $\mu$ mole/ mg** : représente le nombre de  $\mu$ moles de glucose dans 1 mg

$$\text{Activité CMC ase (U/ml)} = \text{Glc}_L \times D \times 5,55 / 5 / 0,03$$

L'équation (13) devient :

$$\text{CMC ase (U/mL)} = \text{Glc}_L \times D \times 37,037 \quad (13) \quad (\text{Xiao et al., 2004})$$

### 4.2.2.3 Activité de la BG ( $\beta$ -glucosidase) et de la BX ( $\beta$ -xylosidase)

Il s'agit de l'étude de l'activité  $\beta$ -glucosidase sur le substrat p-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, et de la  $\beta$ -xylosidase sur le p-nitrophenyl  $\beta$ -D-xylo-piranoside.

- **Protocole :**

Les substrats ont été préparés à partir de 7.2mM de chaque substrat (le pnp-glc-p et le pnp-xyl-p) dans 50mM de tampon acétate sodium à pH=5

Les enzymes ont été utilisées sous une forme diluée (1/100 pour la  $\beta$ -glucosidase et 1/1000 pour la  $\beta$ -xylosidase). Les réactions enzymatiques étudiées sont :

- L'activité de la  $\beta$ -glucosidase diluée a 1/100 sur le pnp-glc-p.
- L'activité de la  $\beta$ -xylosidase diluée à 1/1000 sur le pnp-xyl-p.

Pour cela 40  $\mu$ L de substrat (pnp dans le tampon acétate sodium) ont été mélangés avec 40  $\mu$ L d'enzyme diluée dans un micro-tube et incubés dans un bain à 50°C pendant 10 min avec ajout de 200  $\mu$ L de  $\text{NaCO}_3$  à 2% après incubation.

- **Méthode de calcul :**

Les activités enzymatiques ont été calculées selon l'équation (14) (Demuez, 2014)

$$\text{Activité (BG ou BX) (u/mL/min)} = \text{pnp} \times D / t_s / V_E$$

$$\text{Activité (BG ou BX) (u/ml/min)} = \text{pnp} \times D / 10 / 0,04 \quad (14)$$

- **Activité (BG ou BX) :** Activité  $\beta$ -glucosidase et  $\beta$ -xylosidase exprimée en ( $\mu$ mol/ml/min) équivalent à (u/mL/min)
- **Pnp :** quantité de para-nitrophenol ( $\mu$  mole)
- **D :** facteur de dilution
- **$t_s$  :** temps (10 min)
- **$V_E$  :** Volume de l'enzyme (mL)
- **Courbe d'étalonnage**

La courbe d'étalonnage est la même pour les deux enzymes (la BG et la BX), elle a été préparée à partir d'une solution mère de 5 mg/ 5mL de p-nitrophenol. Les concentrations ont été converties en masses (mg) en multipliant par le volume (0,1) puis en  $\mu$ mole (en multipliant par 1000 et en divisant par la masse molaire (1000/139,1)) pour pouvoir appliquer

la formule du calcul de l'activité enzymatique ultérieurement. La lecture au spectrophotomètre se fait à 410 nm.

### 4.2.3 ISOLEMENT DE CHAMPIGNONS CELLULOLYTIQUES

#### 4.2.3.1 Protocole général d'isolement des souches

L'isolement de champignons cellulolytiques a été effectué à partir de la rhizosphère, pour cela 3 types de procédures ont été suivies :

- Isolement de champignons à partir d'une rhizosphère enrichie en cellulose (bouts de carton)
- Isolement de champignons à partir de racines et de rhizosphère non enrichie en cellulose.
- Isolement de champignons à partir des racines.

##### 4.2.3.1.1 Isolement de champignons à partir d'une rhizosphère enrichie en cellulose (bouts de carton)

Des bouts de carton ont été enterrés dans le sol (près des racines et de la rhizosphère), pour être décomposés pendant environ 1 mois. Les cartons ont été retirés du sol et conservés dans du papier aluminium, puis posés au milieu de boîtes de pétri remplies de milieu PDA (avec antibiotique (amoxicilline, 100mg/ml)).

Un autre bout de carton a été rincé avec de l'eau distillée, puis mis dans un tube à essai rempli avec du milieu PDA liquide + amoxicilline, fermé sous agitation (solution mère).

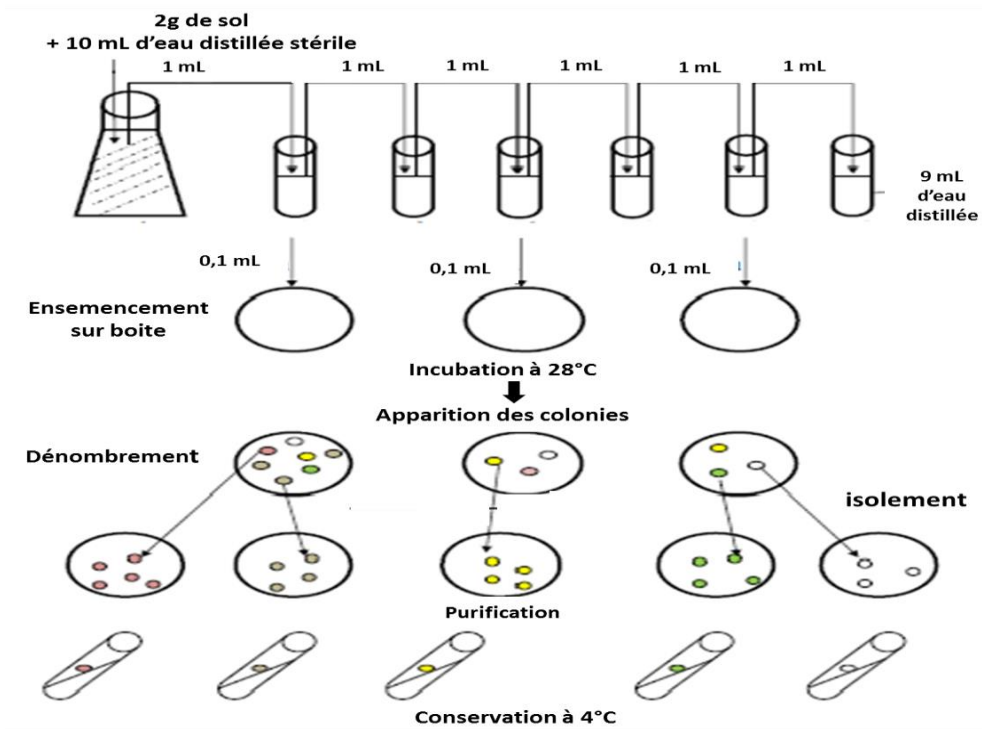
Plusieurs dilutions ont été faites à partir de cette solution mère pour être ensuiteensemencées sur des boîtes de pétri contenant du milieu PDA+ ATB puis Incubées à 27 à 30 °C pendant 3 à 7 jours selon le développement des colonies.

##### 4.2.3.1.2 Isolement de champignons à partir de la rhizosphère non enrichie en cellulose

De la terre proche de la racine (2g) a été prélevée et mise dans un tube à essai contenant du milieu de culture PDA liquide 10 mL avec une goutte du tensioactif Tween 80 qui permet de désagglomérer les particules de terre et de détacher les microorganismes (solution mère **R**).

(Figure18), les mêmes étapes ont été suivies avec 2g de sol prélevés de la rhizosphère (solution mère **RH**). Des dilutions ont été faites à partir des solutions mères jusqu'à 4 dilutions : (**R1, R2, R3, R4**) pour la solution mère **R**, et (**RH1 RH 2, RH3, RH4**) pour la solution mère **RH**.

Des boîtes de pétri remplies de gélose PDA ont été ensemencées avec les solutions diluées puis incubées à 28°C pendant au moins 3 jours. (Figure18)



**Figure18 :** Procédé d'isolement des champignons cellulolytiques à partir du sol

(Hocini & Meziani, 2013)

#### 4.2.3.1.3 Isolement des champignons à partir de racines :

Une plante du genre *Chlorophytum sp*, récoltée au niveau du CDER, a été choisie pour l'isolement de microorganismes à partir de ses racines, cette dernière a été choisie par rapport à l'observation de pourrissement au niveau des racines, synonyme de présence de contamination fongique importante.

Les racines ont été prélevées à l'aide d'une pince et de ciseaux stériles puis fixées directement sur des boîtes de gélose PDA avec antibiotique.

#### 4.2.3.2 Sélection des souches cellulolytiques

Les souches cultivées sur milieux PDA, ont été isolées une par une sur le milieu de Czapek-CMC pour évaluer leur taux de croissance sur ce milieu sélectif qui est une source de cellulose capable de produire des cellulases.

#### 4.2.3.3 Taux de croissance

Le suivi des souches a été effectué par la mesure quotidienne de la taille de la colonie centrale pour déterminer la vitesse de croissance sur un milieu contenant une source de cellulose Czapek-CMC.

#### 4.2.3.4 Sélection des meilleures souches cellulolytiques en se basant sur un milieu de culture sélectif.

Les souches qui ont montré une bonne croissance sur milieu contenant une source de cellulose ont été testées sur des milieux contenant du son de blé, du marc de café et de l'amidon pour sélectionner les souches les plus performantes pour hydrolyser la cellulose et déterminer la nature des enzymes produites.

#### 4.2.3.5 Identification de la souche cellulolytique sélectionnée

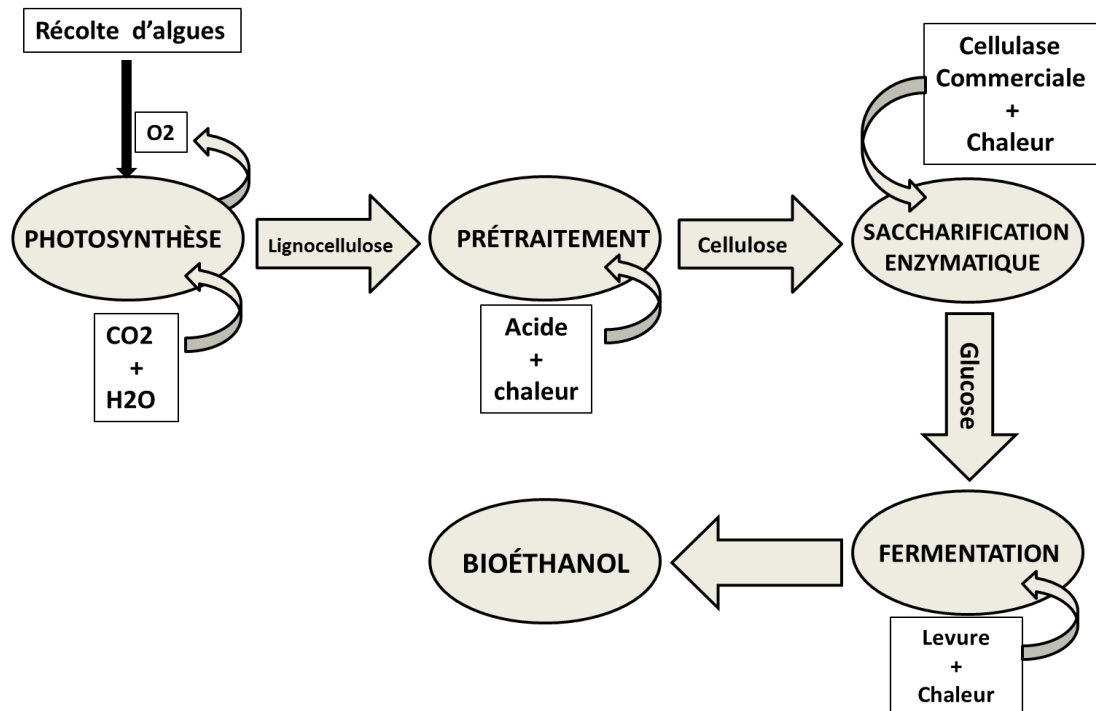
D'après les résultats des cultures sur milieu sélectif, une souche a été choisie pour mener à bien les saccharifications de la biomasse cellulosique. L'identification s'est basée sur « les clés d'identification microscopiques et macroscopiques » spécifiques à chaque espèce comme l'aspect du mycélium et des spores, le modèle et le taux de croissance et la couleur.

### 4.2.4 PRODUCTION DE BIOETHANOL A PARTIR DE LA MACROALGUE ULVA LACTUCA

#### 4.2.4.1 Production de bioéthanol utilisant une enzyme commerciale

La production du bioéthanol à partir de la macroalgue *ulva lactuca* a suivi les étapes classiques de la production du bioéthanol lignocellulosique (**Figure 19**): prétraitement, saccharification enzymatique et fermentation en mode SHF. Le volume des solutions en fin de

fermentation était insuffisant pour faire une distillation et ce à cause de la quantité réduite de l'enzyme ne permettant pas le travail avec de grands volumes.

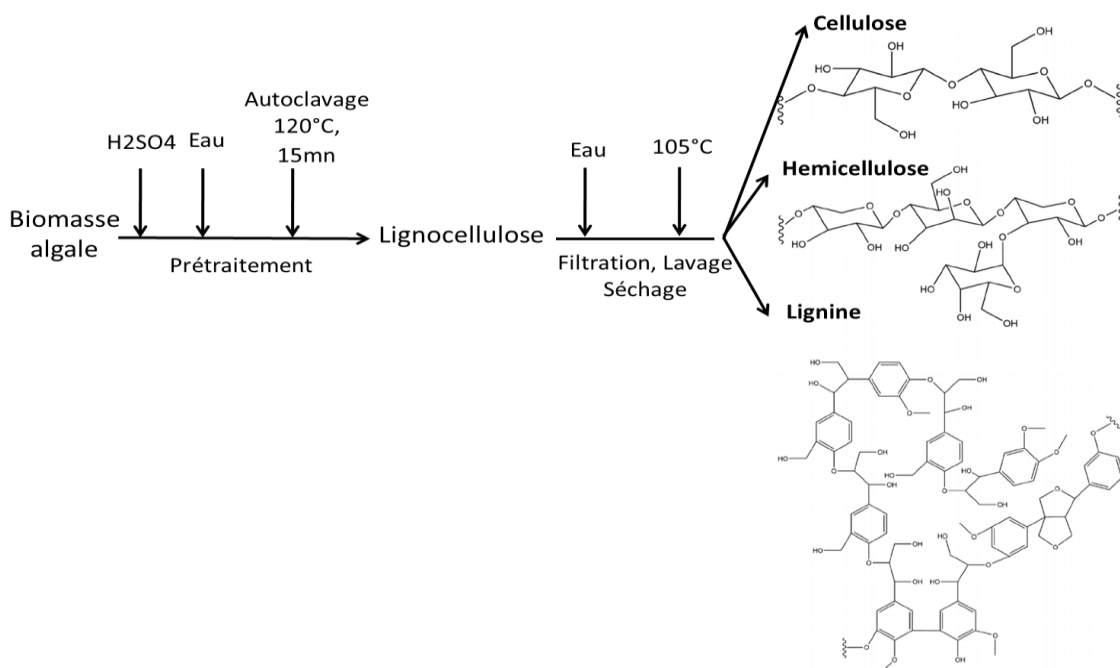


**Figure 19:** Etapes de production du bioéthanol algal utilisant une enzyme commerciale

#### 4.2.4.1.1 Prétraitement

La poudre de *Ulva lactuca* a été mise en suspension dans l'eau à une concentration de 13% (p/V), la solution a été dispersée à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 min, 1 M d'acide sulfurique a été ajouté, le pH était de 1,5 avant d'être ajusté à 2,5.





**Figure 20 :** Mécanisme de prétraitement de la biomasse algale et libération de la cellulose, hémicellulose et de la lignine

La solution a été autoclavée à 120°C pendant 15 min puis refroidie et filtrée, la biomasse recueillie sur le filtre a été lavée à l'eau distillée (pH=6,8) et séchée à l'étuve à 100°C.

Le but de cette étape est de rendre la cellulose accessible aux enzymes durant la saccharification (**figure 20**)

#### 4.2.4.1.2 Saccharification

D'abord, l'activité enzymatique a été étudiée, l'enzyme utilisée est une cellulase commerciale de la souche *Trichoderma reesei* (Celluclast® 1,5 L), l'activité enzymatique a été calculée pour déterminer le volume nécessaire pour hydrolyser le substrat.

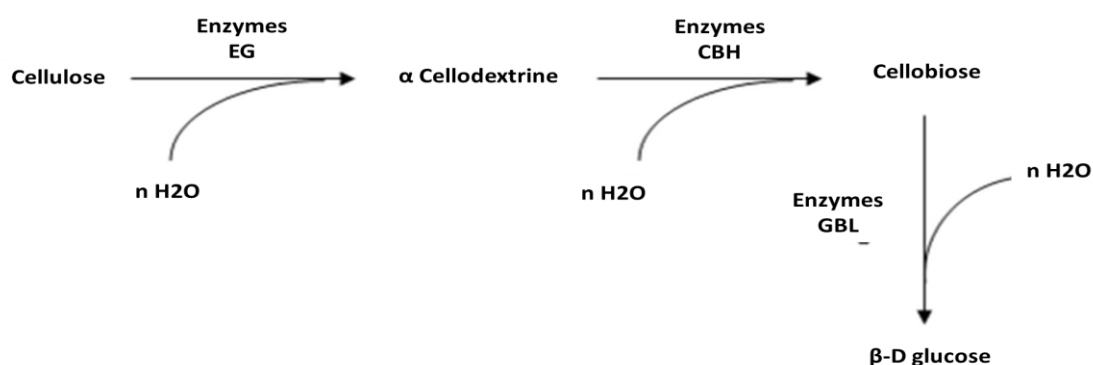
Pour cela, 20 µL d'enzyme diluée (1/2000) ont été ajoutés à 40 mL de tampon citrate 50 mM (pH 5) dans des micro-tubes contenant un disque de papier filtre de 5,5 mm de diamètre.

Les microtubes ont été incubés à 50°C pendant 1 heure sans agitation. 120 µL de DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) ont été ajoutés dans les tubes et porté à ébullition pendant 5 min, 36 µL de cette solution ont été ajoutés à 160 µL d'eau dans une microplaque de spectrophotomètre UV-Visible, l'absorbance a été lue à 540 nm. ([Demuez, 2014](#))

L'activité enzymatique a été calculée selon la formule (12): ([Xiao et al., 2014](#))

$$FPU/mL = = \text{glucose libéré (mg)} \times 4,629 \quad (12)$$

La poudre d'*Ulva lactuca* a été prétraitée à 5 % (p/V) et mise en suspension dans du tampon citrate (pH= 5), l'hydrolyse enzymatique a commencé avec l'ajout de 20 FPU/g de celluclast à la suspension. L'hydrolyse enzymatique a été réalisée dans un agitateur à pH 5, à la température 45°C et à une vitesse de 200 rpm pendant 96 heures. La solution a été filtrée et le surnageant récupéré. Le glucose libéré a été analysé quotidiennement par HPLC dans les conditions opératoires suivantes : volume d'injection : 20 µL, durée d'exécution : 30 min, phase mobile: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02M, débit: 0,8 mL/minute, température de la colonne : 60°C



**Figure 21** : Mécanisme de dégradation de la cellulose en glucose

Le but de cette étapes est de dégrader les molécules de cellulose en petites unités de glucose utilisant le cocktail enzymatique Celluclast contenant des EG (endoglucanases), des CBH (cellobiohydrolases), et des GBL ( $\beta$ -glucosidases) (**Figure 21**) qui vont d'abord écourter les chaînes de cellulose ( $\alpha$  cellodextrines) libérant d'abord la cellobiose puis le glucose.

#### 4.2.4.1.3 Fermentation en mode SHF ( Separated Hydrolysis and Fermentation)

Après hydrolyse enzymatique, 1mL de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à une concentration de 0,5 g/L a été ajouté à la solution saccharifiée, puis fermenté par des levures.

La levure a été ajoutée sous forme d'une pré-culture préparée à partir d'une souche cultivée sur des boîtes de gélose YMA transférée dans un milieu de culture liquide YMA (Yeast Malt Agar) puis incubé pendant 18h. La fermentation a été réalisée à 30°C sous une agitation de 250 rpm pendant 48 heures à pH 5.

Tous les échantillons ont été centrifugés et filtrés à travers un filtre seringue de 45  $\mu$ .

Des mesures quotidiennes de glucose et d'éthanol ont été effectuées par HPLC dans les conditions opératoires suivantes : volume d'injection : 20  $\mu$ L, durée d'exécution : 30 min, phase mobile: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02M, débit: 0,8 mL/minute, température de la colonne : 60°C

- **Calcul du rendement en éthanol  $R_{eth}$**

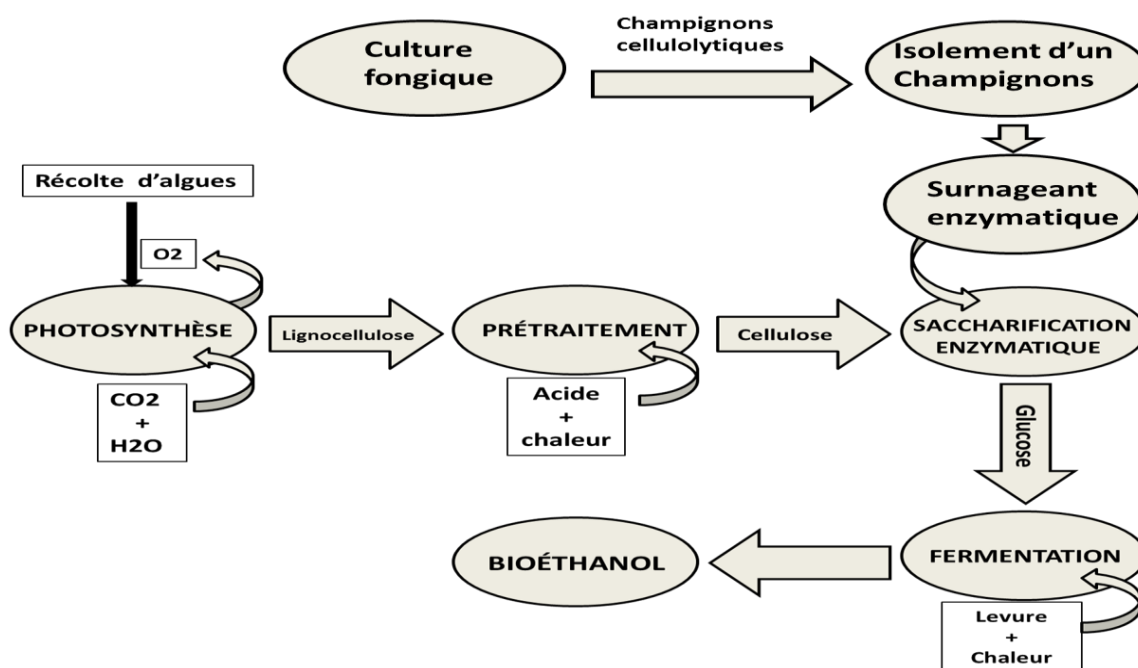
Considérant un rendement théorique de bioéthanol de 0,51 g pour un gramme de glucose consommé pendant la fermentation (Chin & Hng, 2013) le rendement théorique en éthanol ( $R_{th}$ ) % a été calculé selon la formule (15) (Onsoy et al., 2007)

$$R_{th} (\%) = (P_{eth} \times 100) / 0,51 \quad (15)$$

$P_{eth}$  = l'éthanol réellement produit et exprimé en g d'éthanol par g de sucre utilisé (g/g). (Onsoy et al., 2007)

#### 4.2.4.2 Production du bioéthanol utilisant un surnageant de culture fongique

Dans cette expérience les même étapes de production du bioéthanol utilisant une enzyme commerciale ont été suivies, seule l'enzyme commerciale a été remplacée par un surnageant filtré de culture fongique liquide de la souche N°=5 (*Trichoderma sp*) isolée au Laboratoire Bioénergies et Environnement du CDER. (Figure 22)



**Figure 22** : Etapes de production du bioéthanol algal utilisant un surnageant enzymatique

#### 4.2.4.2.1 Obtention des surnageants de culture de *Trichoderma sp* souche (N°=5)

La souche fongique isolée et conservée a été repiquée sur des boîtes de pétri remplies de milieu de culture MEA, elles ont été incubées à 30°C et pH=6 pendant 6 jours.

Du tampon citrate 0,05 M stérile a été versée sur la souche cultivée pendant 6 jours puis raclées à l'aide d'un râteau pour obtenir la solution mère des spores.

Quatre dilutions de la solution mère ont été réalisées, la 2<sup>ème</sup> dilution a permis le comptage des spores au microscope sur cellule de Thomas.

- **Méthode de comptage des spores :**

Le nombre de spore a été calculée selon la formule (16) :

$$Nb \text{ de spores} = \text{Moyenne de comptage} \times 10000 \times 16 \times \text{facteur de dilution} \quad (16) \text{ (Faurie, 2019)}$$

La moyenne de comptage sous microscope a été de  $32,10^8$  spores / mL, le nombre de spores à inoculer dans en milieu liquide est de  $10^6$  spores par mL, dans le volume du milieu de culture utilisé (50 mL) le nombre de spores est donc de  $5,10^7$  spores. Le volume adéquat apportant le nombre de spores nécessaire à la culture de la souche n5 en liquide dans 50 mL de milieu est donc de 16  $\mu$ L ( $32,10^8 / 5,10^7$ ).

#### 4.2.4.2.2 Culture de la souche N°=5 en milieu liquide et obtention des surnageants

La souche N°=5 a été cultivée pendant 6 jours a pH=5 sur milieu liquide ; Des prélèvements quotidiens ont étaient effectués afin d'étudier l'activité enzymatique de cette souche et déterminer le jour de culture optimal représentant la production maximale de cellulase.

#### 4.2.4.2.3 Etude de l'activité enzymatique

L'activité FPase du surnageant de la souche N°=5 a été étudiée de la même façon que celle décrite pour les autres enzymes commerciales.

Il en est de même pour la saccharification et la fermentation.

**4.2.4.3 Calcul du rendement en éthanol par rapport à la matière sèche initiale**

Le poids de la biomasse sèche initiale a été pris comme référence pour le calcul de la quantité d'éthanol finale, ce poids a été extrapolé pour déterminer la quantité d'algue sèche nécessaire à la production d'un litre de bioéthanol utilisant une enzyme commerciale et surnageant fongique enzymatique.

Le résultat a été comparé à la biomasse sèche initiale d'autres matières premières cellulosiques.

# *Chapitre 5*

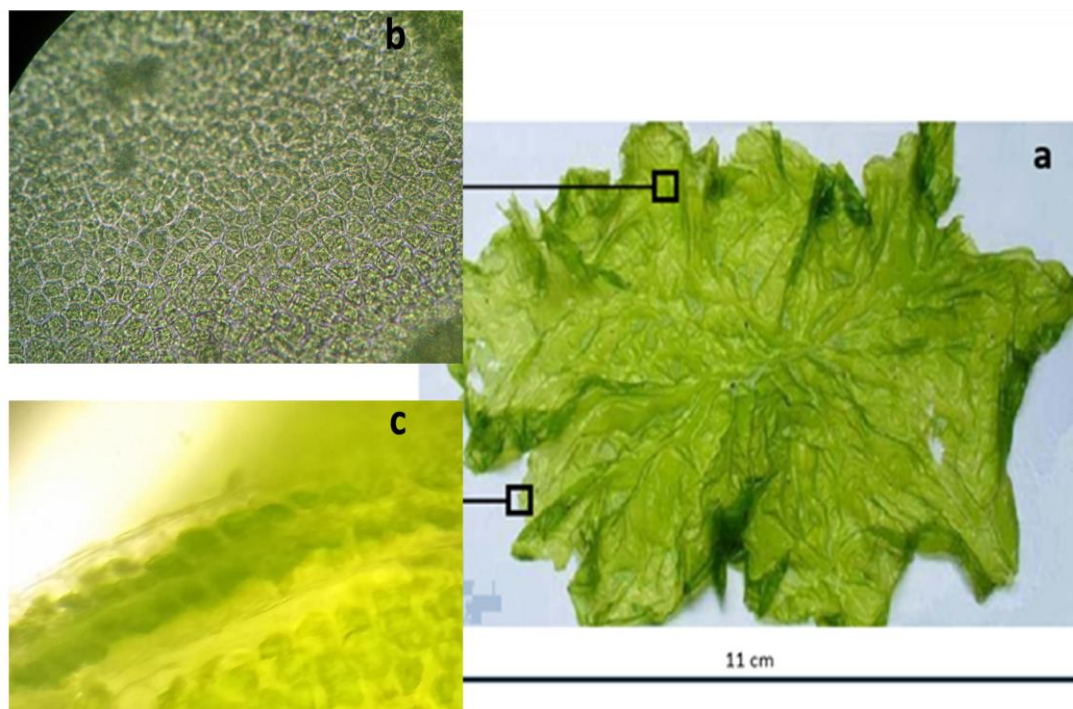
## *Résultats et discussions*

## 5.1. CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DE LA MACROALGUE

### *ULVA LACTUCA*

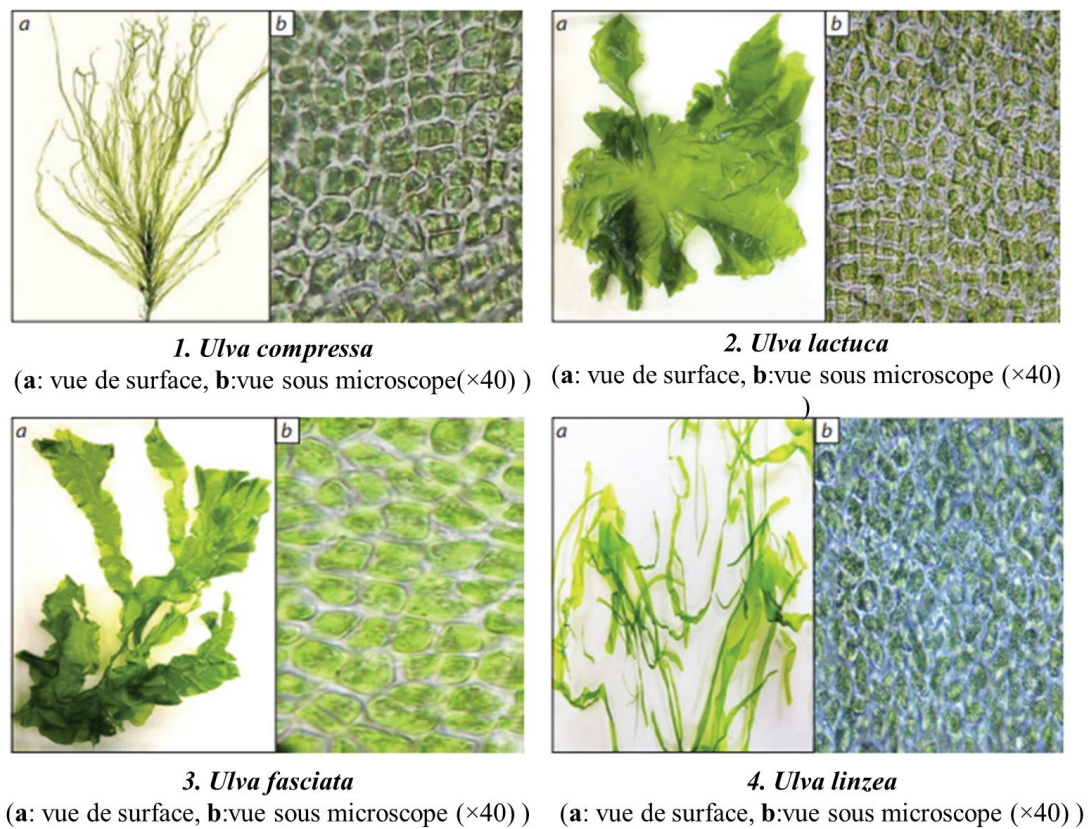
#### 5.1.1. Identification

L'aspect morphologique macroscopique ainsi que la vue sous microscope ( $\times 40$ ) sont donnés dans la photo suivante : (**Figure 23**)



**Figure 23** : Aspect de la macroalgue *ulva lactuca*

(**a** : Aspect morphologique du thalle, **b** : Vue de surface sous microscope, **c** : Coupe transversale du thalle)



**Figure 24 :** Morphologie et vue de surface sous microscope (× 40) de *ulva compressa*, *ulva fasciata*, *ulva lactuca*, et *ulva linzea* (Ismail & Mohamed, 2017)

L'algue récoltée semble appartenir à l'espèce *ulva lactuca*, car elle apparaît plus large que longue, de couleur verte vive, plate, à bordures foliacées et ondulées (**Figure 23 a**) ce qui n'est pas le cas des autres espèces d'*ulva* (*U. compressa*, *U. linzea*, *U. fasciata*) qui sont soit plus longues que larges ou filamenteuses (**Figure 24 (1a, 3a, 4a)**).

Sous microscope (×40) la vue de surface (**Figure 23 b**) montre des cellules de surface de différentes formes et tailles pouvant être confondues avec *ulva fasciata* (**Figure 24 (3b)**) ou *Ulva compressa* (**Figure 24 (1b)**), sauf qu'avec *ulva lactuca* les cellules sont rangées de façon irrégulière (**Figure 23 b**) avec des parois arrondies, avec un chloroplaste rempli généralement à l'extrémité extérieure de la cellule. La coupe transversale (**Figure 23 c**) montre les deux couches de cellules, qui sont une caractéristique de *ulva lactuca* ce qui lui procure une certaine rigidité. (Ismail & Mohamed, 2017)



### 5.1.2. Caractérisation de la macroalgue *ulva lactuca*

#### 5.1.2.1. Détermination des composés algaux extractibles (solubles) dans l'eau et dans l'éthanol

- Extraction à l'eau

Les résultats de m'extraction de la poudre de la macroalgue *ulva lactuca* à l'eau sont donnés dans le **tabelau 7** :

**Tableau 7** : Taux d'extraction de la poudre d'*ulva lactuca* à l'eau

| <i>échantillon</i> | <i>Poids sec (g)</i> | <i>Volume H<sub>2</sub>O extrait (mL)</i> | <i>Volume H<sub>2</sub>O Perdu (mL)</i> | <i>Poids du ballon (g)</i> | <i>Poids du ballon + résidu (g)</i> | <i>Poids du résidu (g)</i> | <i>% massique H<sub>2</sub>O Ext</i> |
|--------------------|----------------------|---|---|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| <b>1</b>           | 4,50                 | 186,00                                    | 151,00                                  | 166,32                     | 167,76                              | 1,43                       | <b>39,18</b>                         |
| <b>2</b>           | 4,51                 | 180,00                                    | 145,00                                  | 167,57                     | 169,31                              | 1,73                       | <b>47,84</b>                         |
| <b>3</b>           | 4,50                 | 174,00                                    | 139,00                                  | 185,58                     | 187,26                              | 1,68                       | <b>46,92</b>                         |
| <b>4</b>           | 4,50                 | 183,00                                    | 178,00                                  | 184,05                     | 185,89                              | 1,84                       | <b>42,17</b>                         |
| <b>Moyenne</b>     |                      |   |   |                            |                                     |                            | <b>44,03</b>                         |

Partant d'un poids initial d'algue de 5g avec un pourcentage de poids sec de 90% et un volume d'eau de  $190 \pm 5$  ml.

L'extraction de la poudre de la macroalgue *ulva lactuca* à l'eau a permis d'extraire les composés solubles avec un taux de **44,03%** représentant la moyenne de 4 essais. Les composés contenus dans cet extrait représentent les constituants non structuraux de cette biomasse, ils peuvent inclure des matières inorganiques, sucres non structuraux et matières azotées, entre autres. (Sluiter et al .,2005)

Les matières inorganiques solubles dans l'eau peuvent provenir à la fois de la biomasse et de tout matière soluble qui lui est associée comme les engrais. (Sluiter et al .,2005)

- **Composition en sucres après extraction à l'eau**

L'analyse du volume extrait (obtenu suivant le protocole décrit dans la partie matériel et méthode (p 48, 49) (Sluiter et al., 2011)) sans prétraitement acide à l'HPLC nous a révélé l'absence de sucres monomériques dans cet extrait.

**Tableau 8 :** Composition des extraits d'*ulva lactuca* à l'eau après prétraitement acide

| % Glucose    | %Xylose      | %Galactose   | %Arabinose   | %Mannose     |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 0,431        | 0,524        | 3,164        | 0,089        | 0,033        |
| 0,635        | 0,750        | 4,337        | 0,072        | 0,036        |
| 0,666        | 0,801        | 4,534        | 0,071        | 0,047        |
| <b>0,577</b> | <b>0,692</b> | <b>4,012</b> | <b>0,077</b> | <b>0,039</b> |

L'analyse par HPLC du volume extrait prétraité à l'acide sulfurique dilué nous a démontré la présence de 5 sucres différents sous forme monomériques (**Tableau 8**), représentant un total de seulement 5,39 % avec 4,012% pour le galactose seul. Ceci indique que la macroalgue *ulva lactuca* contient très peu ou pas de sucres simples (monosaccharides, disaccharides), et que les monosaccharides détectés par l'HPLC sont probablement des produits de l'hydrolyse de la cellulose et de l'hémicellulose contenues dans la poudre l'algue.

Ces résultats indiquent également que la cellulose n'a pas été sensible au traitement à l'acide dilué vu qu'elle n'a presque pas été hydrolysée (libération de seulement 0,577 % de glucose) tandis que l'hémicellulose a été moyennement sensible à ce traitement en libérant 4,82% de monosaccharides dont 4,012% de galactose.

- **Extraction à l'éthanol**

L'extraction de la poudre de *ulva lactuca* dans l'éthanol a montré faible taux d'extraction estimé à 3,48%, (**tableau 9**). Ceci indique que la macroalgue *ulva lactuca* contient peu de composés solubles dans l'éthanol.

La même formule que celle utilisée dans l'extraction à l'eau a été utilisée pour calculer le taux d'extraction. (Équation (1))

**Tableau 9** : taux d'extraction de *ulva lactuca* dans l'éthanol

| <i>Volume extrait à l'éthanol EtOH (mL)</i> | <i>Volume EtOH Perdu (mL)</i> | <i>Poids du ballon (g)</i> | <i>Poids ballon + résidu (g)</i> | <i>Poids du résidu (g)</i> | <i>% Massique EtOH Ext</i> |
|---|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 230,00                                      | 230,00                        | 171,65                     | 171,83                           | 0,17                       | <b>3,91</b>                |
| 246,00                                      | 246,00                        | 160,46                     | 160,63                           | 0,17                       | <b>3,85</b>                |
| 180,00                                      | 180,00                        | 169,52                     | 169,61                           | 0,08                       | <b>1,97</b>                |
| 240,00                                      | 240,00                        | 160,96                     | 161,15                           | 0,18                       | <b>4,21</b>                |
| <b>moyenne</b>                              |                               |                            |                                  |                            | <b>3,48</b>                |

L'extraction de la poudre de *ulva lactuca* dans l'éthanol permet en général d'extraire des matières solubles dans l'éthanol comme la chlorophylle ou la cire.

- **Taux d'extraction total :**

Le taux d'extraction total est estimé à **47,51%**, il représente la somme du taux d'extraction à l'eau et à l'éthanol.

$$\text{Taux d'extraction total} = 44,03 + 3,49 = 47,51\%$$

Cette valeur est essentielle pour la suite des calculs notamment la conversion des taux des sucres par rapport à une biomasse exempte de composée extractibles vers des taux de sucres par rapport à la biomasse initiale (telle que reçue).

### 5.1.2.2. Détermination des carbohydrates de structure et de la lignine dans la poudre d'*ulva lactuca*

L'analyse à l'HPLC a montré que la poudre d'algue contenait 9,57% de cellulose, 6,90% d'hémicellulose et seulement 2,54% de lignine (**tableau 11**)

Ces résultats sont issus de calculs réalisés sur les résultats de l'HPLC qui donne la composition des sucres sous forme de monomères (le prétraitement acide fractionne les sucres complexes). Il a fallu calculer le taux de cellulose à partir du glucose en divisant par le facteur de conversion qui est de 1,1.

Par exemple pour un taux de glucose de 10,52 :

$$\text{Taux de cellulose} = \text{taux de glucose} / 1,1 = 10,52 / 1,1 = 9,57$$

Le reste des résultats est donné dans le **tableau 10** :

**Tableau 10** : Composition de *Ulva lactuca* en sucres monomères

| Composés         | Concentration déterminée par HPLC (g/L) | Pourcentage de Sucre /biomasses initiale p/p (%) |
|------------------|---|--|
| <b>Glucose</b>   | 8,48±0,76                               | 10,61 ±0,40                                      |
| <b>Xylose</b>    | 1,89±0,07                               | 2,37 ±0,04                                       |
| <b>Galactose</b> | 4,02±1,00                               | 5,03 ± 0,52                                      |
| <b>Mannose</b>   | 0,06±0,00                               | 0,08 ± 0,00                                      |
| <b>Arabinose</b> | 0,12 ± 0,05                             | 0,16 ± 0,02                                      |

L'hydrolyse complète de la poudre d'*Ulva lactuca* a permis d'évaluer les teneurs en sucres sous leurs formes monomériques en g/L. Ces résultats obtenus par HPLC sont essentiels pour le calcul des teneurs en sucres sous la forme polysaccharides. Le pourcentage en sucre par rapport à la biomasse initiale a été calculé selon les équations (2) et (3).

Avec un volume de filtrat  $V_f$  de 87 mL, un poids sec  $P_s$  de 3,64 g et un taux d'extraction de  $47,89 \pm 3,58\%$ .

Le pourcentage en glucane a été calculé en divisant la valeur du glucose par un facteur de 1.1 comme rapporté dans la partie « Matériel et Méthodes » (p 52). Avec un pourcentage massique du glucose de  $10,6 \pm 0,40\%$ , le taux du glucan a été estimé à  $9,567 \pm 0,32\%$ . Ce dernier est un polysaccharide composé exclusivement de monomères de glucose. Le calcul de sa teneur est essentiel pour le calcul du taux de cellulose.

Comme on peut le noter dans le **tableau 10**, la composition en sucres monomères est diversifiée, 5 différents sucres ont été trouvés, le glucose, le galactose et le xylose ont montré des taux très intéressants.

Les hexoses (C6) comme le glucose et le galactose peuvent être fermentés par des levures communes et qui sont également utilisées pour la production du pain où une molécule de glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) donne 2 molécules d'éthanol ( $2 C_2H_5OH$ ) et 2 molécules d'oxyde de carbone ( $2 CO_2$ ).

Par contre, les pentoses (C5) comme le xylose ont besoin de micro-organismes spécifiques pour les fermenter et, les plus efficaces sont généralement génétiquement modifiés.

**Tableau 11** : composition de *ulva lactuca* en sucres complexe, lignine, et cendre

| Composés                              | Pourcentage de sucre /biomasse<br>initiale p/p (%) |
|---------------------------------------|--|
| <b>Composés extractibles</b>          | 47,89 $\pm$ 3,58                                   |
| <b>Cellulose</b>                      | 9,57 $\pm$ 0,36                                    |
| <b>Hemicellulose</b>                  | 6,9 $\pm$ 0,54                                     |
| <b>Lignine soluble dans l'acide</b>   | 2,57 $\pm$ 0,36                                    |
| <b>Lignine insoluble dans l'acide</b> | 2,54 $\pm$ 0,07                                    |
| <b>Cendres</b>                        | 25,7 $\pm$ 1,03                                    |
| <b>total</b>                          | 95,2   |

L'hydrolyse complète de la poudre d'*ulva lactuca* a permis d'évaluer les teneurs en polysaccharides, lignine et cendres.

La teneur en glucides d'*ulva lactuca*, calculée à partir de leur forme monomérique, montre des résultats intéressants, notamment pour la cellulose, résultant des bons taux de glucose ; le pourcentage des sucres totaux était de 16,47 % par rapport au poids sec (**Tableau 11**). En général, la teneur en sucre des algues vertes est inférieure à celle des autres matières premières lignocellulosiques. Une composition polysaccharidique similaire a été rapportée par (Bobin-Dubigeon et al., 1997) et H. van der Wal. (van der Wal et al., 2013) Les résultats révèlent également une faible fraction de lignine totale, estimée à 5,11% w/w, ce qui est négligeable par rapport à la fraction de lignine dans les plantes terrestres. Ce composant présent en quantité plus importante dans les plantes supérieures est très difficile à dégrader biologiquement et ne peut être fermenté. (Harun et al., 2009) Dans cette étude, seulement 1% d'acide sulfurique et une durée de traitement de 15 min ont suffi pour prétraiter la poudre d'*ulva lactuca*. En général, l'absence absolue ou quasi-totale de lignine rend l'hydrolyse enzymatique de la cellulose algale plus simple. (John et al., 2011)

### 5.1.2.3. Détermination du taux d'azote dans les extraits de *ulva lactuca*

Les résultats du calcul du taux d'azote dans la poudre de *ulva lactuca* sont donnés dans le **tableau 12** :

**Tableau 12** : Taux d'azote dans les extraits de *ulva lactuca* par la méthode Kjeldahl

|       | Poids<br>(g) | % m.<br>sèche | Poids sec<br>(g) | Vol<br>nécessaire à<br>la titration<br>(mL) | Vol<br>nécessaire<br>à la<br>titration<br>(mL)<br>(-Blanc) | %<br>Azote  | %<br>Protéines    |
|-------|--------------|---------------|------------------|---|--|-------------|-------------------|
| Algue | 506,6        | 0,83          | 422,25           | 7   | 5,6  | 2,14        | 13,39±0.59        |
|       | 500,5        |               | 417,16           | 6,4   | 5  | 1,94        | 12,10±0.06        |
|       | 506,1        |               | 421,83           | 6,56  | 5,16   | 1,98        | 12,35±0.06        |
|       |              |               |                  |   | <b>Moyenne</b>   | <b>2,02</b> | <b>12,61±0.23</b> |

*Ulva lactuca* présente une teneur intéressante en protéines 12,61% (**Tableau 12**), cette fraction représente un coproduit à forte valeur ajoutée multi-usage. En général, la teneur des macroalgues en protéines n'est pas négligeable, elle varie beaucoup en fonction des familles d'algues. Les algues vertes ont des teneurs modérées (10 à 26 %). Par comparaison, la plante de soja, une des sources de protéines végétales de référence, ne contient que 25 % de protéines dans sa matière sèche. Les algues vertes notamment *ulva* sont donc des sources de protéines potentiellement aussi intéressantes que le soja. (Fleurence, 1999)

Comparé à d'autres résultats, un taux de 12,61% concorde avec certains résultats et reste inférieur à d'autres, notamment le taux rapporté par (Smith & Young, 1955) qui est de 21% en protéines.

**Tableau 13 :** Taux de protéines de *Ulva lactuca* comparé à d'autres travaux

| Espèce              | Taux de protéines en % de poids sec | Référence                      |
|---------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Ulva lactuca</i> | 12,61±0,23                          | <b>Cette étude</b>             |
|                     | 10±0,05                             | (Castro-González et al., 1996) |
|                     | 16,41 ± 0,08                        | (Ismail & Mohamed, 2017)       |
|                     | 21±0,12                             | (Smith & Young, 1955)          |

Ce tableau comparatif (**tableau 13**) montre qu'à l'intérieur d'un même groupe d'algues, et même dans la même espèce, la teneur en protéines est très variable pouvant aller de 10 % à 21 % du poids sec. Elle dépend en effet du stade physiologique de l'algue, c'est-à-dire si elle est jeune ou vieille. Pour le genre *ulva*, cette variation saisonnière est due à la présence ou non d'un de ses pigments, la phycoérythrine. Cette protéine s'accumule dans l'algue à la fin de l'hiver (la teneur protéique est maximale à cette période) pour diminuer en été. (Abdel-Fattah & Sary, 1987)

La fraction protéique des algues représente un coproduit qui présente un intérêt nutritionnel pour l'aquaculture et l'alimentation du bétail, cette fraction contient ce que l'on appelle des facteurs antinutritionnels qui limitent leur digestibilité comme les polysaccharides qui se lient

aux protéines et aux enzymes digestives, limitant l'assimilation des protéines et empêchant leur dégradation par les protéases (enzymes) des sucs digestifs. (Fleurence, 1999)

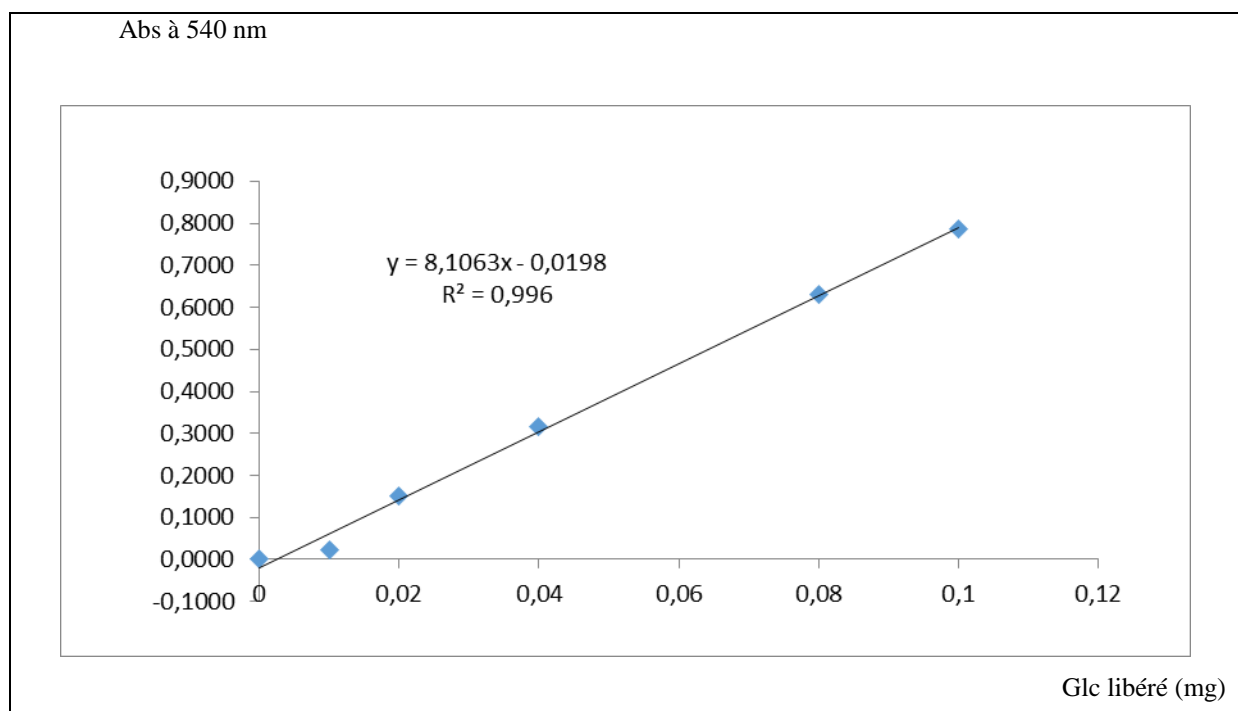
La production du bioéthanol algal utilisant la fraction glucidique permettrait de libérer la fraction protéique algale et améliorerait sa digestibilité, et offre ainsi un aliment pour bétail à forte valeur nutritionnelle.

## 5.2. ETUDES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DE QUELQUES ENZYMES COMMERCIALES

### 5.2.1. Activité de la cellulast

- Courbe d'étalonnage

Les points de la courbe d'étalonnage sont donnés dans le graphe de la **Figure 25** avec les concentrations de glucose avec leurs absorbances correspondantes.



**Figure 25** : Courbe d'étalonnage du glucose à pH=5



De la courbe on peut convertir les absorbances en mg de glucose libéré pour calculer les activités enzymatiques :

**Tableau 14** : Activités Fpase de la Celluclast

|             | Abs sur micro plaque | glucose libéré (mg) | glucose libéré corrigé (mg) | Glucose libéré $\mu$ mole/ ml min (mg glc* 4.69) | Dilution | Activité enzymatique fpase $\mu$ mole/ mL min | Moyenne Des activités enzymatiques |
|-------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|--|----------|---|------------------------------------|
| D<br>1/1500 | 0,195                | 0,03                | 0,014                       | 0,067  | 1500     | 99,9059                                       | <b>113,338</b>                     |
|             | 0,218                | 0,03                | 0,017                       | 0,079  | 1500     | 119,2155                                      |                                    |
|             | 0,22                 | 0,03                | 0,017                       | 0,081  | 1500     | 120,8946                                      |                                    |
| D<br>1/2000 | 0,117                | 0,02                | 0,005                       | 0,023  | 2000     | 45,8951799                                    | <b>68,656</b>                      |
|             | 0,141                | 0,02                | 0,008                       | 0,036  | 2000     | 72,760651                                     |                                    |
|             | 0,154                | 0,02                | 0,009                       | 0,044  | 2000     | 87,3127812                                    |                                    |

La celluclast a une activité estimée à 113,338 FPU/ mL/ min avec une dilution de 1/1500 et une activité de 68,656 FPU/mL/min avec une dilution de 1/2000 (**tableau 14**). Ces valeurs sont en dessous de ce qui aurait dû être trouvé ; en effet le résultat attendu devrait indiquer une libération de 0.08 mg de glucose. (Xiao et al., 2004) Or, le résultat trouvé n'est que de 0,03 mg (moyenne des 3 essais) pour la dilution 1/1500, et de 0,02 mg (moyenne des 3 essais) pour la dilution 1/2000 et encore moins avec correction (soustraction des blancs) c'est-à-dire 0,016 mg pour la dilution 1/1500, et 0,007 pour la dilution 1/2000. Ce qui se traduit par des activités enzymatiques fpase représentant le cinquième du maximum pouvant être obtenu, mais qui restent tout de même de bons résultats traduisant une efficacité de la celluclast à hydrolyser la cellulose du filtre papier Whatman en glucose.

La perte d'efficacité peut se traduire par une mauvaise conservation de l'enzyme, cela ne peut pas avoir des répercussions sur l'efficacité de production de l'éthanol puisque une perte de l'activité enzymatique au stade de saccharification se compense par un ajout en volume de l'enzyme.

### 5.2.2. Activité de la Novozym EG1 (endoglucanase 1)

Les résultats de l'étude de l'activité CMC ase de la Novozym 188 BG sont donnés dans le **tableau 15** :

**Tableau 15** : Activité CMC ase de la Novozym EG1

|        | Absorbance | glucose libéré (mg) | u/ mL min (mg glc ×37,037) | Fact de dilution | CMC ase u/ mL min | Moyenne       |
|--------|------------|---------------------|----------------------------|------------------|-------------------|---------------|
| D 1/25 | 0,168      | 0,02                | 0,434                      | 25               | 10,858            |               |
|        | 0,138      | 0,02                | 0,300                      | 25               | 7,499             | <b>9,029</b>  |
|        | 0,149      | 0,02                | 0,349                      | 25               | 8,731             |               |
| D 1/50 | 0,121      | 0,02                | 0,224                      | 50               | 11,193            |               |
|        | 0,130      | 0,02                | 0,264                      | 50               | 13,208            | <b>13,134</b> |
|        | 0,138      | 0,02                | 0,300                      | 50               | 14,999            |               |

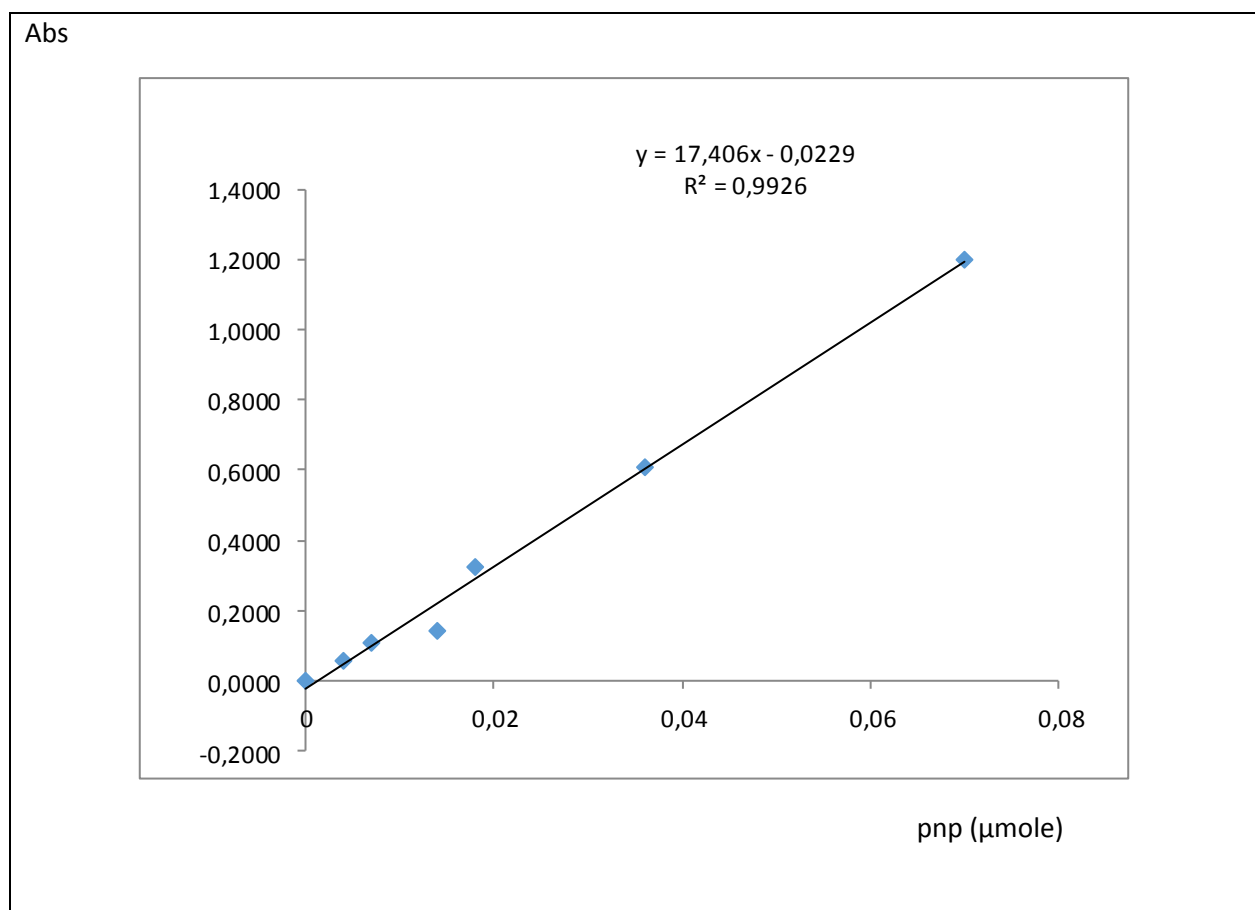
Les résultats montrent que la Novozym permet de libérer 0,02mg de glucose représentant une activité enzymatique CMC ase de 9,029 u/mL/min avec une dilution de 1/25 et une activité de 13.134 u/mL/min avec une dilution de 1/50 (**tableau 15**). Ceci traduit une efficacité de la Novozym à hydrolyser la cellulose contenue dans la sodium carboxymethyl cellulose. Cette activité est réduite car la Novozym commerciale utilisée est composée d'une seule enzyme appelée endoglucanase 1 EG1 qui hydrolyse une partie de la cellulose en glucose laissant le reste sous forme de chaînes de glucose appelée cellobiose et dont l'hydrolyse demande d'autres types de cellulase comme l'endoglucanase 2 EG2 et la  $\beta$  glucosidase BG. Ces deux

dernières sont contenues dans le cocktail enzymatique précédent, commercialisé sous le nom de Celluclast ce qui explique le taux élevé de glucose libéré et la haute activité enzymatique. (Bravo et al.,2002)

### 5.2.3. Activité de $\beta$ -glucosidase et de la $\beta$ -xylosidase

- Courbe d'étalonnage

6 points de différentes concentrations en Pnp ont été nécessaires pour tracer la courbe d'étalonnage du Paranitrophénol, les concentrations sont données dans le graphe suivant (Figure 26):



**Figure 26** : Courbe d'étalonnage du PNP (p-nitrophénol) à pH=5

Les résultats de l'étude de l'activité enzymatique de la  $\beta$  glucosidase sur le substrat pnp-glc-p sont donnés dans le **tableau 16** :

**Tableau 16** : Activité de la  $\beta$  glucosidase sur le pnp-glc-p

|           | Absorbance | pnp<br>( $\mu$ mole) | dilution | Activité BG<br>( $\mu$ mole/<br>mL<br>min) | Moyenne      |
|-----------|------------|----------------------|----------|--|--------------|
| Pnp-glc-p | 0,525      | 0,026                | 100      | 0,260                                      | <b>0,284</b> |
|           | 0,556      | 0,028                | 100      | 0,278                                      |              |
|           | 0,618      | 0,031                | 100      | 0,313                                      |              |

Les résultats montrent que l'activité de la  $\beta$  glucosidase est de de 0,2844 avec le pnp-glc-p avec une dilution enzymatique de d 100 , ce résultat traduit une grande efficacité de l'enzyme à hydrolyser le pnp-glc-p en en coupant les liaisons glucosidiques générant la libération du glucose et du PNP. Le travail de Berghem et Peterson 1974 a présenté le même résultat dans les mêmes conditions opératoires de l'hydrolyse du pnp-glc-p par la  $\beta$ -glucosidase. ([Berghem & Pettersson, 1974](#))

Les résultats de l'étude de l'activité enzymatique de la  $\beta$ -xylosidase sur le substrat pnp-xyl-p sont donnés dans le **tableau 17** :

**Tableau 17** : activité de la  $\beta$ -xylosidase sur le pnp-xyl-p

|           | Absorbance | PNP ( $\mu$ mole) | dilution | Activité BX<br>( $\mu$ mole/<br>mLmin) | Moyenne      |
|-----------|------------|-------------------|----------|--|--------------|
| Pnp-xyl-p | 0,274      | 0,012             | 1000     | 1,182                                  | <b>1,282</b> |
|           | 0,299      | 0,013             | 1000     | 1,324                                  |              |
|           | 0,302      | 0,013             | 1000     | 1,341                                  |              |

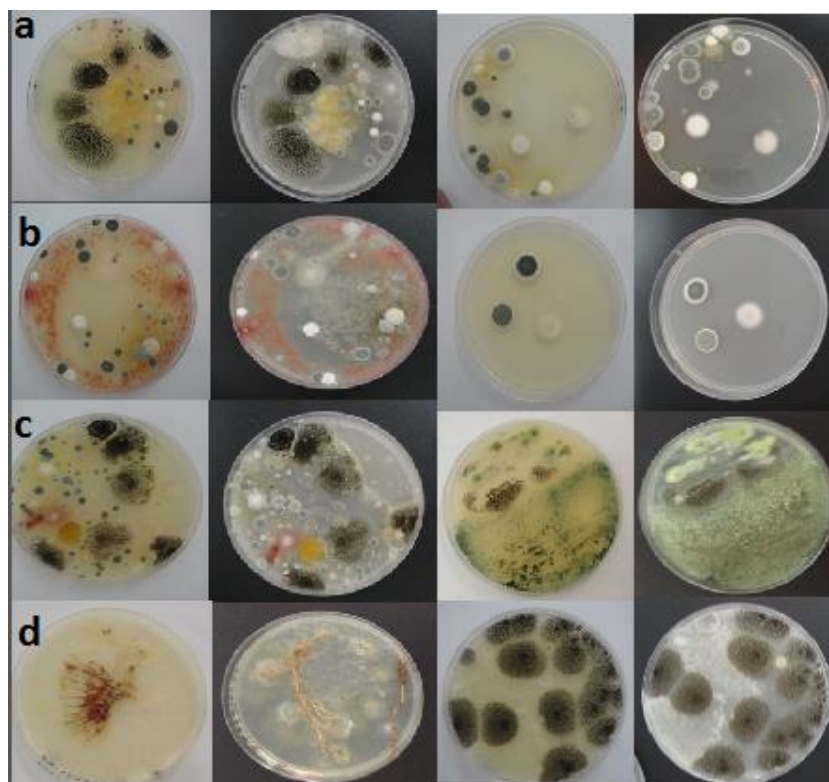
Les résultats montrent que la BX a permis une libération de 0,0126  $\mu$ mole de PNP correspondant à une activité enzymatique de 1,282  $\mu$ mole/mL.min, Jin et ses collaborateurs

ont trouvé un résultat similaire (1,17 ( $\mu\text{mole/ mLmin}$ )) avec une  $\beta$ -xylosidase extraite à partir du champignon *Aspergillus niger* (Jin et al., 2020). Ce résultat traduit une grande efficacité de la bêta xylosidase à hydrolyser les extrémités non réductrices des xylo-oligosaccharides lui permettant de libérer le PNP et le xylose. (Saleem et al., 2012).

### 5.3. ISOLEMENT DE CHAMPIGNONS CELLULOLYTIQUES

#### 5.3.1. Résultats de l'isolement des champignons à partir de la rhizosphère et des racines

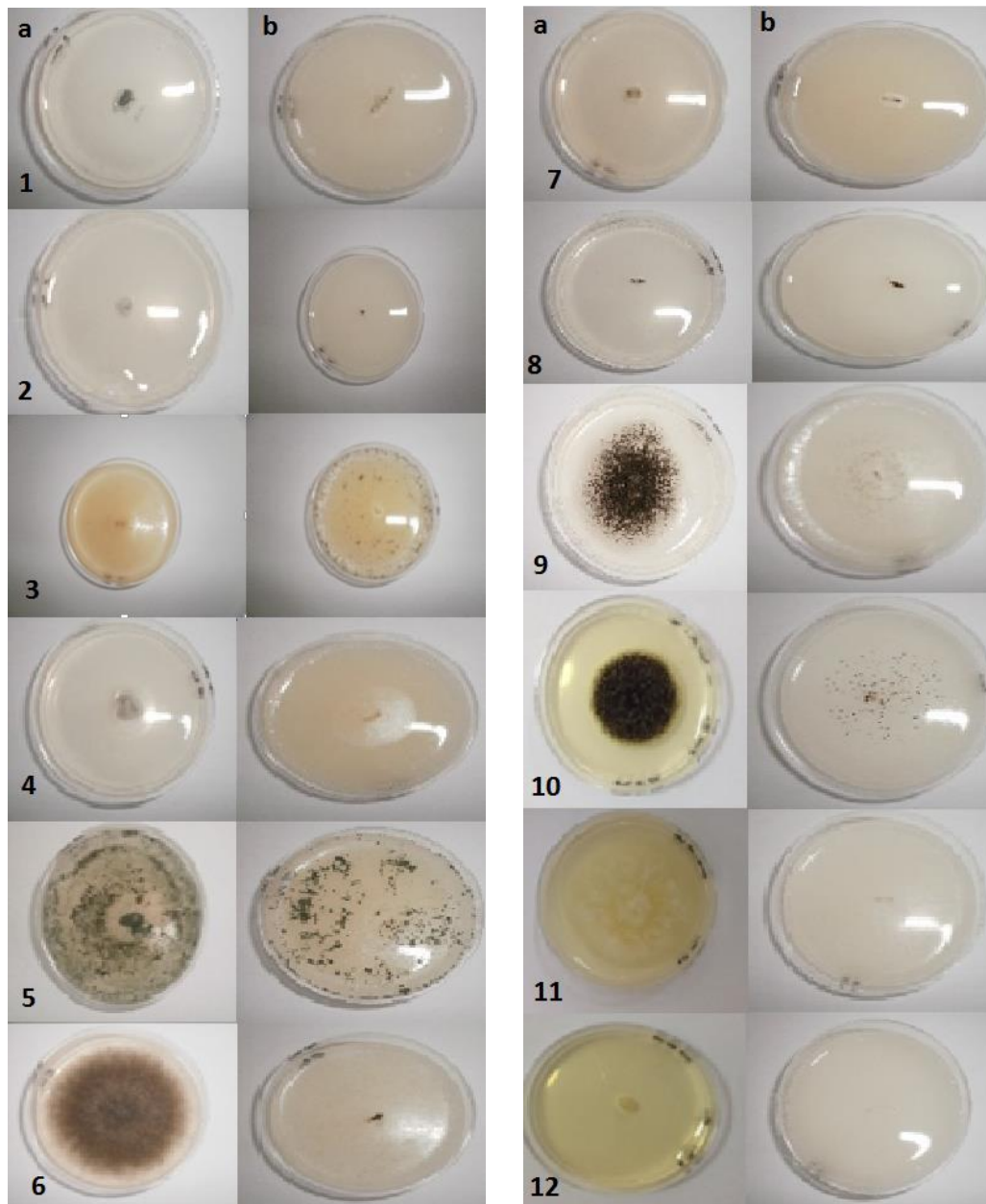
Après incubation des boîtesensemencées avec des solutions contenant du sol de rhizosphère enrichie en non enrichie en cellulose ainsi que des racines directement posées sur la gélose. Plusieurs colonies se sont développées sur la gélose, elles sont présentées dans la **Figure 27**.



**Figure 27** : Souches fongiques développées à partir d'échantillons de sol et de racine sur milieu PDA+ATB (a : sol non enrichi en cellulose, b et c : sol enrichi en cellulose, d :

racines)

La culture des souches individuellement sur milieux PDA a permis le développement de 12 souches différentes, elles ont été isolées une par une, et repiquées sur le milieu czapek-glucose et czapek-CMC, leurs morphologies sont données dans les photos suivantes :

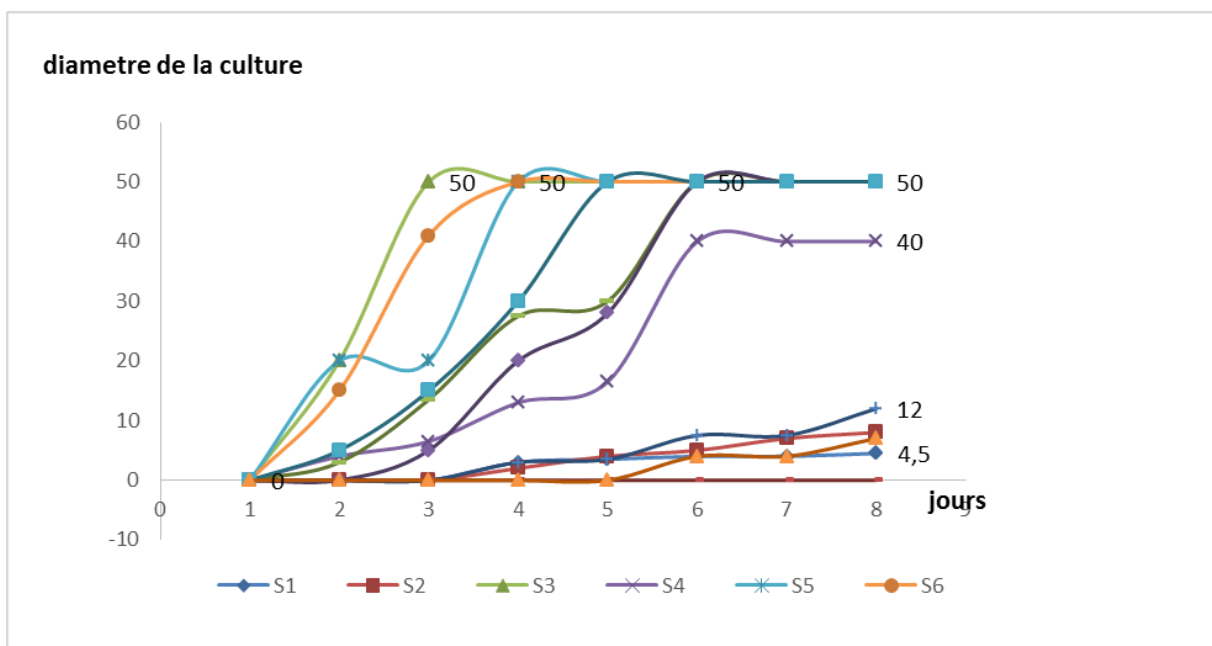


**Figure 28** : Souches (1 à 12) à j+4 de champignons isolées du sol cultivées sur milieu (a) czapek glucose, (b) czapek cellulose

Les cultures représentées dans la **Figure 28**, montrent différents taux de croissance au 4<sup>ème</sup> jour de culture, en effet certaines souches comme la N°=8 n'ont pas poussé sur le milieu czapek supplémenté de glucose ou cellulose, d'autres montrent une faible croissance à peine visible comme les souches 1, 2, 4, 7,12 sur milieu czapek glucose et presque pas de croissance sur milieu czapek cellulose. D'autres souches comme la 6, 10,11 montrent une bonne croissance sur czapek glucose et une croissance moyenne sur czapek cellulose. Les couches 3, 5, 9 sont les seules souches à présenter une bonne croissance sur les 2 milieux, ceci traduit une bonne adaptabilité des souches aux sucres sources de carbone et une production de cellulase leur permettant une bonne croissance sur les milieux contenant de la cellulose.

### 5.3.2. Taux de croissance des souches

La croissance des 12 souches de champignons isolées et repiquées sur le milieu czapek-CMC a été évaluée par rapport au diamètre de la colonie centrale, elle est donnée dans la **Figure 29**.



**Figure 29** : Courbes de croissance des souches fongiques S1 à S12 sur milieu czapek-CMC pendant 8 jours

Les résultats montrent que sur les 12 souches isolées, 11 ont poussé sur le milieu czapek supplémenté de CMC (**Figure 29**), ce qui nous permet de conclure que toutes ces souches sont cellulolytiques puisqu'elles ont produit une cellulase leur permettant de saccharifier la CMC et l'utiliser comme source de carbone.

Cependant, on remarque que les 11 souches ont des taux de croissance inégaux, seules 6 souches sur 11 ont atteint le périmètre maximale de la boîte de pétri (50 mm) au bout de 8 jours. La souche N°5 était la première à atteindre ce diamètre et cela dès le 2<sup>ème</sup> jour de culture, présentant ainsi le meilleur taux de croissance. Les souches N°6 et N°3 l'ont atteint le 3<sup>ème</sup> jour, la souche N°11 au 4<sup>ème</sup> jour tandis que les souches N°9 et N°10 l'ont atteint le 5<sup>ème</sup> jour. Les souches N°1, N°2, N°12 ont présenté une croissance lente avec un diamètre de la colonie centrale inférieur à 1cm au bout de 8 jours.

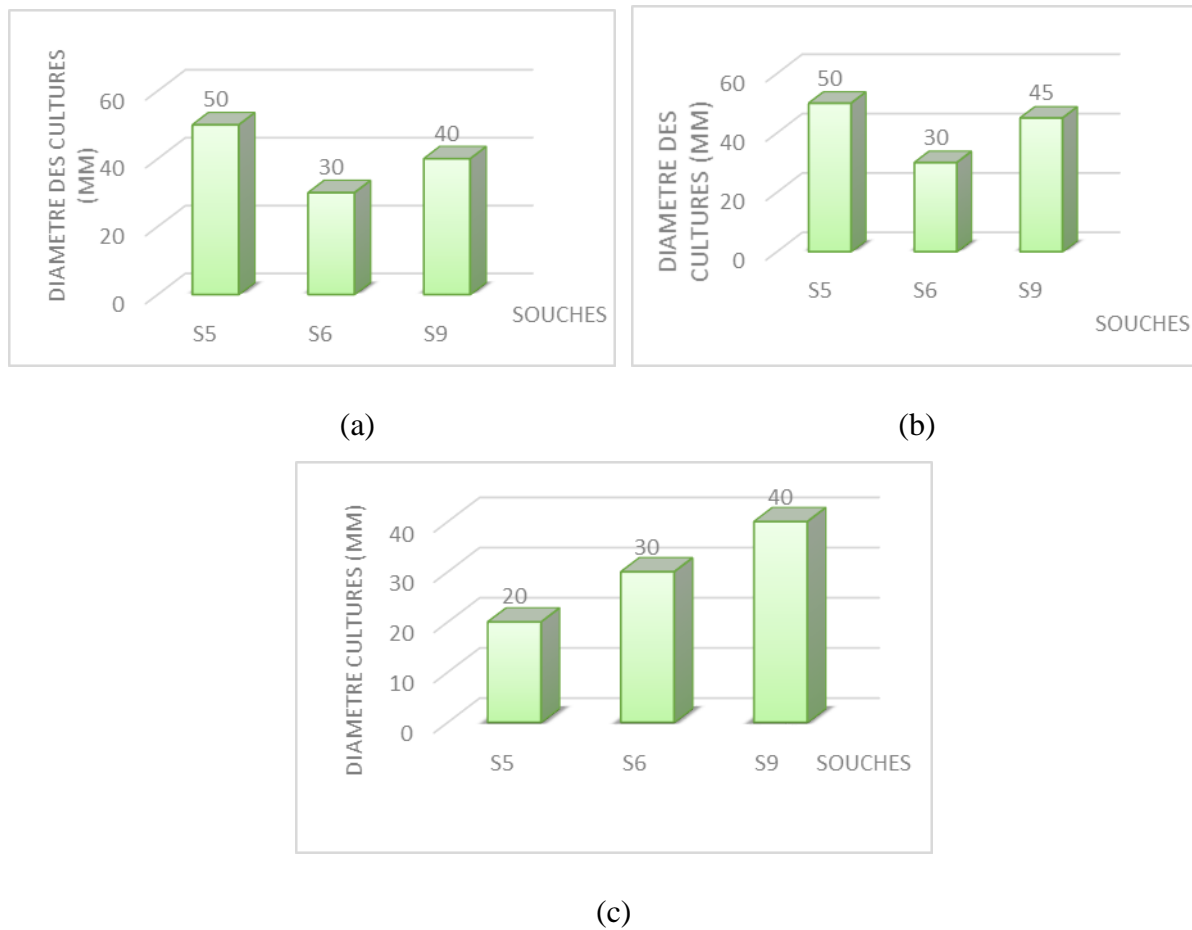
### **5.3.3. Sélection des meilleures souches cellulolytiques en se basant sur un milieu de culture sélectif**

Les souches qui ont montré une bonne croissance sur milieu contenant une source de cellulose ont été testées sur des milieux contenant du son de blé, du marc de café et de l'amidon pour sélectionner les souches les plus performantes pour hydrolyser la cellulose et déterminer la nature des enzymes produites.

Les résultats montrent que la souche S5 a le taux de croissance le plus élevé sur les milieux czapek son de blé et marc de café avec un diamètre de la culture centrale de 50 mm au 4<sup>ème</sup> jours de croissance (**Figure 30 a, b**).

Sur le milieu czapek amidon, son taux est moyen, ce qui veut dire que la souche S5 est plus productrice de cellulase que d'amylase (**Figure 30 c**),





**Figure 30 :** Taux de croissances des souches S5, S6, et S9 sur milieu (a) czapek son de blé, (b) czapek marc de café et (c) czapek amidon

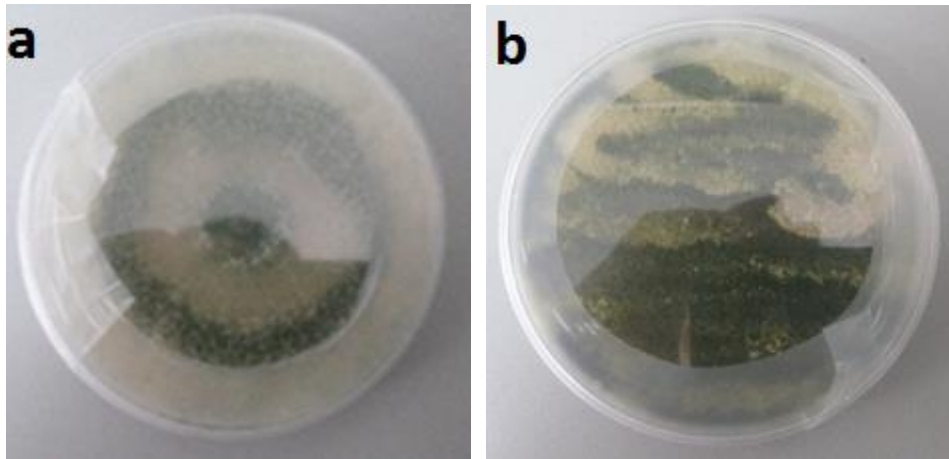
Les résultats montrent également que la souche S9 pousse très bien sur l'amidon (**figure 30 (c)**) et moyennement sur la cellulose contenue dans le son de blé et le marc de café (**Figure 30 a, b**). Quant à la souche S6 elle montre une bonne croissance moyenne sur les 3 milieux sans atteindre le diamètre maximale de croissance (50 mm) au 4<sup>ème</sup> jour de culture.

#### 5.3.4. Identification de la souche cellulolytique sélectionnée

D'après les résultats des cultures sur milieu sélectif, la souche SN<sup>o</sup>=5 a été choisie pour mener à bien les saccharifications de la biomasse cellulosique. L'identification de la souche SN<sup>o</sup>=5

s'est basée sur les caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques spécifiques à l'espèce appelés « caractéristiques clés » qui sont décisifs pour l'identification, y compris le modèle de croissance, le taux de croissance et la couleur.

#### 5.3.4.1. Identification macroscopique

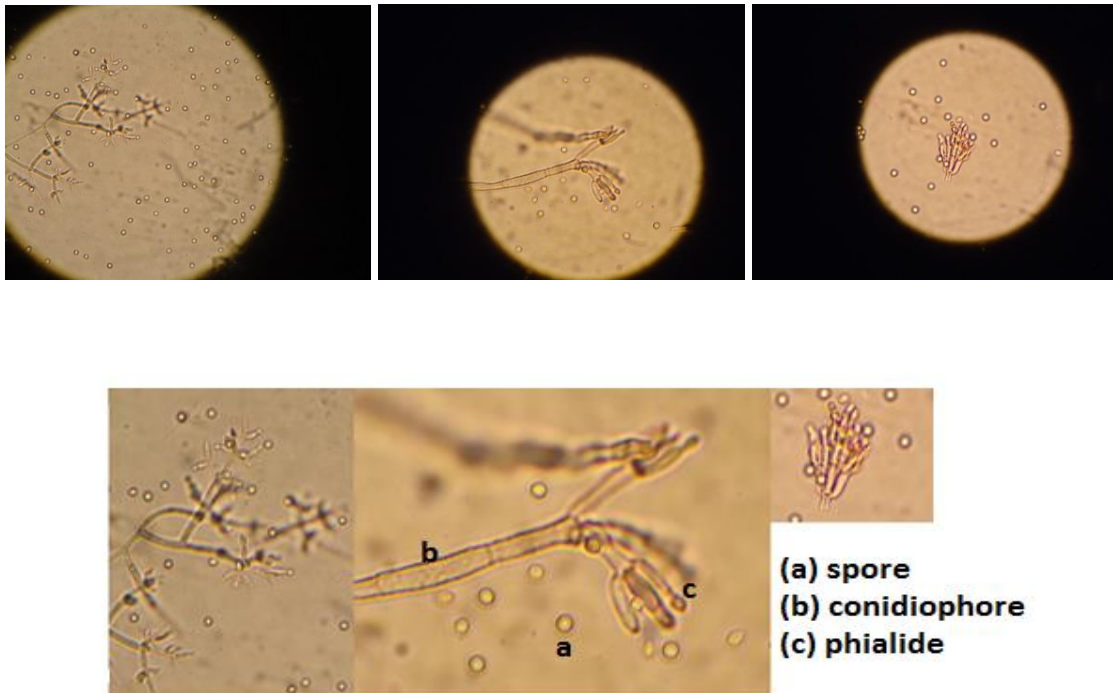


**Figure 31:** Souche N°=5ensemencée en (a) culture centrale et (b) en stries après 7 jours de culture

La souche N°=5 étudiée possède un mycélium aérien de couleur blanche (**Figure 31, a**). Ses structures de reproduction apparaissent dans le mycélium après 2 jours de culture, montrant une pigmentation verte en surface (liée à la présence de conidiospores). Cette conidiogénèse est suivie par l'apparition d'une coloration jaunâtre du mycélium au niveau de la surface inférieure, et ce, après 5 jours de culture.

#### 5.3.4.2. Identification microscopique

L'observation de la souche N°=5 au microscope photonique  $\times 40$  avec une coloration au rouge Congo révèle un mycélium septé ou ramifié (**Figure 32, c**), de couleur verte ou transparente ; la structure de reproduction (le conidiophore) se développe à partir d'une cellule différenciée. Les conidies sont généralement produites aux extrémités des phialides. ([Hamrouni, 2019](#))


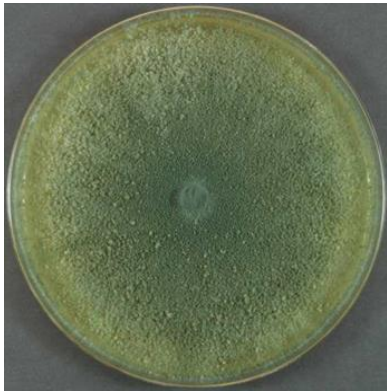

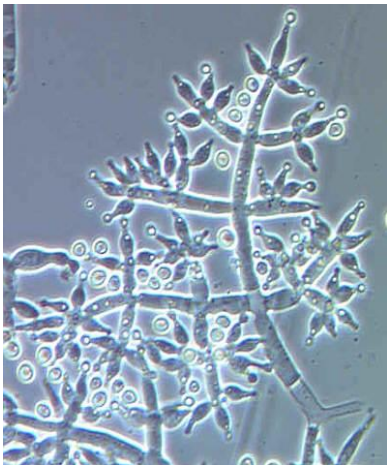


**Figure 32 :** Mycélium de la souche N°=5 colorée au rouge Congo, vu au microscope photonique  $\times 40$

D'après les clés d'identification microscopiques et macroscopiques, la souche N°=5 appartient au genre *Trichoderma*. Ces clés d'identifications sont : **(tableau 18)**

- Couleur de la colonie sur gélose, verte foncée et blanche en cercles séparés avec un aspect poudreux en surface ;
- La forme du mycélium en arbre ramifié ;
- La forme des conidies comme principaux caractères pour identifier l'espèce (Gams et Bisset), sporulation vert foncé à vert bleuâtre foncé ;
- Conidiophore généralement long, septé et ramifié ;
- Phialides fréquemment pariés, convergents ou divergents ;
- Spores globuleuses à ellipsoïdales.

Tableau 18 : Clés d'identification de *trichoderma* sp

|   | Souche N°=5   | Trichoderma spp   |
|---|---|---|
| Aspect morphologique sur boîte à j+7 de culture |    | <br>E. G. Simmons 1977  |
| Aspect du mycélium                              |  | <br>USDA<br>US department of Agriculture, Agricultural Research Service, Systematic Botany and Mycology Laboratory, |

Sur la base de ces clés d'identification, la souche N°=5, a été identifiée comme étant *Trichoderma* sp. .(Sekhar et al., 2017)

Sa classification est la suivante: (Hendrik, 1801)

|                               |                          |
|-------------------------------|--------------------------|
| <b><u>Règne :</u></b>         | <i>Fungi</i>             |
| <b><u>Division :</u></b>      | <i>Ascomycota</i>        |
| <b><u>Sous division :</u></b> | <i>Pezizomycotina</i>    |
| <b><u>Classe :</u></b>        | <i>Sordariomycetes</i>   |
| <b><u>Sous classe :</u></b>   | <i>Hypocreomycetidae</i> |
| <b><u>Ordre :</u></b>         | <i>Hypocreales</i>       |
| <b><u>Famille :</u></b>       | <i>Hypocreaceae</i>      |
| <b><u>Genre :</u></b>         | <i>Trichoderma</i>       |

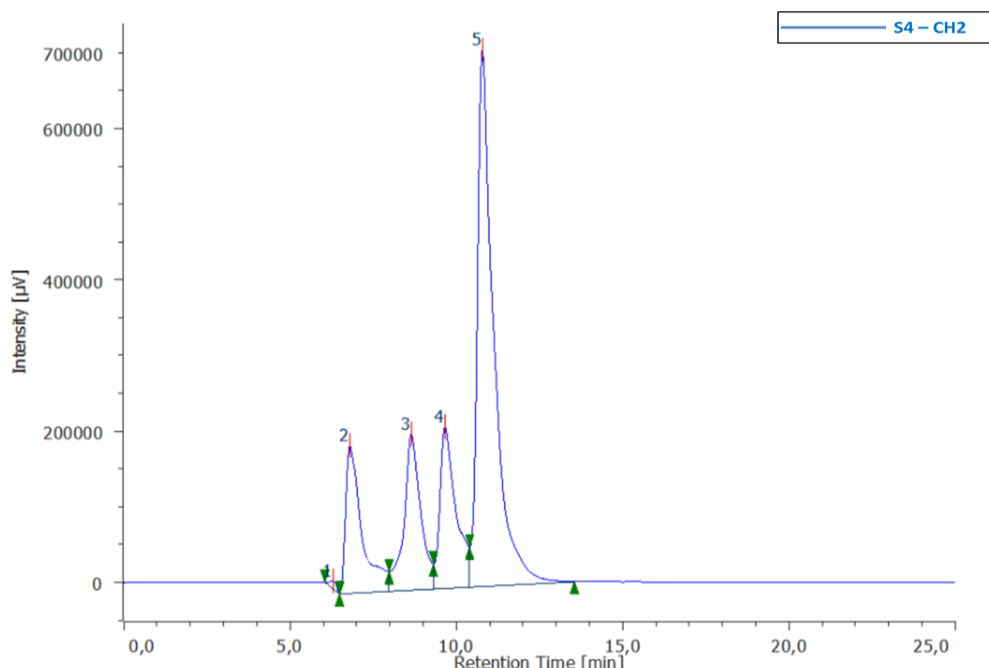
#### 5.4. PRODUCTION DE BIOETHANOL A PARTIR DES HYDROLYSATS DE *ULVA LACTUCA*

##### 5.4.1. Production de bioéthanol à partir des hydrolysats de *ulva lactuca* utilisant une enzyme commerciale

###### 5.4.1.1. Saccharification

D'après l'étude de l'activité enzymatique de la celluclast et qui était de 68,65 FPU/mL et en se basant le taux de 20 FPU nécessaire pour saccharifier 1g de substrat, le volume d'enzyme nécessaire à l'hydrolyse de 1 g d'algue prétraité est de 218  $\mu$ L de celluclast /g d'algue prétraitée. Le taux du glucose libéré a été déterminé par HPLC, pour cela du glucose a été injecté dans la vanne d'injection de l'HPLC pour déterminer son temps de rétention. Le pic de ce dernier est apparu à 9,7 min dans les conditions opératoires suivantes : volume d'injection : 20  $\mu$ L, durée d'exécution : 30 min, phase mobile: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02M, débit: 0,8 mL/minute, température de la colonne : 60°C

Le spectre HPLC du 4eme jour de saccharification est donné dans la **Figure 33**



**Figure 33** : Spectre HPLC de la concentration maximale du glucose libéré enregistré au 4<sup>ème</sup> jour de saccharification

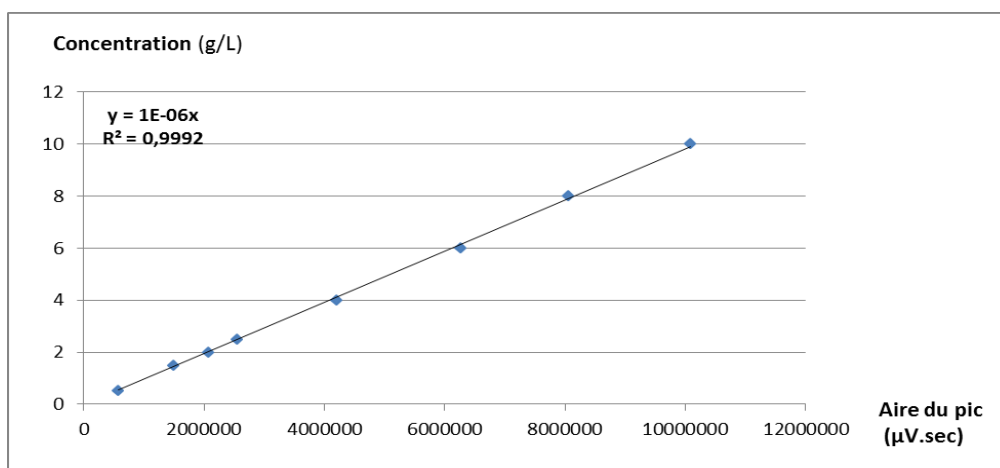
La **Figure 33** représente le spectre HPLC de la concentration du glucose libéré au cours de la saccharification enzymatique, le pic N°=4 a été enregistré à un temps de rétention  $t_r = 9,66$  min, identifié comme étant le pic du glucose dont le temps de rétention est de  $t_r = 9,7$  min.

Le reste des données du spectre HPLC du 4<sup>ème</sup> jour de saccharification est donné dans le **tableau 19** :

**Tableau 19** : données du spectre HPLC du 4<sup>ème</sup> jour de saccharification

| pic      | Temps de rétention $t_r$ (min) | Aire du pic $\mu V \cdot sec$ | % de l'aire du pic |
|----------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| 1        | 6,3                            | 154874                        | 0,33               |
| 2        | 6,8                            | 6647726                       | 14,5               |
| 3        | 8,64                           | 7199210                       | 15,70              |
| <b>4</b> | <b>9,66</b>                    | <b>7209461</b>                | <b>15,73</b>       |
| 5        | 10,78                          | 24621225                      | 52,72              |

Les données du spectre HPLC du 4<sup>ème</sup> jour de saccharification (**tableau 19**) montrent 5 différents pics, le pic du glucose enregistré à 9,66 min avec une aire de 7209461  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$  représentant un pourcentage de 15,73% de l'aires totale des pics, pour convertir cette aire en concentration, une courbe étalon du glucose a été réalisée avec des concentrations allant de 0,2 à 10 g/L, la courbe étalon est donnée dans la **Figure 34** :



**Figure 34** : Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose par HPLC

La conversion de l'aire du pic du glucose donné dans le spectre donne une concentration de 7,209 g/L pour une aire de 7209461  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ , le **tableau 20** ci-dessous donne les taux du glucose libéré durant les 4 jours de la saccharification enzymatique.

**Tableau 20** : Taux de glucose libéré durant la saccharification enzymatique de *ulva lactuca*

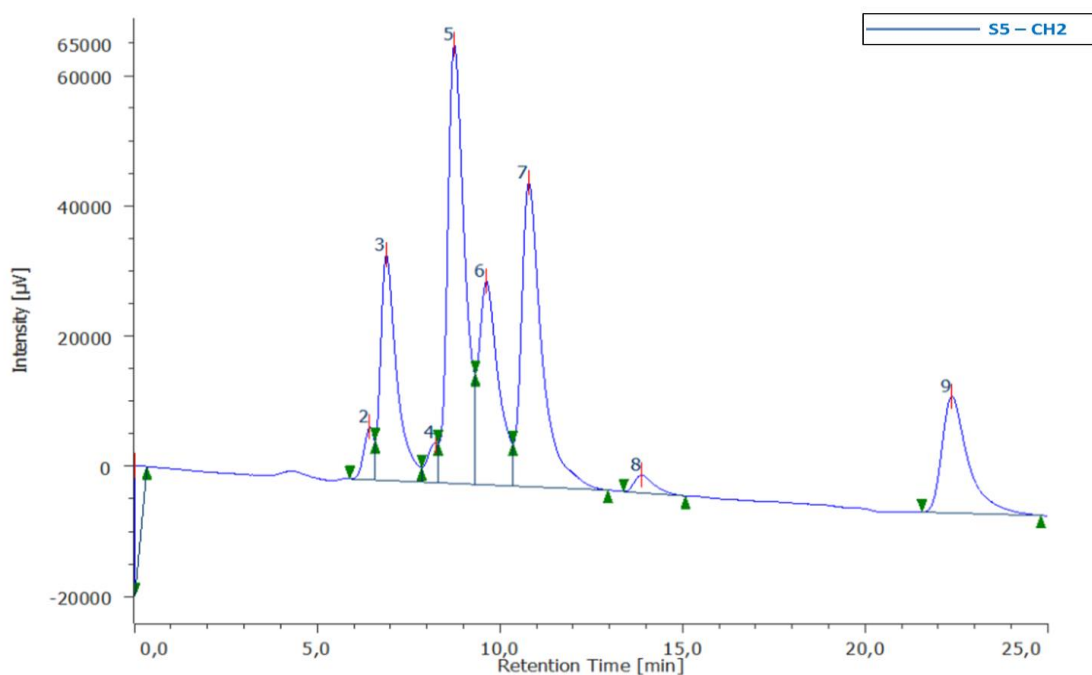
|                                     | 24h         | 48h         | 72h         | 96h         |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Taux de glucose (g/L)</b>        | 1,19±0,02   | 1,85±0,06   | 5,42±0,51   | 7,21±0,47   |
| <b>Taux de saccharification (%)</b> | 14,03± 0,02 | 21,81± 0,06 | 63,90± 0,51 | 85,01± 0,47 |

Le **tableau 20** montre que le taux de libération quotidienne du glucose a commencé lentement les deux premiers jours puis s'est accéléré, le taux maximum de 7,21 g/L a été atteint au bout

de 4 jours de saccharification, cette valeur se rapproche de la quantité totale de glucose contenue dans *ulva lactuca* estimée à 8,481 g/L (**tableau 10**), montrant une efficacité enzymatique de 85,01 %, ce qui traduit une excellente efficacité de la celluclast.

#### 5.4.1.2. Fermentation

La fermentation a été réalisée sur une suspension d'*ulva lactuca* préalablement prétraitée et hydrolysée par la Celluclast pendant 2 jours, le taux du sucre consommé et de l'éthanol produit ont été mesurés par HPLC. Les résultats du 1<sup>er</sup> jour de fermentation sont donnés dans la (**figure 35**). Le pic du glucose est apparu à 9,7 min et celui de l'éthanol à 22,5 min dans les conditions opératoires suivantes : volume d'injection : 20  $\mu$ L, durée d'exécution : 30 min, phase mobile: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02M, débit: 0,8 mL/minute, température de la colonne : 60°C



**Figure 35** : Spectre HPLC de la concentration du glucose et de l'éthanol enregistré après 24h de fermentation



La **Figure 34** représente le spectre HPLC de la concentration du glucose et de l'éthanol durant le premier jour de fermentation, le pic N°=6 a été enregistré à un temps de rétention  $t_r = 9,63$  min, identifié comme étant le pic du glucose dont le temps de rétention est de  $t_r = 9,7$  min.

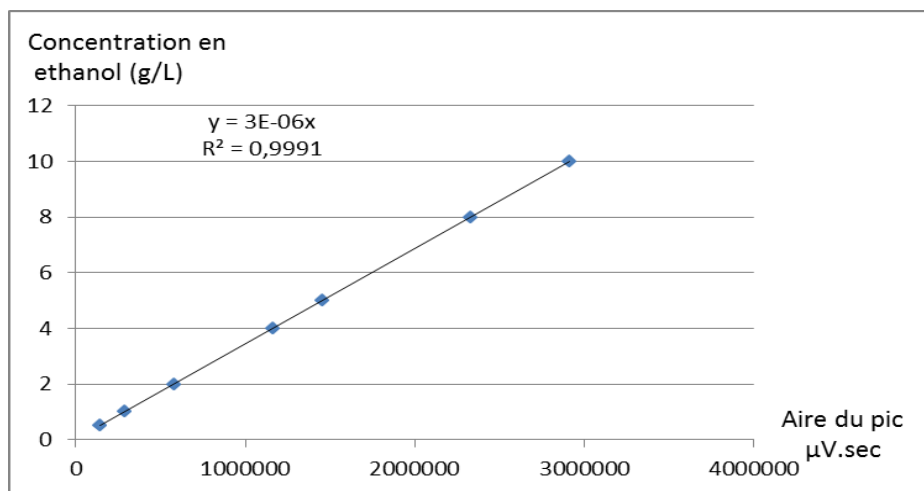
Le pic N°=9 a été enregistré à un temps de rétention  $t_r = 22,3$  min identifié comme étant le pic de l'éthanol dont le temps de rétention est de  $t_r = 22,5$  min. Le reste des données du spectre HPLC du 1<sup>er</sup> jour de fermentation est donné dans le **tableau 21** :

**Tableau 21:** données du spectre HPLC du 1<sup>er</sup> jour de fermentation

| pic      | Temps de rétention $t_r$ (min) | Aire du pic $\mu V \cdot sec$ | % de l'aire du pic |
|----------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| 1        | 0,017                          | 194476                        | 2,51               |
| 2        | 6,44                           | 154929                        | 2,005              |
| 3        | 6,89                           | 1074938                       | 13,91              |
| 4        | 8,24                           | 122605                        | 1,58               |
| 5        | 8,75                           | 2183485                       | 28,25              |
| <b>6</b> | <b>9,63</b>                    | <b>1169535</b>                | <b>15,13</b>       |
| 7        | 10,79                          | 1828599                       | 23,66              |
| 8        | 13,88                          | 103829                        | 1,34               |
| <b>9</b> | <b>22,3</b>                    | <b>824923</b>                 | <b>11,58</b>       |

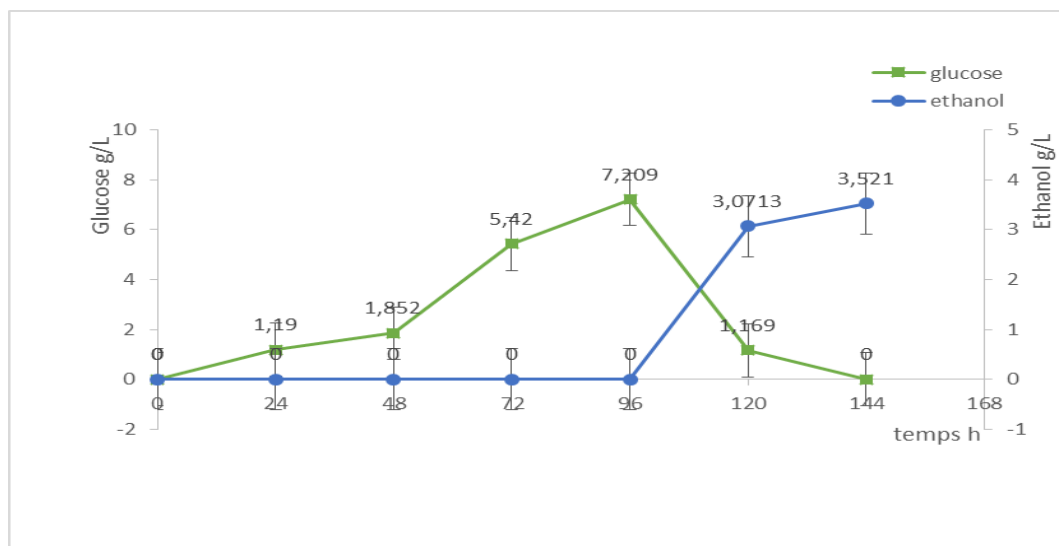
Les données du spectre HPLC du 1<sup>er</sup> jour de fermentation (**tableau 21**) montrent 9 différents pics, le pic du glucose enregistré à 9,63 min avec une aire de **1169535**  $\mu V \cdot sec$  représentant un pourcentage de 15,13% de l'aire totale des pics, le pic de l'éthanol enregistré à 22,3 min avec une aire de **824923**  $\mu V \cdot sec$  représentant un pourcentage de 11,58 % de l'aire totale des pics. Pour convertir ces aires en concentration, la même courbe étalon du glucose que celle utilisée

lors de l'étape de la saccharification a été utilisée (**figure 34**), une courbe d'étalonnage de l'éthanol a été réalisée avec des concentrations allant de 0,5 à 10 g/L, la courbe étalon est donnée dans la **Figure 36** :



**Figure 36:** Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'éthanol par HPLC

La conversion de l'aire du pic du glucose et de l'éthanol donnés dans le spectre donne une concentration de 1,169 g/L pour une aire de **1169535** μV.sec pour le glucose et une concentration de 3,07 g/L pour une aire de **824923** μV.sec pour l'éthanol. La **figure 37** ci-dessous donne les résultats de la consommation du glucose et la production de l'éthanol.



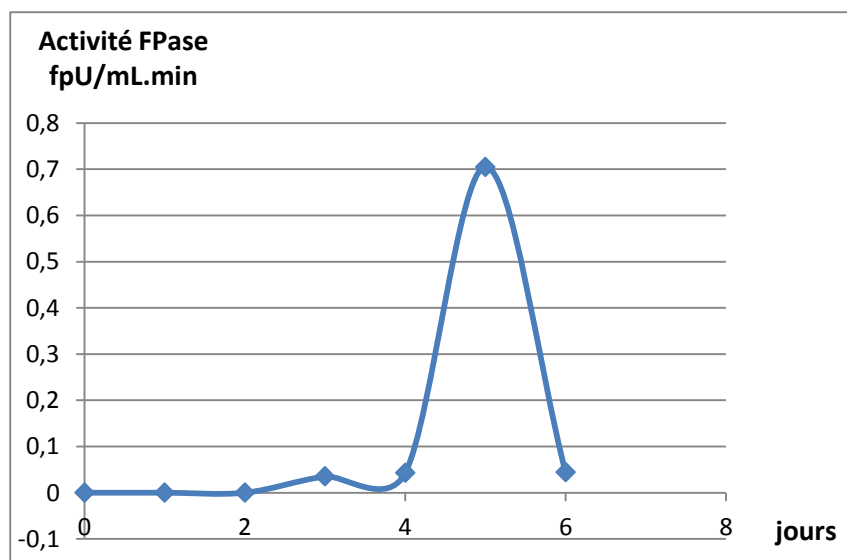
**Figure 37 :** Saccharification et fermentation des hydrolysats de *ulva lactuca*

Comme le montre la **Figure 37**, 6,04 g/L de glucose ont été consommés les premières 24h de fermentation, correspondant à une consommation de 83,78 % du glucose total ; les 1,17 g/L de glucose restant ont été consommés au cours du deuxième jour. Durant les premières 48H de fermentation, tout le glucose produit lors de la saccharification enzymatique a été consommé, conduisant dans le même temps à la production de 3,52 g/L d'éthanol. Le rendement en éthanol résultant, était proche du taux théorique maximum pouvant être obtenu 0.51 g éthanol / g glucose (Chin & Hng, 2013) puisqu'il a été estimé à 0,41 g d'éthanol/g de sucres, soit 81,4 % du rendement en éthanol théorique.

#### 5.4.2. Production du bioéthanol à partir des hydrolysats de *ulva lactuca* utilisant des surnageants de culture fongique

L'activité FPase a été étudiée de la même façon que celle qui a été décrite pour les autres enzymes commerciales, sauf que des surnageants de culture fongique prélevés et filtrés quotidiennement ont été utilisés à la place des cellulases commerciales.

Les résultats sont rapportés dans la **figure 38** :



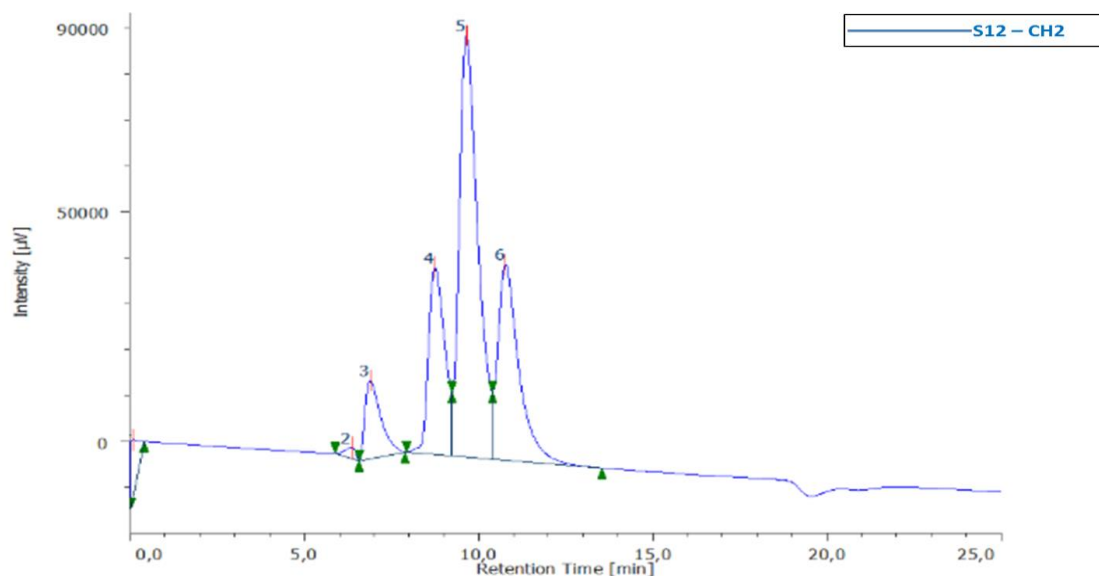
**Figure 38** : Activité FPase du surnageant de la souche N°=5 (fpu / ml min)

Les résultats montrent que l'activité Fpase de cette souche est acceptable, la meilleure activité Fpase a été enregistrée le 5<sup>ème</sup> jour avec 0,07 FPU/mL/min.

Ce résultat clé est indispensable et sert à déterminer le jour ou la culture doit être arrêtée pour récupérer les surnageants les plus efficaces pour hydrolyser la cellulose (le 5<sup>ème</sup> jour dans cette expérience).

Ce résultats nous permet également de calculer le volume nécessaire pour saccharifier les hydrolysats d'algue, en effet chaque gramme de substrat nécessite 20 FPU, à partir de cette base, le volume nécessaire pour une hydrolyse complète est de 285 ml de surnageant (avec une activité de 0,07 FPU pour chaque mL). Le surnageant a été récupéré, centrifugé et filtré à travers un filtre seringue de 45µm puis 20µm puis ajouté à 30 mL de tampon acétate et 4,5 mL d'azide de sodium et 1 g d'algue prétraitée.

La saccharification a été menée à 45°C, 150 rpm pendant 4 jours. Le taux du glucose libéré a été déterminé par HPLC dans les conditions opératoires suivantes : volume d'injection : 20 µL, durée d'exécution : 30 min, phase mobile: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02M, débit: 0, 8 mL/minute, température de la colonne : 60°C. Le spectre HPLC du 4eme jour de saccharification est donné dans la **Figure 39**.



**Figure 39** : Spectre HPLC de la concentration du glucose enregistré après 6 jours de saccharification utilisant un surnageant enzymatique

La **Figure 39** représente le spectre HPLC de la concentration du glucose libéré au cours de la saccharification utilisant un surnageant enzymatique, le pic N°=5 a été enregistré à un temps de rétention  $t_r = 9,64$  min, identifié comme étant le pic du glucose dont le temps de rétention est de  $t_r = 9,7$  min. Le reste des données du spectre HPLC du 6<sup>ème</sup> jour de saccharification est donné dans le **tableau 22**:

**Tableau 22** : données du spectre HPLC du 6<sup>ème</sup> jour de saccharification

| pic      | Temps de rétention<br>$t_r$ (min) | Aire du pic<br>$\mu V \cdot sec$ | % de l'aire du pic |
|----------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| 1        | 0,09                              | 170840                           | 2,34               |
| 2        | 6,36                              | 51467                            | 0,70               |
| 3        | 6,88                              | 537792                           | 7,37               |
| 4        | 8,75                              | 1326602                          | 18,18              |
| <b>5</b> | <b>9,64</b>                       | <b>3168157</b>                   | <b>46,57</b>       |
| 6        | 10,77                             | 1811088                          | 24,82              |

Les données du spectre HPLC du 6<sup>ème</sup> jour de saccharification utilisant un surnageant enzymatique (**tableau 22**) montrent 6 différents pics, le pic du glucose enregistré à 9,64 min avec une aire de **3168157**  $\mu V \cdot sec$  représentant un pourcentage de **46,57** de l'aires totale des pics, pour convertir cette aire en concentration, la même courbe d'étalonnage du glucose utilisant l'enzyme commerciale (**figure 34**) a été utilisée.

La conversion de l'aire du pic du glucose donné dans le spectre donne une concentration de 3,16 g/L pour une aire de **3168157**  $\mu V \cdot sec$ , le **tableau 23** ci-dessous donne les résultats de glucose libéré durant les 6 jours de la saccharification utilisant un surnageant enzymatique.

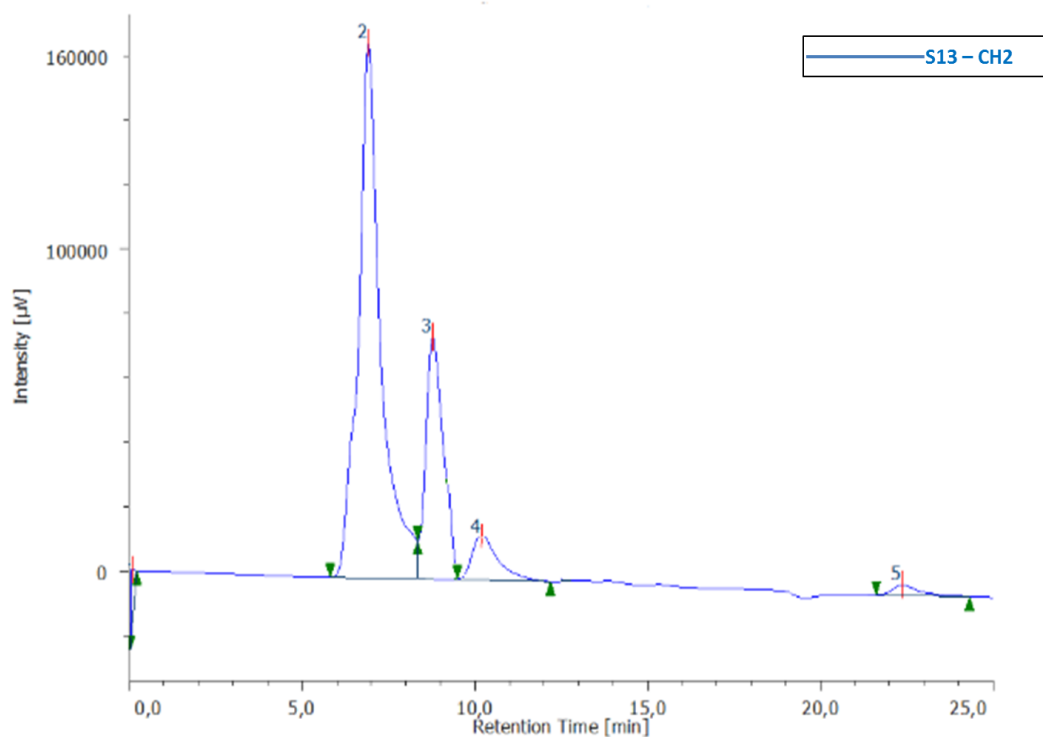
**Tableau 23** : saccharification des hydrolysats de *ulva lactuca* utilisant un surnageant de *trichoderma sp*

|                                       | 24 h   | 48 h   | 72 h   | 96h    | 144 h  | 168 h  |
|---------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>Concentration en glucose (g/L)</b> | 1,01   | 1,14   | 1.18   | 2.17   | 4.42   | 3.16   |
| <b>Taux de saccharification (%)</b>   | 11.91% | 13.44% | 13.91% | 25.58% | 52.12% | 37.26% |

Les résultats (**tableau 23**) montrent que le taux de libération quotidienne du glucose a commencé progressivement les trois premiers jours puis s'est accéléré, le taux maximum de 4,42 g/L a été atteint le 6<sup>ème</sup> jour de saccharification. Cette valeur représente la moitié de la quantité totale de glucose contenue dans *ulva lactuca* estimée à 8,481 g/L (**tableau 10**), traduisant un taux de saccharification de 52,12 %, et une efficacité enzymatique moyenne du surnageant de souche N°=5 identifiée comme appartenant au genre *Trichoderma*. Comparée à celle qui est obtenue avec une enzyme commerciale, la saccharification avec le surnageant de cette culture fongique est plus longue ; elle a duré 7 jours contre 4 jours pour la Celluclast, avec une efficacité moindre, de 52,12% contre 85,01% pour l'enzyme commerciale. Ce qui s'explique par le fait que l'enzyme commerciale contient souvent des mélanges de 2 ou 3 enzymes dont les actions se complètent pour hydrolyser différentes liaisons osidiques et libérer le maximum d'unités de glucose, tandis qu'un surnageant contient la plupart du temps une seule enzyme qui agit sur un type de liaison osidique limitant ainsi l'efficacité enzymatique.

#### 5.4.2.1. Fermentation

Le taux du sucre consommé et de l'éthanol produit durant la fermentation ont été mesurés par HPLC. Le pic du glucose est apparu à 9,7 min et celui de l'éthanol à 22,5 min dans les conditions opératoires suivantes : volume d'injection : 20 µL, durée d'exécution : 30 min, phase mobile: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02M, débit: 0,8 mL/minute, température de la colonne : 60°C



**Figure 40:** Spectre HPLC de la concentration du glucose et de l'éthanol enregistré après 24h de fermentation utilisant un surnageant enzymatique

La **Figure 40** représente le spectre HPLC de la concentration du glucose et de l'éthanol durant le premier jour de fermentation, le pic N°=4 a été enregistré à un temps de rétention  $t_r = 9,66$  min, identifié comme étant le pic du glucose dont le temps de rétention est de  $t_r = 9,7$  min.

Le pic N°=5 a été enregistré à un temps de rétention  $t_r = 22,36$  min identifié comme étant le pic de l'éthanol dont le temps de rétention est de  $t_r = 22,5$  min. Le reste des données du spectre HPLC du 1<sup>er</sup> jour de fermentation est donné dans le **tableau 24** :

**Tableau 24** : données du spectre HPLC du 1<sup>er</sup> jour de fermentation utilisant un surnageant enzymatique

| pic      | Temps de rétention tr (min) | Aire du pic $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ | % de l'aire du pic |
|----------|-----------------------------|--|--------------------|
| 1        | 0,1                         | 131702                                   | 2,51               |
| 2        | 6,91                        | 7595649                                  | 65,38              |
| 3        | 8,77                        | 2531344                                  | 21,78              |
| <b>4</b> | <b>9,66</b>                 | <b>1174902</b>                           | <b>10,11</b>       |
| <b>5</b> | <b>22,36</b>                | <b>183568</b>                            | <b>1,58</b>        |

Les données du spectre HPLC du 1<sup>er</sup> jour de fermentation (**tableau 24**) montrent 5 différents pics, le pic du glucose enregistré à 9,66 min avec une aire de **1174902**  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$  représentant un pourcentage de 10,11% de l'aire totale des pics, le pic de l'éthanol enregistré à 22,36 min avec une aire de **183568**  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$  représentant un pourcentage de 1,58% de l'aire totale des pics. Pour convertir ces aires en concentration, les mêmes courbes d'étalonnage du glucose et de l'éthanol que celles de la fermentation utilisant une enzyme commerciale ont été utilisées (**figure 34, 36**)

La conversion de l'aire du pic du glucose et de l'éthanol donnés dans le spectre donne une concentration de 1,17 g/L pour une aire de **1174902**  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$  pour le glucose et une concentration de 0,63 g/L pour une aire de 183568  $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$  pour l'éthanol. Le **tableau 25** ci-dessous donne le taux du glucose et de l'éthanol durant la saccharification et la fermentation utilisant un surnageant enzymatique.



**Tableau 25** : production (g/L) et taux (%) d'éthanol lors du procédé de saccharification et fermentation séparées de *ulva lactuca*

|                  | Temps (h) | Glucose libéré (g/L) | Ethanol produit (g/L) | Taux d'Ethanol (g eth/g glc) | Taux Ethanol (% /au theorique) |
|------------------|-----------|----------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Saccharification | 0         | 0                    | 0                     | 0                            | 0                              |
|                  | 24        | 1,01                 | 0                     | 0                            | 0                              |
|                  | 48        | 1,14                 | 0                     | 0                            | 0                              |
|                  | 72        | 1,18                 | 0                     | 0                            | 0                              |
|                  | 96        | 2,17                 | 0                     | 0                            | 0                              |
|                  | 120       | 4,42                 | 0                     | 0                            | 0                              |
|                  | 144       | 3,16                 | 0                     | 0                            | 0                              |
| Fermentation     | 168       | 1,17                 | 0,63                  | 0,14                         | 27,47 %                        |
|                  | 192       | 0                    | 1,18                  | 0,26                         | 50,98 %                        |

Le **tableau 25** montre que 2 g/L de glucose ont été consommés durant les 24 premières heures de fermentation. Les 1,17 g/L de glucose restant ont été consommés au cours du deuxième jour. La quantité d'éthanol produit a été estimée à 1,18 g/L en fin de fermentation. Le rendement en éthanol résultant était de 0,26 g éthanol par g de glucose ce qui est en dessous du rendement théorique maximum pouvant être obtenu estimé à 0,51g éthanol/g de glucose, (Chin & Hng, 2013) soit 50,98 % du rendement en éthanol théorique maximal.

Cette baisse de rendement en éthanol est expliquée par le taux de saccharification qui était relativement modeste en raison de l'utilisation d'un surnageant de culture fongique capable d'hydrolyser un seul type de liaison osidique, limitant le taux de glucose produit durant la saccharification. Ce rendement peut être amélioré par l'ajout d'autres surnageants d'autres souches de champignons dans le but d'hydrolyser des liaisons osidiques différentes de celles hydrolysées par *Trichoderma sp.*

#### 5.4.3. Productivité du bioéthanol de *ulva lactuca* par rapport à la biomasse initiale

La quantité de la macroalgue *ulva lactuca* initial nécessaire pour produire 1L de bioéthanol a été calculée et ce en se basant sur :

- La masse sèche initiale utilisée pour produire le bioéthanol (5g)
- Le volume de fermentation initial (100 mL)
- La concentration finale du bioéthanol (3,52 g/L pour un utilisant une enzyme commerciale et 1,18 g/L utilisant le surnageant enzymatique du champignon *trichoderma sp*).

Les résultats sont donnés dans le **tableau 26**:

**Tableau 26** : Volume d'éthanol produit par rapport à la biomasse sèche initiale

| Type d'enzyme utilisée                     | Masse algale initiale (g) | Volume Initial (mL) | Concentration finale en éthanol (g/L) | Masse d'éthanol Produite (g) | Volume D'éthanol Produit (mL) |
|--|---------------------------|---------------------|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <b>Enzyme commerciale</b>                  | 5                         | 100                 | 3,52                                  | 0,352                        | 0,446                         |
| <b>Surnageant de <i>Trichoderma sp</i></b> | 5                         | 100                 | 1,18                                  | 0,118                        | 0,149                         |

Comme le montre le **tableau26**, 5g d'algue sèche a permis la production de 0,352 g d'éthanol soit 0,446 mL d'éthanol (densité de l'alcool 789 kg/m<sup>3</sup>) utilisant une enzyme commerciale et 0,149 g d'éthanol soit 0,149mL utilisant le surnageant enzymatique, ce qui veut dire que pour produire 1L de bioéthanol utilisant l'enzyme commerciale il faut 11,21 kg d'algue sèche, tandis que pour produire 1L de bioéthanol utilisant le surnageant enzymatique il faut 42,37 Kg de biomasse sèche.

**Tableau 27** : biomasse sèche nécessaire pour la production d'un litre de bioéthanol selon le type de biomasse (utilisant une enzyme commerciale)(Aikawa et al., 2013)

| Type de biomasse<br>(sèche) | Biomasse sèche nécessaire<br>Pour produire 1L de bioéthanol (kg) |
|-----------------------------|--|
| Ulva lactuca (cette étude)  | 11,21  |
| sorgho                      | 12,5   |
| Canne à sucre               | 14,2   |
| manioc                      | 6,66   |
| maïs                        | 2,17   |
| Blé                         | 2,5  |

La quantité d'algue sèche nécessaire pour produire 1L de bioéthanol paraît comparable à certains types de biomasses comme le sorgho (**tableau 27**), elle est inférieure à la quantité nécessaire pour produire 1L de bioéthanol à partir de la canne à sucre. Mais elle reste très élevée par rapport à la quantité de blé ou de maïs nécessaire pour produire 1L de bioéthanol et qui sont des matières beaucoup plus riches en sucre que *ulva lactuca* mais présentent tout de même l'inconvénient d'utiliser des terres agricoles, de l'eau, et des engrais qui favorisent la production des polysaccharides.

## CONCLUSION GENERALE

Le présent travail avait pour objectif l'étude la production du bioéthanol à partir de *Ulva lactuca*, une macroalgue locale à fort potentiel énergétique.

Pour arriver au produit final, différents procédés ont été testés et plusieurs étapes ont été franchies, avec notamment l'étude de la composition de l'algue en polysaccharides de structure et en protéines, réalisée au **CIEMAT** (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas de Madrid). Ainsi que l'étude des activités enzymatiques de différentes enzymes commerciales, l'isolement de champignons producteurs de cellulases pour remplacer les enzymes commerciales dont le coût reste très élevé, et la production du bioéthanol algal en utilisant une enzyme commerciale puis un surnageant fongique.

La caractérisation de la macroalgue marine *ulva lactuca*, récoltée sur les côtes de Bouharoun a montré un énorme potentiel pouvant être exploitée pour la production de bioéthanol. En effet, le pourcentage en sucres totaux est intéressant (16,47 %) et la fraction de lignine est négligeable (5,11%) par rapport à celle plantes terrestres rendant ainsi l'hydrolyse enzymatique de la cellulose algale plus aisée.

L'étude des activités enzymatiques des enzymes commerciales a donné de bons résultats avec des activités enzymatiques élevées pour la Celluclast, la Novozym et la  $\beta$  glucosidase. Leur seul inconvénient reste leur coût élevé, à cet effet, pas moins d'une quinzaine de souches de champignons ont été isolées à partir de la rhizosphère, après étude du taux de croissance sur milieu cellulosique et du pouvoir cellulolytique. Une souche identifiée comme appartenant au genre *Trichoderma* et ayant montré les meilleures performances a ensuite été sélectionnée pour mener à bien les expériences de saccharification des extraits d'algue.

La production du bioéthanol à partir de la macroalgue marine *ulva lactuca*, a été réalisée en mode SHF et ce, en utilisant la Celluclast ou le surnageant fongique. Le principal avantage de l'hydrolyse et de la fermentation séparée (SHF) réside dans le fait que l'hydrolyse et la fermentation peuvent être effectuées chacune dans leurs conditions optimales.

La saccharification utilisant la Celluclast a montré un excellent rendement en glucose de 7,21 g/L, correspondant à une efficacité enzymatique de 85,01 %.

En utilisant du surnageant fongique de *Trichoderma*, le taux de glucose libéré n'était que de 4,42 g/L avec un taux de saccharification de 52,12 %, ce qui indique une efficacité enzymatique moyenne de ce surnageant. Cette saccharification était donc moins efficace, plus longue mais néanmoins beaucoup moins coûteuse que celle utilisant la Celluclast.

Le rendement en bioéthanol est également plus faible puisque ce rendement est lié à la quantité de sucre libérée durant la saccharification. Ainsi, 3,52 g/L d'éthanol ont été produits après hydrolyse enzymatique par la Celluclast soit 0,41 g d'éthanol/g de sucres, contre 1,18 g/L, soit 0,26 g éthanol par g de sucres.

Le rendement en éthanol de la présente étude apparaît donc particulièrement prometteur si on le compare aux rendements rapportés dans la littérature. D'autant plus que la matière première utilisée est peu coûteuse, disponible et à fort potentiel énergétique. De plus, il est possible de remplacer les enzymes commerciales par des surnageants de culture fongique locale même si beaucoup d'obstacles restent encore à relever comme :

- L'amélioration des rendements des souches fongique isolées ;
- La production de cocktails enzymatiques à partir de cultures de fongiques locales, où chaque enzyme hydrolyse une liaison osidique spécifique pour améliorer l'efficacité enzymatique globale et augmenter le taux de saccharification ;
- L'utilisation de levures de fermentation plus performantes ou encore des souches capables de fermenter les sucres C5 comme le xylose qui se trouve en grande quantité dans les algues et qui n'est pas assimilé par les levures de fermentation standard.
- Il est également possible de réaliser des fermentations en mode simultané SSF pour écourter la durée du procédé et réduire les coûts énergétiques surtout durant les étapes énergivores comme la saccharification et la fermentation qui se font à des températures de 30° à 40° C.
- La rentabilité peut être améliorée si l'on exploite les coproduits de la production du bioéthanol algal comme les déchets de fermentation qui peuvent servir à la production de biogaz, ou la fraction protéique des algues multi-usage et à forte valeur ajoutée.
- Culture des algues à grande échelle, avec consommation de dioxyde de carbone.

Selon plusieurs projections économiques, les algues sont compétitives avec d'autres ressources végétales terrestres pour la production du bioéthanol, cependant, les défis cités plus haut doivent être relevés pour rendre la production de bioéthanol à partir d'algues viable du double point de vue économique et environnemental.

## Références bibliographiques

- Abdel-Fattah, A.F. and Sary, H.H. 1987. Selective isolation of glycoprotein materials from the green seaweed *Ulva lactuca* in Pakistan. *Journal of Biochemistry* 20, 61±65
- Aikawa, S., Joseph, A., Yamada, R., Izumi, Y., Yamagishi, T., Matsuda, F., Kawai, H., Chang, J., Hasunuma, T., Kondo, A. 2013. Direct conversion of *Spirulina* to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis process. *Energy & Environmental Science*, 6(1844). DOI: 10.1039/c3ee40305j
- Allouache, A., Aziza, M. 2012. Bilan Environnemental et Énergétique du Bioéthanol Lignocellulosique. in: *The 2nd International Seminar on New and Renewable Energies*. Ghardaia. Algeria
- Allouache, A., Majda, A., Toudert, A.Z., Amrane, A., Ballesteros, M. 2021. Cellulosic Bioethanol Production from *Ulva Lactuca* Macroalgae. *Cellulose Chemistry and Technology*, 55(5-6), 629-635. DOI : 10.35812/CelluloseChemTechnol.2021.55.51
- Ambaye, T.G., Vaccari, M., Bonilla-Petriciolet, A., Prasad, S., van Hullebusch, E.D., Rtimi, S. 2021. Emerging technologies for biofuel production: A critical review on recent progress, challenges and perspectives. *J Environ Manage*, 290, 112627. 10.1016/j.jenvman.2021.112627
- Amouri, M., Mohellebi, F., Zaïd, T.A., Aziza, M. 2016. Sustainability assessment of *Ricinus communis* biodiesel using LCA Approach. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 19(3), 749-760. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1262-4>
- Baghel, R.S., Mantri, V.A., Reddy, C.R.K. 2017. A New Wave of Research Interest in Marine Macroalgae for Chemicals and Fuels: Challenges and Potentials. 43-63. <https://doi.org/10.1002/9781119117193.ch3>
- Baghel, R.S., Reddy, C.R.K., Singh, R.P. 2021. Seaweed-based cellulose: Applications, and future perspectives. *Carbohydr Polym*, 267, 118241. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118241>
- Bajpai, P a. 2013. Production of bioethanol. In: *Advances in Bioethanol*. P. 33-35. Patiala. India. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. ISBN 978-81-322-1584-4 (eBook). DOI 10.1007/978-81-322-1584-4
- Bajpai, P b. 2013. Production of bioethanol. In: *Advances in Bioethanol*. P. 27-29. Patiala. India. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. ISBN 978-81-322-1584-4 (eBook). DOI 10.1007/978-81-322-1584-4
- Balat, M., Balat, H., Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551-573. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2007.11.001>
- Baldan, B., Andolfo, P., Navazio, L., Tolomio, C., Mariani, P. 2001. Cellulose in algal cell wall : an “in situ” localization. *Eur. J. Histochem*, 45(51). <https://doi.org/10.4081/1613>
- Barr, M.R., Volpe, R., Kandiyoti, R. 2021. Liquid biofuels from food crops in transportation – A balance sheet of outcomes. *Chemical Engineering Science: X*, 10, 100090. <https://doi.org/10.1016/j.cesx.2021.100090>
- Berghem, L.E., Pettersson, L.G. 1974. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Isolation and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma viride*. *Eur J Biochem*, 46(2), 295-305. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03621.x
- Ben chaabane, M.F. 2006. Intensification de la production d'éthanol biocarburant dans le bioreacteur bi-étagé avec recyclage cellulaire : modelisation et stratégie de conduite. These de doctorat. INSA toulouse.
- Bobin-Dubigeon, C., Lahaye, M., Barry, J.-L. 1997. Human Colonic Bacterial Degradability of Dietary Fibres from Sea-Lettuce (*Ulva* sp). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(2), 149-159. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199702\)73:2<149::AID-JSFA685>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199702)73:2<149::AID-JSFA685>3.0.CO;2-L).

- Boudouresque, M. P., Seridi, H. 1989. Inventaire des algues marines benthiques d'Algérie. GIS Posidonie publ., Marseille ; Fr., 1-117. ISBN : 2-905540-14-1.1989
- Bravo, V., Páez, M.P., El-Hadj, M.A., Reyes, A., García, A.I. 2002. Hydrolysis of carboxymethylcellulose with mixtures of cellulase and  $\beta$ -1,4-glucosidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 77(1), 15-20. <https://doi.org/10.1002/jctb.520>
- Candra, C.P. 2011. Study on bioethanol production using red seaweed *Eucheuma cottonii* from Bontang sea water. *Journal of Coastal Development* 15(1):45-50. DOI:10.4172/1410-5217.10000328
- Cardona, C.A., Sanchez, O.J. 2007. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresour Technol*, 98(12), 2415-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.002>
- Carrquiry, M.A., Du, X., Timilsina, G.R. 2011. Second generation biofuels: Economics and policies. *Energy Policy*, 39(7), 4222-4234. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.04.036>
- Castro-González, M.I., Pérez-Gil, F., Pérez-Estrella, S., Carrillo-Domínguez, S. 1996. Chemical composition of the green alga *Ulva lactuca*. *Ciencias Marinas*, 22(2), 205-213. <https://doi.org/10.7773/cm.v22i2.853>
- CEREFÉ. 2020. Transition énergétique en algérie : leçons, état des lieux et perspectives pour un développement accéléré des énergies renouvelables et à l'efficacité énergétique. Eissn/issn 2716-8654. P83
- CEREFÉ. 2020. Transition énergétique en algérie : leçons, état des lieux et perspectives pour un développement accéléré des énergies renouvelables et à l'efficacité énergétique. Eissn/issn 2716-8654. P85
- Chand, P., Aruna, A., Maqsood, A.M., Rao, L.V. 2005. Novel mutation method for increased cellulase production. *J Appl Microbiol*, 98(2), 318-23. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02453.x
- Chin, K.L., Hng, P.S. 2013. A Real Story of Bioethanol from Biomass: Malaysia Perspective. <http://dx.doi.org/10.5772/51198>
- Chin, K.L., Hng, P.S. 2013. A Real Story of Bioethanol from Biomass: Malaysia Perspective. Doi: 10.5772/51198
- Chynoweth, P. 2002. Review Of Biomethane From Marine Biomass.
- Cho, H., Ra, C.H., Kim, S.K. 2014. Ethanol production from the seaweed *Gelidium amansii*, using specific sugar acclimated yeasts. *J Microbiol Biotechnol*, 24(2), 264-9. DOI:10.4014/jmb.1307.07054
- Cho, Y., Kim, H., Kim, S.K. 2013. Bioethanol production from brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. *Bioprocess Biosyst Eng*, 36(6), 713-9. DOI:10.1007/s00449-013-0895-5
- Chum, H.L., Overend, R.P. 2001. Biomass and renewable fuels. *Fuel Processing Technology*, 71(1-3), 187-195. [https://doi.org/10.1016/S0378-3820\(01\)00146-1](https://doi.org/10.1016/S0378-3820(01)00146-1)
- Cockroft, J., Kelly, N. 2006. A comparative assessment of future heat and power sources for the UK domestic sector. *Energy Conversion and Management*, 47(15-16), 2349-2360. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2005.11.021>
- Daroch, M., Geng, S., Wang, G. 2013. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy*, 102, 1371-1381. DOI:10.1016/j.apenergy.2012.07.031
- Demirbas, A. 2007. Progress and recent trends in biofuels. *Progress in energy and combustion science*, 33(1), 1-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2006.06.001>
- Demuez, M. 2014. Standard procedure for fungal enzymatic production.
- Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A., Teixeira, J. 2010. Third generation biofuels from microalgae. In : Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. P.1355 - 1366). A. Méndez-Vilas Editors

- EERE. 2020. Biofuels & Greenhouse Gas Emissions: Myths versus Facts, <http://www.eere.energy.gov>. consulté le 13/02/2022.
- El Hattab-Bouzidi, D. 2003. Détermination des stérols de l'algue rouge *Asparogopsis armata* par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier en employant l'extraction en phase solide : Etude comparative avec la chromatographie liquide à haute performance. Mémoire de magistère. Département de chimie industrielle, Univ Saad Dehleb blida. P. 87.
- FAPESP. 2007. Brazil world leader in sugarcane and ethanol knowledge and technology. São Paulo Research Foundation.
- Faurie, B. 2019. Cellule de Malassez Technical Report. DOI: 10.13140/RG.2.2.25854.23368
- Fleurence, J. 1999. Seaweed proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 10(1), 25-28. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00015-1)
- G. del Río, P., Gullón, P., Rebelo, F.R., Romani, A., Garrote, G., Gullón, B. 2020. A Whole-Slurry Fermentation Approach to High-Solid Loading for Bioethanol Production from Corn Stover. *Agronomy*, 10(11), 1790. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111790>
- Gayral, P. 1975. Les algues : morphologie, cytologie, reproduction, écologie. P. 166. Doin éditeurs.
- GODIN, B. 2013. Composition chimique et valorisation énergétique des biomasses végétales. These de doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique. P. 259. Université catholique de Louvain.
- Haji Esmaeili, S.A., Sobhani, A., Szmerekovsky, J., Dybing, A., Pourhashem, G. 2020. First-generation vs. second-generation: A market incentives analysis for bioethanol supply chains with carbon policies. *Applied Energy*, 277, 115606. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.115606>
- Hamelinck, C., Faaij, A., Denuil, H., Boerrigter, H. 2004. Production of FT transportation fuels from biomass; technical options, process analysis and optimisation, and development potential. *Energy*, 29(11), 1743-1771. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2004.01.002>
- Hamrouni, R. 2019. Criblage, identification, physiologie de croissance et métabolisme de *Trichoderma asperellum* cultivé sur des substrats solides. Thèse de doctorat . Écoles Doctorales : Sciences chimiques (Université de Marseille, France)
- Hames, B., Scarlata, C., Sluiter, A. 2008. Determination of Protein Content in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL Technical Report.
- Hansen, A.C., Dimitrios, C., Kyritsis, C., Chia, F. 2010. Characteristics of Biofuels and Renewable Fuel Standards In : Vertes, A., Qureshi, N., Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries. P. 30-32. ALAIN A. VERTES edition. Wiley pulication. ISBN:9780470750025 |DOI:10.1002/9780470750025
- Harun, R., Danquah, M.K., Forde, G.M. 2009. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jctb.2287>
- Hocini, A., Meziani, W. 2013. Isolement et caractérisation de champignons cellulolytiques des sols de Béjaïa. Mémoire de master. Université Abderrahmane Mira.
- Horn, S.J., Aasen, I.M., stgaard, K. 2000. Ethanol production from seaweed extract. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(5), 249-254. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000065>
- IEA, 2020. Tracking transport. <https://www.iea.org/reports/tracking-transport-2020> consulté le 12/09/2021
- IEA, 2021. Annual change in CO2 emissions by sector. IEA, Paris <https://www.iea.org/data-and-statistics/charts/annual-change-in-co2-emissions-by-sector-2021>.
- IEA, 2022. , Transport, IEA, Paris <https://www.iea.org/reports/transport>.



- Irfan, M., Nadeem, M., Syed, Q. 2014. Ethanol production from agricultural wastes using *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Microbiol*, 45(2), 457-65. 10.1590/s1517-83822014000200012
- Ismail, M.M., Mohamed, E.S. 2017. Differentiation between some *Ulva* spp. by morphological, genetic and biochemical analyses. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 21(3), 360-367. DOI 10.18699/VJ17.253
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. 2011. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour Technol*, 102(1), 186-93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>
- Khan, S., Naushad, M., Iqbal, J., Bathula, C., Al-Muhtaseb, A.a.H. 2022. Challenges and perspectives on innovative technologies for biofuel production and sustainable environmental management. *Fuel*, 325, 124845. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124845>
- Khelil, O. 2017. Production de cellulase et d'enzymes associées par des souches de *Bacillus* sp. : le rôle des prétraitements et l'effet des polyphénols, des flavonoïdes et des biosurfactants. In: sciences de la nature et de la vie vol. Phd, usto-mb pp. 224.
- Kucharska, K., Rybarczyk, P., Holowacz, I., Lukajtis, R., Glinka, M., Kaminski, M. 2018. Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules*, 23(11). doi: 10.3390/molecules23112937
- Kumar, S., Gupta, R., Kumar, G., Sahoo, D., Kuhad, R.C. 2013. Bioethanol production from *Gracilaria verrucosa*, a red alga, in a biorefinery approach. *Bioresour Technol*, 135, 150-6. DOI:10.1016/j.biortech.2012.10.120
- Li-Beisson, Y., Peltier, G. 2013. Third-generation biofuels: current and future research on microalgal lipid biotechnology. *Ocl*, 20(6), D606. DOI:10.1051/ocl/2013031
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(3), 506-77, table of contents. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment.
- Mutezo, G., Mulopo, J. 2021. A review of Africa's transition from fossil fuels to renewable energy using circular economy principles. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137, 110609. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110609>
- Naili, A.E., Messaoudi, L. 2017. Valorisation énergétique de la biomasse en Algérie et prospective à l'horizon 2050, mémoire de master. université Kasdi Merbah Ouargla.
- Onsoy, T., Thanonkeo, P., Thanonkeo, S., Yamada, M. 2007. Ethanol production from Jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. *KMITL Sci. Tech*, 7,1.
- Reis, C.E.R., Libardi Junior, N., Bento, H.B.S., Carvalho, A.K.F.d., Vandenberghe, L.P.d.S., Soccol, C.R., Aminabhavi, T.M., Chandel, A.K. 2023. Process strategies to reduce cellulase enzyme loading. DOI: 10.1016/j.cej.2022.138690
- Saleem, M., Aslam, F., Akhtar, M.S., Tariq, M., Rajoka, M.I. 2012. Characterization of a thermostable and alkaline xylanase from *Bacillus* sp. and its bleaching impact on wheat straw pulp. *World J Microbiol Biotechnol*, 28(2), 513-22. DOI: 10.1007/s11274-011-0842-z
- Scragg a, a. 2009. The Benefits and Deficiencies of Biofuels. In : Biofuels, production, application and development. P. 167-167. Cambridge. USA. ISBN-13: 978 1 84593 592 4.
- Scragg b, a. 2009. Liquid Biofuels to Replace Petrol. In : Biofuels, production, application and development. P. 105-113. Cambridge. USA. ISBN-13: 978 1 84593 592 4.

- Scragg c, a. 2009. Liquid Biofuels to Replace Petrol. In : Biofuels, production, application and development. P. 120-126. Cambridge. USA. ISBN-13: 978 1 84593 592 4.
- Scragg d, a. 2009. Liquid Biofuels to Replace Petrol. In : Biofuels, production, application and development. P. 155-157. Cambridge. USA. ISBN-13: 978 1 84593 592 4.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussnug,J., Posten,C., Kruse, O., Hankamer, B. 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*,1 ,20–43.
- Seridi, H. 2007. Étude de la flore algale de l'Algérie, Étude phytosociologique des peuplements algaux photophiles de l'infralittoral superficiel de substrat dur. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Alger, 174 p.
- Sekhar , Y.S., Ahammed, K., Prasad, V., Sarada, R., Devi, J. 2017. IDENTIFICATION OF TRICHODERMA SPECIES BASED ON MORPHOLOGICAL CHARACTERS ISOLATED FROM RHIZOSPHERE OF GROUNDNUT (ARACHIS HYPOGAEA L. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 6, 3, 2056 – 2063. ISSN 2278-3687
- Singh, A., Nigam, P.S., Murphy, J.D. 2011. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, 102(1), 10-16. DOI:10.1016/j.biortech.2010.06.032
- Singhania, R.R. 2009. Cellulolytic Enzymes. 371-381. DOI:10.1007/978-1-4020-9942-7\_20
- Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. 2011. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL Technical Report.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2005. Determination of Extractives in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL Technical Report.
- Smith, D.G., Young, E.G. 1955. The Combined Amino Acids in Several Species of Marine Algae. *Journal of Biological Chemistry*, 217(2), 845-853. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65949-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65949-6)
- Sorensen, B. 2004. Renewable Energy; Its physics, engineering, use, environmental impacts, economy and planning aspects. third edition ed. Elsevier Science. P. 44-45. Roskilde, Denmark .ISBN 0-12-656150-8
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- TAPPI . 2002. Acid-insoluble lignin in wood and pulp, TAPPI Test Methods, Tappi Press, Atlanta, GA, USA.
- Tebbal, B.A. 2011. Composition chimique et minerale de quatres algues benthiques de la region de Kouali (tipaza). thèse de magister , ENSSMAL.
- Trivedi, N., Reddy, C.R.K., Radulovich, R., Jha, B. 2015. Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed *Ulva* for bioethanol production. *Algal Research*, 9, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.025>
- Trivedi, N., Gupta, V., Reddy, C.R., Jha, B. 2013. Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga *Ulva fasciata* Delile. *Bioresour Technol*, 150, 106-12. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.09.103
- USDA. 2021. Us bioenergy statistics. <https://www.ers.usda.gov/data-products/us-bioenergy-statistics/>. Dernière visite 08/09/2021.
- Valera, MJ., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F. 2020. Comparison of the Glycolytic and Alcoholic Fermentation Pathways of *Hanseniaspora vineae* with *Saccharomyces*

- cerevisiae Wine Yeasts. Fermentation 6(3), 78.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation6030078>
- Van der Wal, H., Sperber, B.L., Houweling-Tan, B., Bakker, R.R., Brandenburg, W., Lopez-Contreras, A.M. 2013. Production of acetone, butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed *Ulva lactuca*. *Bioresour Technol*, 128, 431-7. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.094
- Vatankhah Barenji, R., Hashemipour, M., Guerra-Zubiaga, D.A. 2014. A framework for modelling enterprise competencies: from theory to practice in enterprise architecture. *International Journal of Computer Integrated Manufacturing*, 28(8), 791-810. DOI:10.1080/0951192X.2014.901563
- Walker, G.Ma. 2010. Bioethanol: science and technology of fuel alcohol. P. 9-11. Ventus publishing aps. Scotland. 2010 ISBN 978-87-7681-681-0.
- Walker, G.Mb. 2010. Global production of bioethanol. In : bioethanol: science and technology of fuel alcohol. P. 20-22. Ventus publishing aps. Scotland. 2010 ISBN 978-87-7681-681-0.
- Wang, M., Wu, M., Huo, H. 2007. Life-cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types. *Environmental Research Letters*, 2 (02). DOI 10.1088/1748-9326/2/2/024001
- Watanabe, H., Tokuda, G. 2001. Animal cellulases. *Cell Mol Life Sci*, 58(9), 1167-78. DOI: 10.1007/PL00000931
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G. 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol Prog*, 19(4), 1109-17. <https://doi.org/10.1021/bp0340180>
- Wyman, C., Bin, Y. 2009. Cellulosic biomass could help meet California's transportation fuel needs. *california agriculture* 63(4). <https://escholarship.org/uc/item/3rk3p6n3>
- Xiao, Z., Storms, R., Tsang, A. 2004. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnol Bioeng*, 88(7), 832-7. <https://doi.org/10.1002/bit.20286>
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., Attia, H. 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry*, 128(4), 895-901. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.03.114
- Yang, B., Wyman, C.E. 2009. Cellulosic biomass could help meet California's transportation fuel needs. *California Agriculture*, 63(4), 185-190. <https://doi.org/10.3733/ca.v063n04p185>
- Yang, Y., Chai, Z., Wang, Q., Chen, W., He, Z., Jiang, S. 2015. Cultivation of seaweed *Gracilaria* in Chinese coastal waters and its contribution to environmental improvements. *Algal Research*, 9, 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.017>

## Liste des travaux réalisés

### Publications

- Allouache, A., Aziza, M.A. 2012. Bilan Environnemental Et Energétique Du Bioéthanol Lignocellulosique ». *Revue Des Energies Renouvelables Sienn'12 Ghardaïa* 11 – 17
- Allouache, A., Aziza, M.A., Ahmed Zaid, T. 2013. Analyse De Cycle De Vie Du Bioéthanol. *Revue Des Energies Renouvelables*, 16, 2, 357 – 364
- Allouache, A., Aziza, M. A., Ahmed Zaid, T. 2019. Cellulose Degradation Methods For Biofuel Production. *Springer Proceeding In Energy, Icreec*, 187–193. DOI: 10.1007/978-981-15-5444-5\_23
- Allouache, A., Aziza, M., Ahmed Zaid, T., Amrane, A., Ballesteros, M. 2021. Cellulosic Bioethanol Production From *Ulva Lactuca* Macroalgae. *Cellulose Chem. Technol.*, 55 5,6, 629-63. DOI: 10.35812/Cellulosechemtechnol.2021.55.51

### Communications

- Allouache, A., Zemmouri, H., Kechkar, M. 2012. Contribution Du Bioéthanol De 2ème Génération A L'amélioration Du Bilan Environnemental Des Biocarburants », *Journée Mondiale De L'environnement JME: Dégradation De L'environnement. CNDE – Skikda* 5 Et 6 Juin.
- Allouache, A., Aziza, MA. 2012. Bilan Environnemental Et Energétique Du Bioéthanol Lignocellulosique. 2ème Séminaire International Sur Les Énergies Nouvelles Et Renouvelables. *Unité De Recherche Appliquée En Énergies Renouvelables, Ghardaïa – Algérie* 15-17 Octobre 2012.
- Allouache, A., Aziza, M. A., Ahmed Zaid, T. 2013. The Lignocellulosic Bioethanol: A Biotechnology Applied For A Sustainable And Renewable Biofuel Production. 4ème Workshop International Sur La Biotechnologie Industrielle (IWIB) . 10-11 April 2013, Tlemcen, Algérie.
- Allouache, A., Bouzid, O., Ahmed Zaïd., T., Aziza M A. 2014. Algerian Potential Resources For Bioethanol Production. *Deuxième Workshop International Jatromed : Bio-Energy For Enhancing Sustainable Development In Mediterranean Countries - INRAA, Alger*, 08 Mai 2014.
- Allouache, A., Aziza, M.A., Ahmed Zaïd, T. 2015. Carbone Footprint Of A Carob Based Ethanol. *International Symposium On Green Chemistry. - ISGC. La Rochelle* 3-7 May 2015.
- Allouache, A., Aziza, M A, Ahmed Zaid, T. 2019. Cellulose Degradation Methods For Biofuel Production. *International Conference On Renewable Energy And Energy Cionversion. Oran*. 11-13 Novembre 2019.

### **Communications En Co-Auteurs:**

- Nacer, F., Allouache, A., Benaouda, N. 2010. Effet Du Séchage Solaire Indirect Sur Le Rendement En Huile Essentielle D'une Plante Aromatique Et Médicinale Mentha Viridis ». 3ème Séminaire Maghrébin Sur Le Séchage. Marrakech. 2010.
- Aziza, M., Allouache, A., Ahmed Zaid, T. 2014. Life Cycle Assessment Applied To Algal Biofuels. 4th International Conference On Industrial Biotechnology, 8-11 June 2014 - Rome, Italy.
- Kechkar, M., Allouache, A. 2012. Valorisation Energétique Des Déchets. Journée Mondiale De L'environnement JME : Dégradation De L'environnement. CNDE – Skikda 5-6 Juin 2012.

## ANNEXES

### **Annexe 1:** Les réactifs utilisés

- Sulfate de potassium ( $K_2SO_4$ )
- Sulfate de cuivre ( $CuSO_4$ )
- Acide sulfurique ( $H_2SO_4$ )
- Chlorure d'hydrogene (HCL)
- Carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ )
- Sulfate d'amonium ( $NH_4SO_4$ )
- Sulfate de fer ( $FeSO_4$ )
- Hydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ )
- Chlorure de potassium (KCl)
- Sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ )
- Hydroxyde de sodium (NaOH),
- Phénol en cristaux
- Eau distillée
- Hypochlorite de Sodium (eau de javel, NaClO)
- Acide 3,5-Dinitrosalicylique ( DNS)
- Rouge congo
- Des sucres comme : le glucose, le Dextrose, le Glucose grade HPLC, le xylose, la cellulose microcristalline, carboxymethylcellulose, p-nitrophenyl- $\beta$ -D glucopyranoside, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside.
- Des produits de microbiologie comme : l'agar agar, le Tween 80, l'extrait de levure, l'extrait de malt, la peptone.

### **Annexe2 :** appareils utilisés

- Petit matériel et filtres seringues (0.45 $\mu$  et 0.20  $\mu$ ).
- Plaque d'agitation Magnétique chauffante de la marque IKA modèle WERKE RT5.
- Broyeur de marque SEB, modèle PREP'line 850.
- Analyseur Kjeldahl (Unité de digestion, unité de distillation), de marque FOSS, modèle TECATOR TM digestor, et TECATOR TM scrubber.
- Analyseur d'humidité de la marque PRECISA XM 120. 0.100 mm.

- pH - mètre de marque OHAUS, modèle Starter 3100.
- Balances analytiques de marques KERN ALS 220-4 (CDER), PRECISA XB 220A (CIEMAT).
- Balance de précision de marque KERN 572.
- Microscopes photoniques de marques ZEISS Axiostar (CDER), NICON Eclipse E600 (CIEMAT).
- Autoclave de marque WISCLAVE.
- Centrifugeuses de marque SIGMA 1-10 (CDER), EPPENDORF 5415 D (CIEMAT).
- HPLC de la marque JASCO Extrema RI 4030.
- Spectrophotomètre UV-Visible de marque PERKIN ELMER modèle lambda 25.
- Spectrophotomètre a microplaque de marque ZENYTH anthos 200 rt.
- Evaporateur rotatif de marque BUCHI Waterbath B480.
- Cellule de Thomas de marque BLAU BRAND, 0.0025 mm<sup>2</sup>.

**Annexe 3:** Points de la courbe d'étalonnage du glucose pour le calcul de l'activité de la Celluclast

| <b>Points de la courbe d'étalonnage</b> | <b>1</b> | <b>2</b>    | <b>3</b>    | <b>4</b>    | <b>5</b>    | <b>6</b>   |
|---|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>Concentration (mg/mL)</b>            | <b>0</b> | <b>0,5</b>  | <b>1</b>    | <b>2</b>    | <b>4</b>    | <b>5</b>   |
| <b>Quantité de glucose (mg)</b>         | <b>0</b> | <b>0,01</b> | <b>0,02</b> | <b>0,04</b> | <b>0,08</b> | <b>0,1</b> |
| <b>Absorbance</b>                       | 0        | 0.022       | 0.152       | 0.315       | 0.629       | 0.787      |

**Annexe 4 :** Points de la courbe d'étalonnage du Pnp pour le calcul de l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et de la  $\beta$ -xylosidase

|                   |   |        |       |       |        |       |       |
|-------------------|---|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
| Pnp (mg/ml)       | 0 | 0,005  | 0,01  | 0,02  | 0,025  | 0,05  | 0,1   |
| Pnp (mg)          | 0 | 0,0005 | 0,001 | 0,002 | 0,0025 | 0,005 | 0,01  |
| Pnp ( $\mu$ mole) | 0 | 0,004  | 0,007 | 0,014 | 0,018  | 0,036 | 0,072 |
| Absorbance        | 0 | 0,056  | 0,107 | 0,141 | 0,322  | 0,605 | 1,201 |

**Annexe 5:** Taux de croissances des souches fongiques 1 à 12 durant 8 jours (diamètre des cultures centrales (mm))

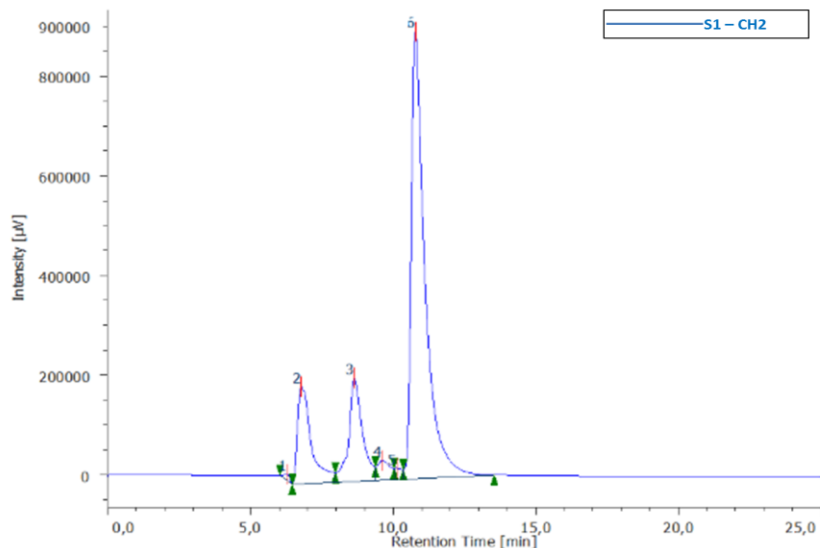
|            | <b>j</b> | <b>j + 1</b> | <b>j +2</b> | <b>j +3</b> | <b>j+4</b> | <b>j+5</b> | <b>j+6</b> | <b>j+8</b> |
|------------|----------|--------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>C1</b>  | 0        | 0            | 0           | 3           | 3,5        | 4          | 4          | 4,5        |
| <b>C2</b>  | 0        | 0            | 0           | 2           | 4          | 5          | 7          | 8          |
| <b>C3</b>  | 0        | 20           | 20          | <b>50</b>   | <b>50</b>  | <b>50</b>  | <b>50</b>  | <b>50</b>  |
| <b>C4</b>  | 0        | 4            | 6,5         | 13          | 16,5       | 40         | 40         | 40         |
| <b>C5</b>  | 0        | 20           | <b>50</b>   | <b>50</b>   | <b>50</b>  | <b>50</b>  | <b>50</b>  | <b>50</b>  |
| <b>C6</b>  | 0        | 15           | 41          | <b>50</b>   | <b>50</b>  | <b>50</b>  | <b>50</b>  | <b>50</b>  |
| <b>C7</b>  | 0        | 0            | 0           | 3           | 3,5        | 7,5        | 7,5        | 12         |
| <b>C8</b>  | 0        | 0            | 0           | 0           | 0          | 0          | 0          | 0          |
| <b>C9</b>  | 0        | 3            | 13,5        | 27,5        | 30         | <b>50</b>  | <b>50</b>  | <b>50</b>  |
| <b>C10</b> | 0        | 0            | 5           | 20          | 28         | <b>50</b>  | <b>50</b>  | <b>50</b>  |
| <b>C11</b> | 0        | 5            | 15          | 30          | <b>50</b>  | <b>50</b>  | <b>50</b>  | <b>50</b>  |
| <b>C12</b> | 0        | 0            | 0           | 0           | 0          | 4          | 4          | 7          |

**Annexe 6:** Concentration de la courbe étalon du glucose par HPLC

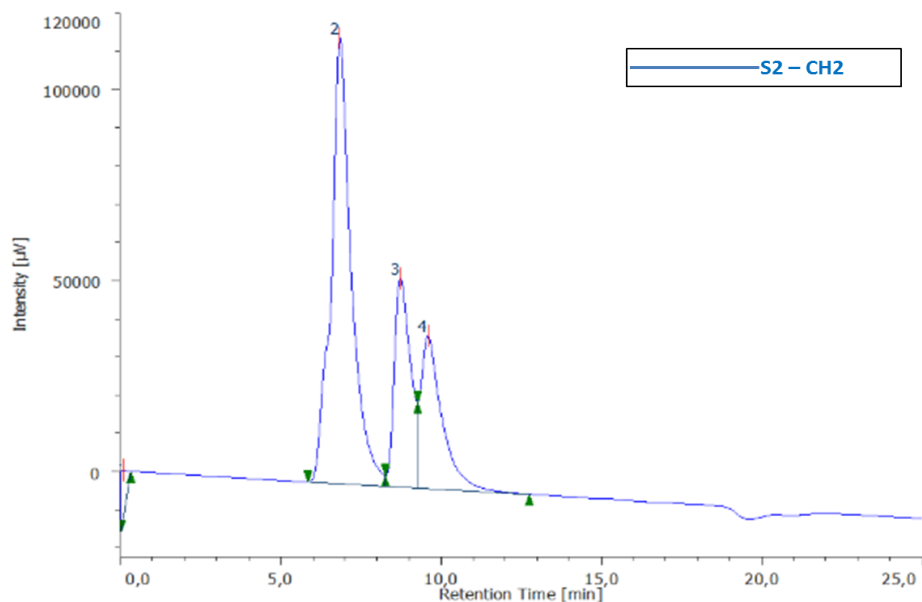
| <b>Concentration (g/L)</b> | <b>aire du pic (<math>\mu</math>V.sec)</b> |
|----------------------------|--|
| 0,5                        | 568207                                     |
| 1,50                       | 1485879                                    |
| 2                          | 2078330                                    |
| 2,5                        | 2543567                                    |
| 4                          | 4199559                                    |
| 6                          | 6263822                                    |
| 8                          | 8056831                                    |
| 10                         | 10088691                                   |



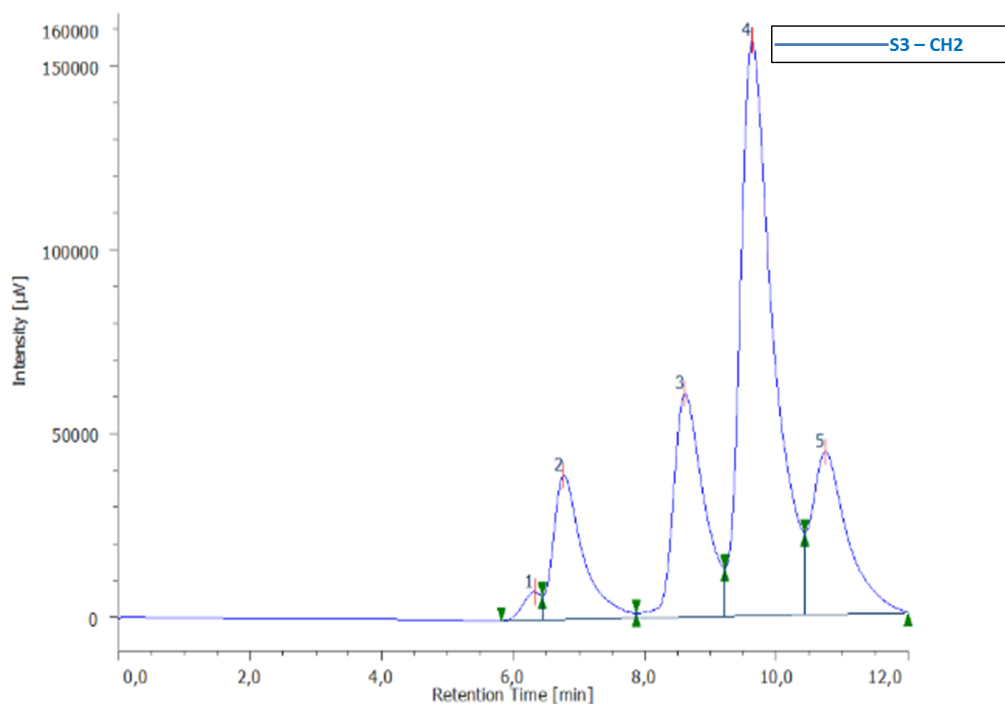
**Annexe 7:** Spectre HPLC de la concentration du glucose enregistré après 24h de saccharification utilisant une enzyme commerciale



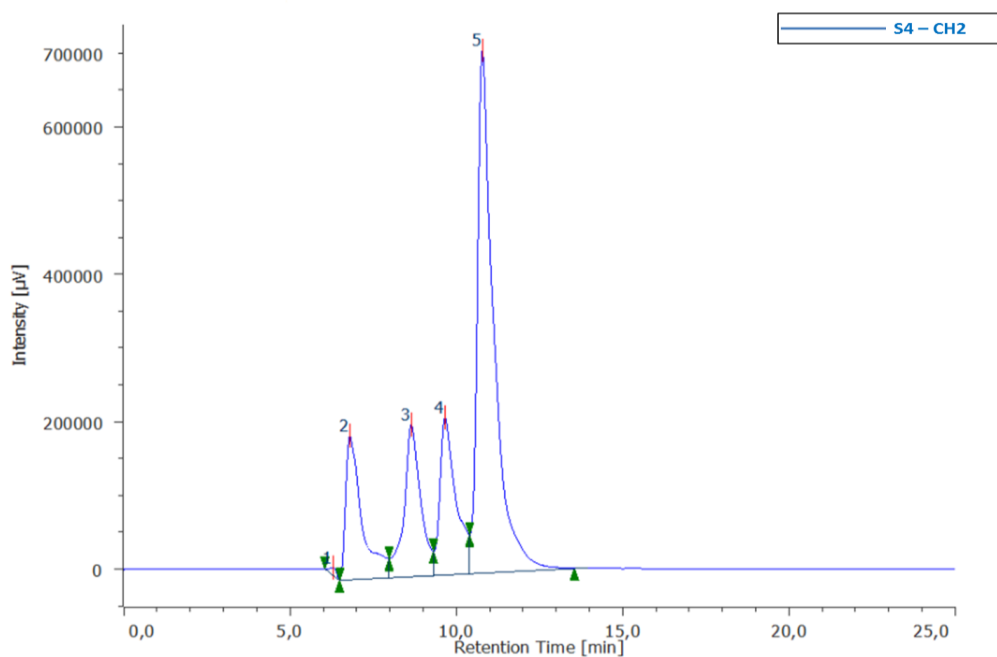
**Annexe 8:** Spectre HPLC de la concentration du glucose enregistré après 48h de saccharification utilisant une enzyme commerciale



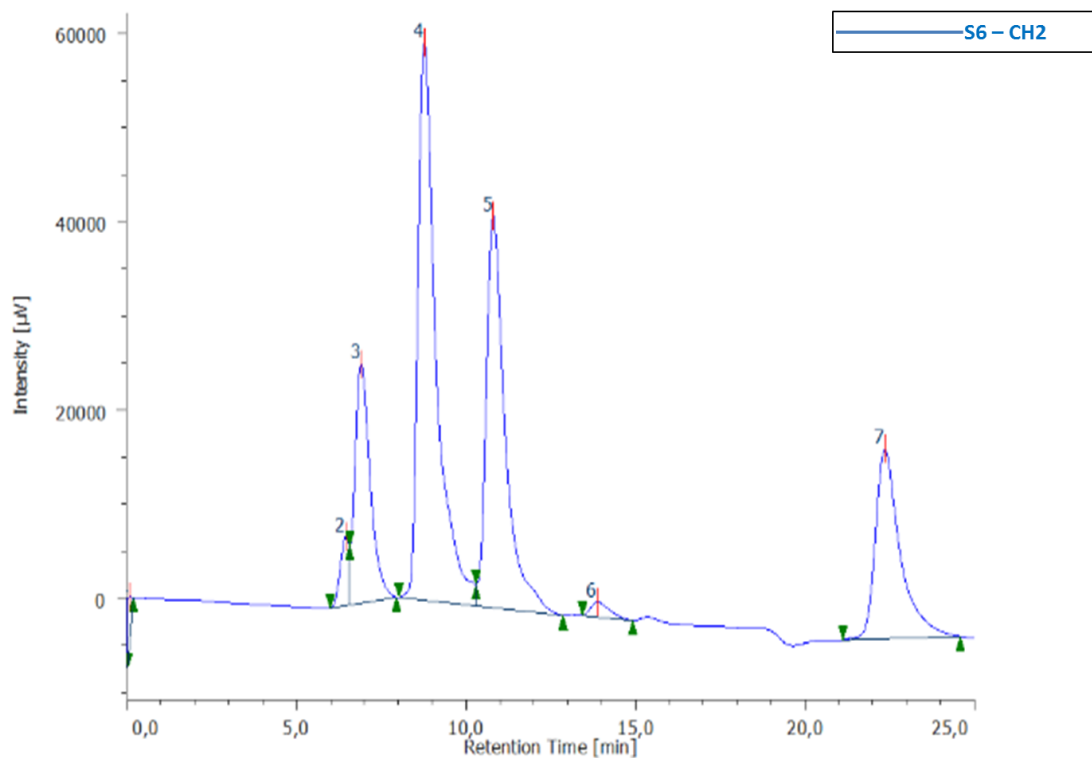
**Annexe 9 :** Spectre HPLC de la concentration du glucose enregistré après 72h de saccharification utilisant une enzyme commerciale



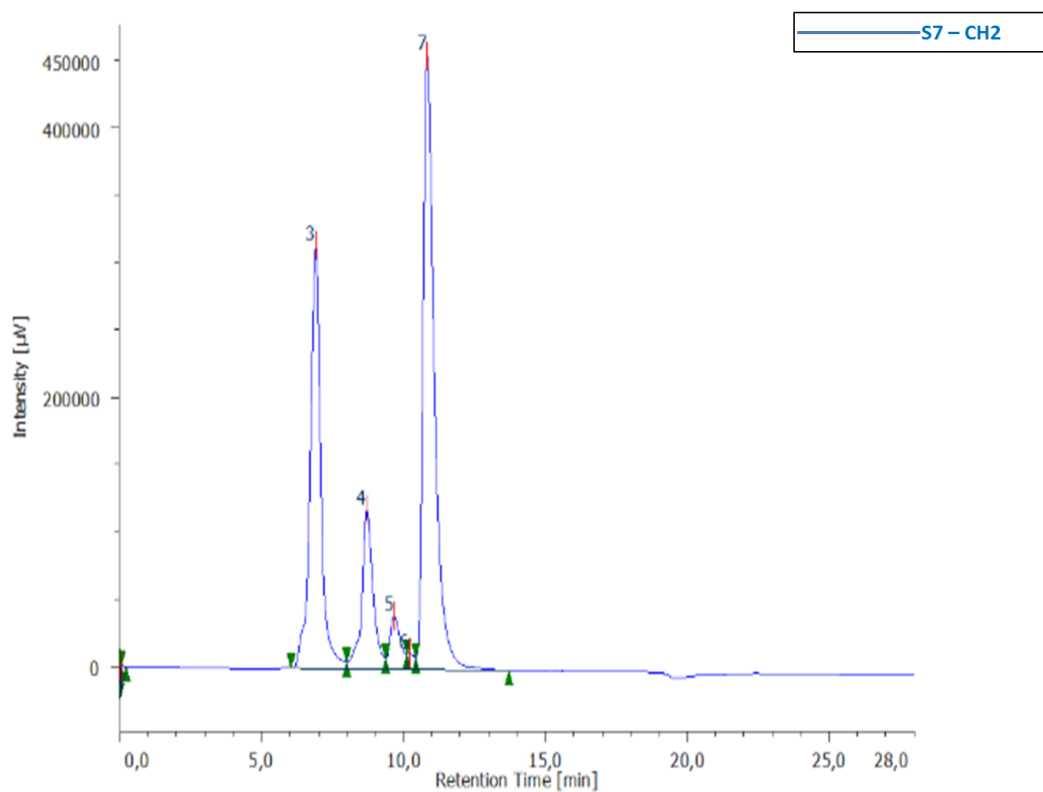
**Annexe 10 :** Spectre HPLC de la concentration du glucose enregistré après 96h de saccharification utilisant une enzyme commerciale



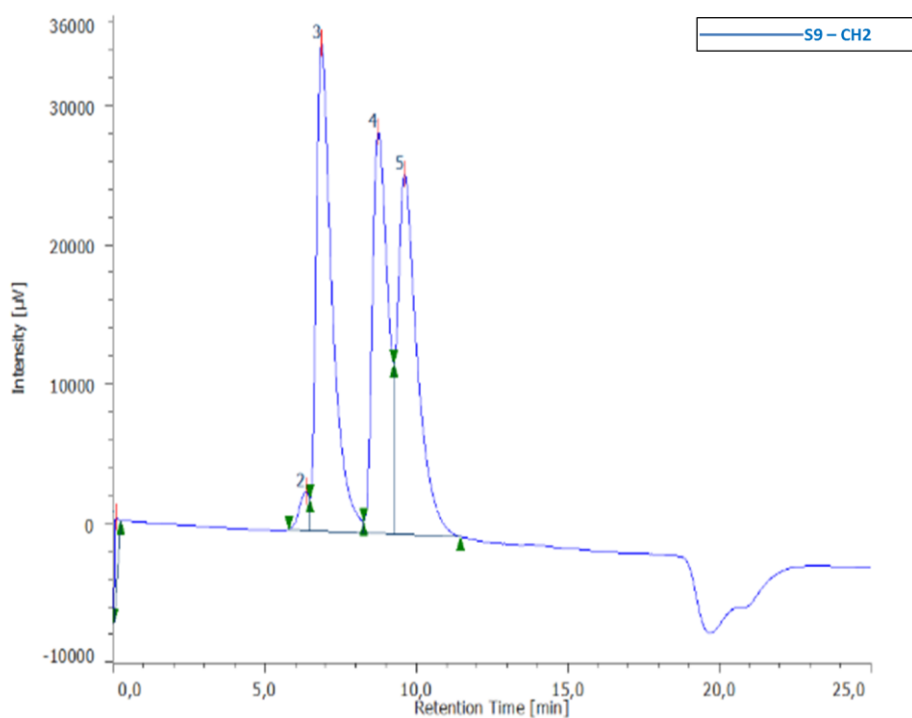
**Annexe 11** : Spectre HPLC de la concentration du glucose et de l'éthanol enregistré après 48h de fermentation utilisant une enzyme commerciale



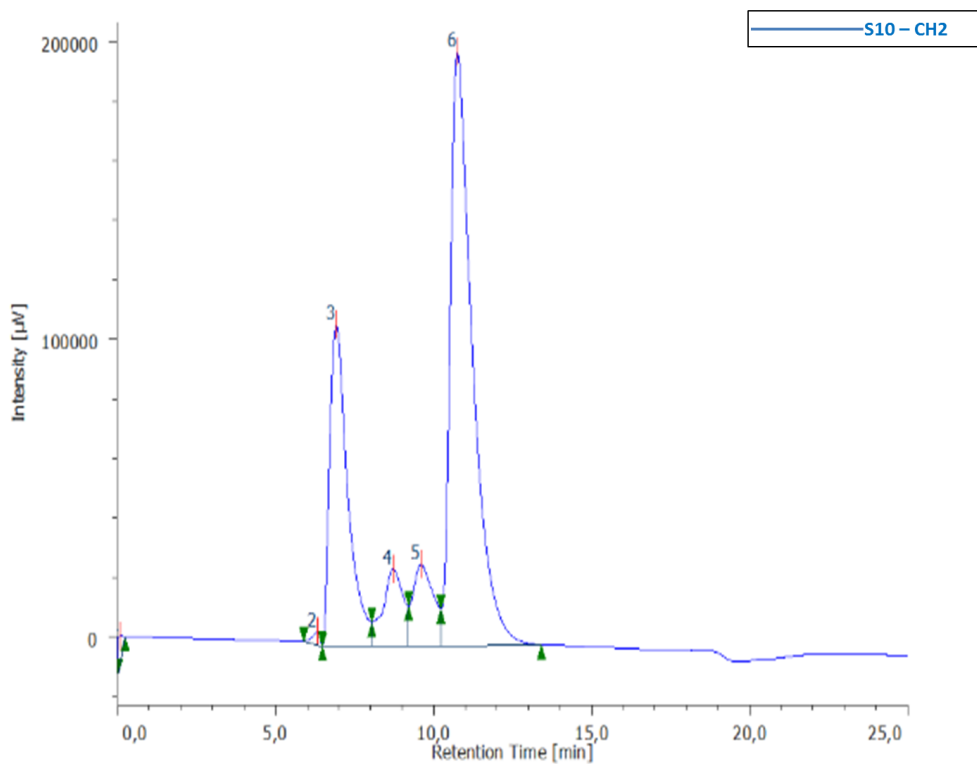
**Annexe 12** : Spectre HPLC de la concentration du glucose enregistré après 24h de saccharification utilisant un surnageant enzymatique



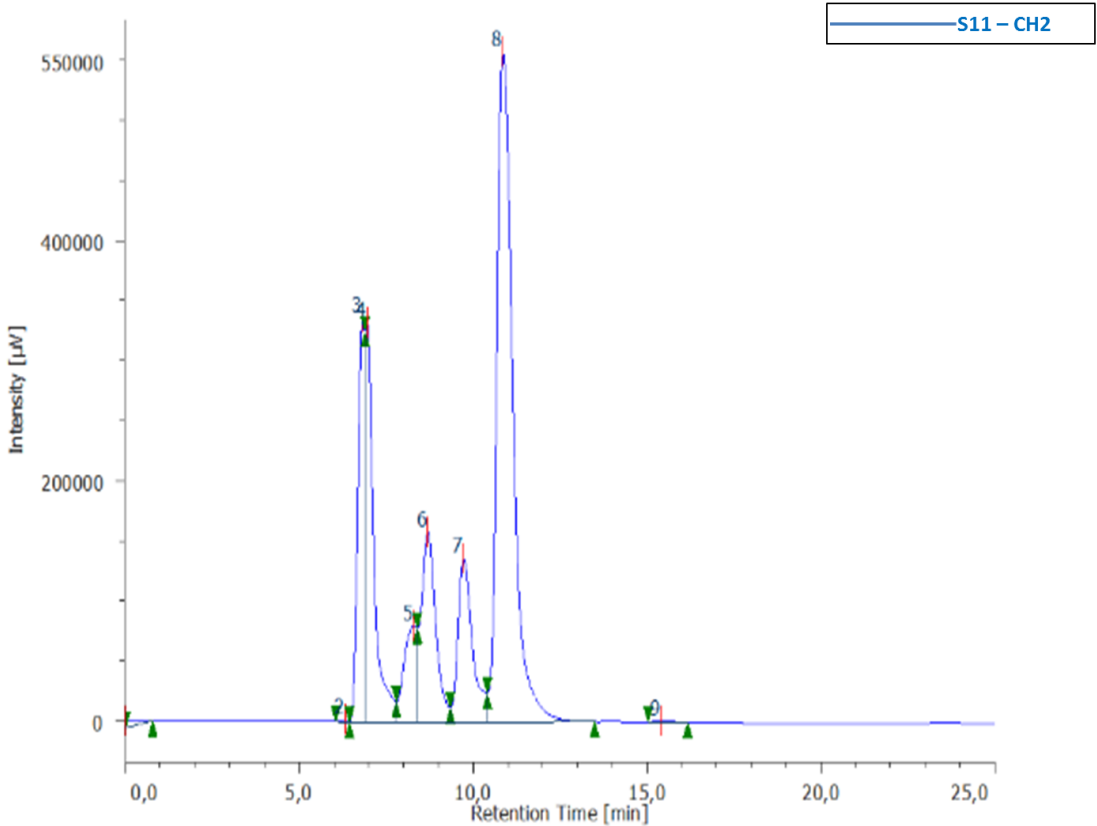
**Annexe 13 :** Spectre HPLC de la concentration du glucose enregistré après 48 h de saccharification utilisant un surnageant enzymatique



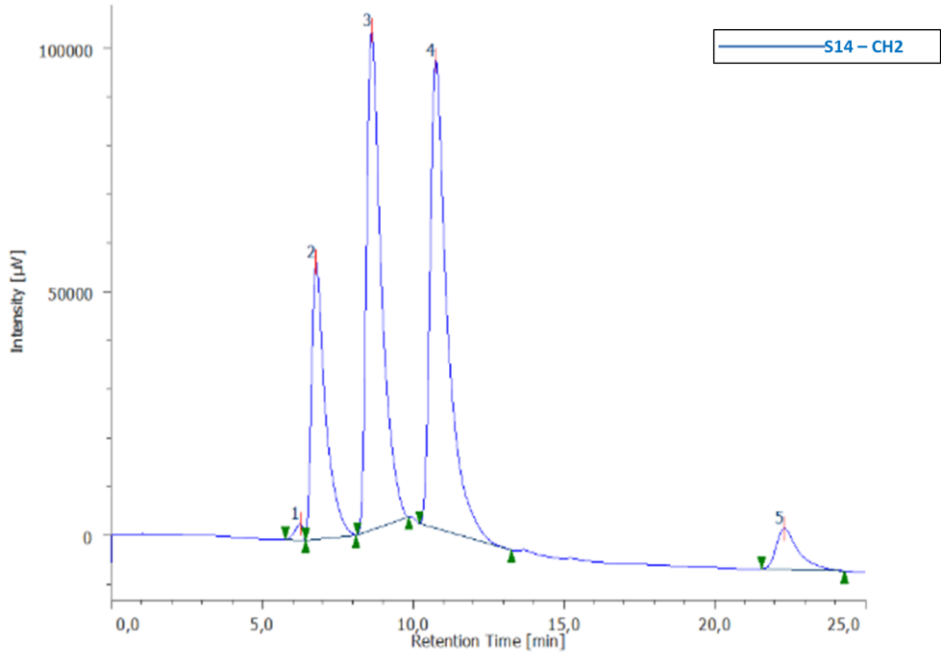
**Annexe 14 :** Spectre HPLC de la concentration du glucose enregistré après 72h de saccharification utilisant un surnageant enzymatique



**Annexe 15 :** Spectre HPLC de la concentration du glucose enregistré après 96h de saccharification utilisant un surnageant enzymatique



**Annexe 16:** Spectre HPLC de la concentration du glucose et de l'éthanol enregistré après 48h de fermentation utilisant un surnageant enzymatique



**Annexe 17 :** production (g/L) et taux (%) d'éthanol pendant saccharification et fermentation (séparée) de *ulva lactuca*

| <b>Temps (h)</b> | <b>Glucose libéré (g/L)</b> | <b>Ethanol produit (g/L)</b> | <b>Taux d'Ethanol (g eth/g glc)</b> | <b>Taux Ethanol (/au % théorique)</b> |
|------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 0                | 0                           | 0                            | 0                                   | 0                                     |
| 24               | 1,19                        | 0                            | 0                                   | 0                                     |
| 48               | 1,852                       | 0                            | 0                                   | 0                                     |
| 72               | 5,42                        | 0                            | 0                                   | 0                                     |
| 96               | 7,209                       | 0                            | 0                                   | 0                                     |
| 120              | 1,169                       | 3,071                        | 0,362                               | 70,980                                |
| 144              | 0                           | 3,521                        | 0,415                               | 81,404                                |

**Annexe 18:** Activité FPase du surnageant de la souche N°=5 (fpu / ml min)

|                           | <b>j+3</b> | <b>J+4</b> | <b>J+5</b> | <b>J+6</b> |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>FPase fpu / mL min</b> | 0,0350     | 0,0429     | 0,0705     | 0,0440     |